



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BIOTINA  
SOBRE EL RECAMBIO DE LA PIRUVATO  
CARBOXILASA EN CULTIVOS CELULARES

**T E S I S**

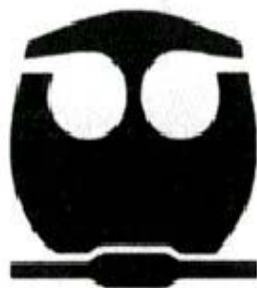
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A:

**NAYELI RODRÍGUEZ FUENTES**

Tutor: Dr. ANTONIO VELÁZQUEZ ARELLANO



MÉXICO, D. F.

Marzo 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BIOTINA SOBRE EL RECAMBIO DE LA PIRUVATO CARBOXILASA EN CULTIVOS CELULARES

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Antonio Velázquez Arellano en la Unidad de Genética de la Nutrición, del Instituto Nacional de Investigaciones Biomédicas UNAM-Instituto Nacional de Pediatría INP.

El Comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Antonio Velázquez Arellano Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
UNAM  
Dr. Fernando López Casillas Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
Dr. Eleazar Martínez Barajas Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Marco Antonio Briones Orta en la estandarización de la obtención de los cultivos primarios de hepatocitos.

Se reconoce la asesoría técnica de Dra. Gabriela Nora Velasco en los experimentos de marcaje metabólico.

Se reconoce la colaboración de Q.F.B. Gabriela Román Cisneros, Q.F.B. Itzel López Rosas y Q.F.B. José Luis García Hernández en estandarización de las técnicas empleadas en esta tesis.

Se reconoce la colaboración de la Q.F.B. Cynthia Fernández Lainez en la determinación del ácido 3-hidroxiisovalérico.

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis con el número de registro 183598.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 19 de Abril de 2006.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dra. Rosario A. Muñoz Clares	Facultad de Química, UNAM
VOCAL	Dra. Ma. Cristina Fernández Mejía	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
SECRETARIO	Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
SUPLENTE	Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
SUPLENTE	Dr. Jorge Membrillo Hernández	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BIOTINA SOBRE EL  
RECAMBIO DE LA PIRUVATO CARBOXILASA EN CULTIVOS  
CELULARES

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la M. en C. Isabel Ibarra por su asesoría para la determinación del ácido 3-hidroxiisovalérico.

Se agradece al Dr. Victoriano Pérez Vázquez por sus comentarios a esta tesis.

Se agradece a la secretaria María de los Angeles Alpizar por su apoyo administrativo durante la realización de esta tesis.

Se agradece a los laboratoristas Matías y Tere por su apoyo técnico durante la realización de esta tesis.

## DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres. Felicidades Ma y gracias por confiar en mi e impulsar mis sueños.

A mis hermanas Barbara, Fernanda y Joselyn por ser la fuerza que me impulsa para seguir adelante.

A mi sobrina Jimena por regalarme una sonrisa al llegar a casa.

A mis Tías Eгна y Lidia por apoyarme en todo momento.

A mi abue porque siempre me acompaña.

“El éxito se consigue  
de fracaso en fracaso  
sin perder el entusiasmo.”

Sir Winston Churchill (1874-1965)

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>II</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>III</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Biosíntesis de biotina	
1.2 Distribución de la biotina	
1.3 Absorción y transporte	
1.4 Carboxilasas dependientes de biotina	
1.5 Ciclo de la biotina	
1.6 Deficiencia de biotina	
1.7 Regulación de la expresión genética por biotina	
1.8 Recambio proteico	
1.9 Síntesis y degradación de la piruvato carboxilasa	
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>13</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>13</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>14</b>
5.1 Modelo animal de deficiencia de biotina	
5.2 Obtención de hepatocitos de ratas control y deficientes de biotina	
5.3 Cultivo primario de hepatocitos	
5.4 Condiciones de cultivo	
5.5 Especificidad del anticuerpo anti-piruvato carboxilasa (anti-PC)	
5.6 Inmunoprecipitación	
5.7 Marcaje metabólico (pulso-caza)	
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>19</b>
6.1 Estandarización	
6.1.1 Modelo animal de deficiencia de biotina	
6.1.2 Condiciones de cultivo	
6.1.3 Especificidad del anticuerpo anti-piruvato carboxilasa (anti-PC)	
6.1.4 Inmunoprecipitación	
6.1.5 Marcaje metabólico	
6.2 Efecto de la deficiencia de biotina sobre la velocidad de síntesis y degradación de piruvato carboxilasa	
6.2.1 Velocidad de síntesis de la piruvato carboxilasa	
6.2.2 Velocidad de degradación de la piruvato carboxilasa	

<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>32</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>33</b>
<b>10. REFERENCIAS</b>	<b>34</b>
<b>11. ÍNDICE DE MATERIALES Y REACTIVOS</b>	<b>39</b>



## **RESUMEN**

La piruvato carboxilasa (PC) es un miembro de la familia de enzimas dependientes de biotina que cataliza la carboxilación del piruvato para formar oxaloacetato. En mamíferos la PC tiene un papel importante en gluconeogénesis, lipogénesis, síntesis de neurotransmisores y en la secreción de insulina. La deficiencia de biotina ocasiona una disminución en la actividad y la concentración intracelular de la PC y de otras carboxilasas dependientes de biotina. Para determinar el mecanismo por el cual disminuye la masa de la PC hepática en condiciones de deficiencia, determinamos la velocidad de síntesis y de degradación de la PC en cultivos primarios de hepatocitos, obtenidos a partir de ratas alimentadas con una dieta deficiente de biotina de seis a siete semanas. El recambio de la PC se determinó mediante experimentos de pulso-caza con un período de pulso de 48 h y un periodo de caza de 48 h con intervalos de 6 h. Los resultados indican que la deficiencia de biotina disminuye 4.5 veces la velocidad de síntesis de la PC y que aumenta 4.6 veces la velocidad de degradación. Este efecto dual que tiene la biotina sobre el recambio de la PC hepática explica la disminución de su concentración intracelular y probablemente la disminución de otras carboxilasas dependientes de biotina.

## **ABSTRACT**

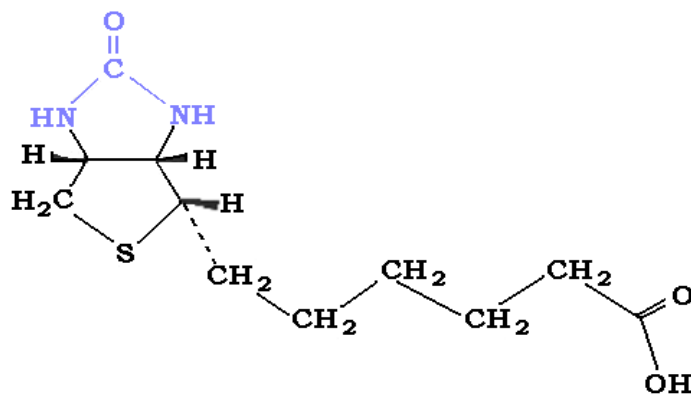
Pyruvate carboxylase (PC) is a member of the biotin-dependent enzyme family; it catalyses the carboxylation from pyruvate to oxaloacetate. In mammals, PC plays a crucial role in gluconeogenesis, lipogenesis, synthesis of neurotransmitters and insulin secretion. The biotin deficiency induces a decrease in enzymatic activity and intracellular concentration of PC and other biotin-dependent carboxylases. In order to determine the mechanism by which hepatic PC levels decrease under biotin deficiency conditions, we determined the rates of synthesis and degradation of PC in primary cultures of hepatocytes obtained from rats fed a biotin deficient diet for six to seven weeks. PC turnover was determined by pulse-chase experiments with a pulse of 48 h and a period of chase of 48 h with intervals of 6 h. Results indicate that synthesis rate of PC decreased 4.5 times under biotin deficiency conditions, while degradation rate was 5.1 times higher. This dual effect of biotin on hepatic PC turnover explains the reduction its intracellular concentration and probably the reduction of other biotin-dependent carboxylases.

## ABREVIATURAS

ACC	Acetil coenzima A carboxilasa
Ácido 3-HV	Ácido 3-hidroxiisovalérico
APOC	Apocarboxilasa
APO-PC	Apo piruvato carboxilasa
Bir A	Proteína ligasa de biotina en bacterias
BPL	Proteína ligasa de biotina
DMEM	Modificación de Dulbecco al medio de Eagle
HCS	Holocarboxilasa sintetasa
HeLa	Células de cáncer cervicouterino
HepG2	Células de hepatocarcinoma humano
HEPES	Ácido N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-[2-etano sulfónico]
HE(39)L	línea celular humana
HOLOC	Holocarboxilasa
HOLO-PC	Holo piruvato carboxilasa
Km	Constante de Michaelis Menten
K-R	Solución de Krebs Ringer
LDH	Lactato deshidrogenasa
MCC	Metilcrotonil coenzima A carboxilasa
MTC1	Transportador de monocarboxilatos 1
NaH <sup>14</sup> CO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio marcado con carbono 14
PBS	Amortiguador de fosfatos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PC	Piruvato carboxilasa
PCC	Propionil coenzima A carboxilasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
<sup>35</sup> S-metionina	Metionina marcada con azufre 35
SMVT	Transportador multivitamínico dependiente de sodio
3T3-L1	Línea celular de adipositos de ratón

## 1 INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la biotina se remonta a 1898 cuando F. Sternitz reportó que las lesiones en la piel de ratas alimentadas con huevos crudos desaparecían con un factor que llamó vitamina H (de Hautt, que en alemán significa piel) presente en el hígado y en las levaduras. Más tarde Wildiers observó que para desarrollarse en cultivo, las levaduras requerían de un factor “bios” que provenía del mosto de cerveza. Posteriormente se encontró que “bios” era una mezcla de tres compuestos; el bios I, más tarde identificado como mesoinositol, el bios IIA, conocido como ácido pantoténico, y el bios IIB, conocido como biotina (1). Este hallazgo condujo a la cristalización y determinación de la estructura de la biotina (Fig. 1) (2).

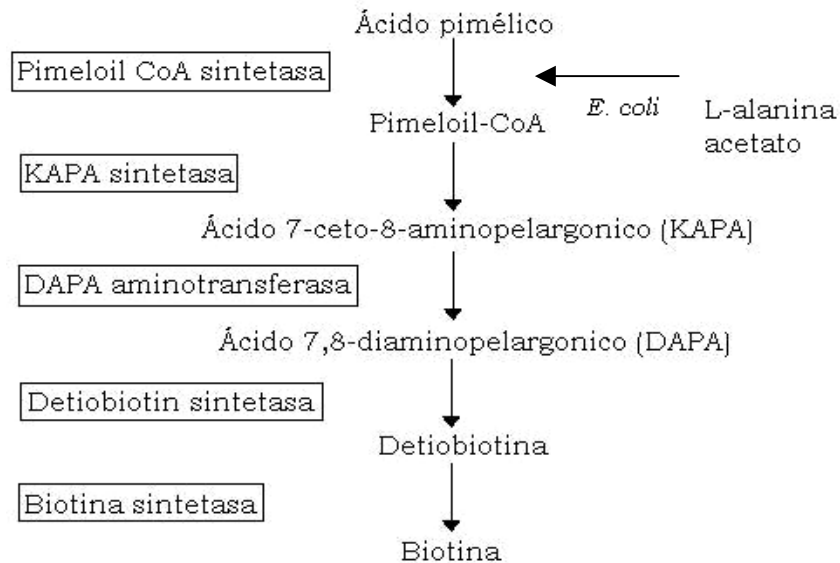


**Figura 1. Estructura de la biotina.** La biotina es el ácido (+)-cis-hexahidro-2-oxo-1H-tieno-3,4-imidazol-4-valérico y se encuentra compuesta por un anillo ureido que contiene un átomo de azufre y una cadena lateral de ácido valérico. Tomado de Goodman (3).

### 1.1 Biosíntesis de la biotina

Los primeros estudios sobre la síntesis de la biotina demostraron que en *Corynebacterium diphtheriae* la biotina puede ser remplazada por el ácido pimélico (4) y que éste estimula la síntesis de biotina en *Aspergillus*. En la actualidad se ha demostrado que la biosíntesis de la biotina en *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus sphaericus* sólo difiere en el primer paso de la ruta (Fig. 2). *B. subtilis* y *B. sphaericus* sintetizan pimeloil-CoA a partir de ácido

pimélico, mientras que en *E. coli* es sintetizado a partir de L-alanina y/o acetato, vía acetyl CoA (Fig. 2). Los mamíferos no biosintetizan biotina, por lo que deben adquirirla a través de la dieta.



**Figura 2. Biosíntesis de biotina en bacterias.** La ruta biosintética es similar en los microorganismos, sólo difieren en la síntesis de pimeloil CoA. *Bacillus* utilizan la pimeloil-CoA sintetasa para sintetizar pimeloil-CoA a partir de ácido pimélico. En *E. coli*, pimeloil-CoA es sintetizado a partir de L-alanina y/o acetato vía acetyl CoA. Modificado a partir de Ifuku (5).

## 1.2 Distribución de la biotina

La biotina se encuentra distribuida en forma libre en la leche, frutas, yema de huevo y vegetales; también se encuentra unida a proteínas en tejidos animales como riñón e hígado y en cereales (6).

## 1.3 Absorción y transporte

La absorción intestinal de biotina es regulada por un sistema dependiente de calmodulina (7). La activación de la proteína cinasa C inhibe la absorción de biotina, mientras que la inhibición de esta cinasa estimula su absorción en células Caco-2. Este efecto de la proteína cinasa C es mediado por alteraciones en la actividad o abundancia de los transportadores de biotina.

El transportador de biotina en células de mamífero transporta ácido pantoténico y ácido lipoico con afinidad similar a la de la biotina, por lo que ha sido nombrado transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT) (8, 9). Existe un segundo transportador de biotina: el transportador de monocarboxilatos 1 (MTC1) que participa en el transporte de biotina en linfocitos humanos (10, 11). La contribución del MCT1 y SMVT en el transporte de biotina no ha sido establecida; sin embargo se han encontrado nueve secuencias relacionadas a MTC en el genoma humano (11) que se conjetura son tejido específicas como las cuatro variantes del SMVT encontradas en rata (9). Cuando la concentración de biotina es alta ( $> 2.6$  nM), la difusión pasiva toma importancia y excede el flujo mediado por el transportador. La toma de biotina por difusión pasiva y por el transportador contribuyen a la eficiente captación de biotina observada en mamíferos.

Los mamíferos son incapaces de disociar el doble anillo de la biotina; en consecuencia, aproximadamente la mitad de la biotina se secreta en forma inalterada y la otra mitad en forma de sus metabolitos: bis-norbiotina y los sulfóxidos D y L de la biotina. La excreción se realiza principalmente a través de la orina (12).

#### 1.4 Carboxilasas dependientes de biotina

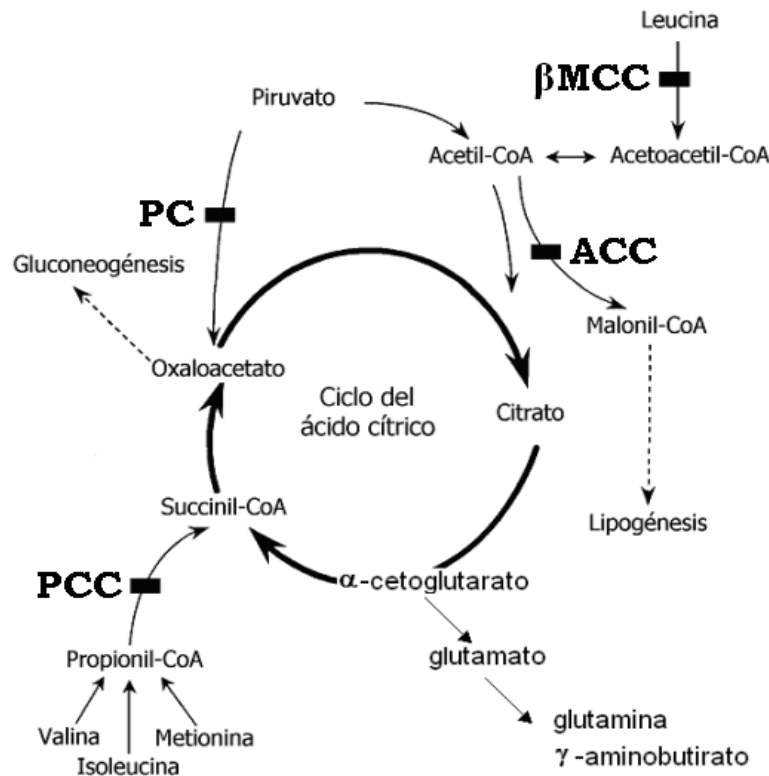
La biotina interviene como grupo prostético en el metabolismo celular, concretamente en las reacciones de carboxilación (13). En mamíferos se han descrito cuatro carboxilasas dependientes de biotina: la  $\beta$ -Metilcrotonil Coenzima A carboxilasa (MCC), dos isoformas de Acetil Coenzima A carboxilasa (ACC1 y ACC2), la Propionil Coenzima A carboxilasa (PCC) y la Piruvato carboxilasa (PC). La ACC es una enzima citosólica, mientras que las otras cuatro se encuentran localizadas en la matriz mitocondrial (14).

La MCC participa en el catabolismo de la leucina convirtiendo el 3-metilcrotonil CoA a 3-metilglutaconil CoA. La MCC es una enzima compuesta de seis protómeros, que a su vez están compuestos por una subunidad  $\alpha$  de 62 kDa y una subunidad  $\beta$  de 73.5 kDa donde se encuentra el sitio de unión a biotina. La deficiencia de MCC origina un incremento en la excreción de ácido 3-hidroxiisovalérico en orina, por lo que este metabolito ha sido utilizado como marcador de deficiencia de biotina (15).

La ACC es una enzima clave para el metabolismo de los ácidos grasos, catalizando la carboxilación de acetil CoA para formar malonil CoA, precursor en la síntesis y elongación de ácidos grasos. En mamíferos se conocen dos isoenzimas, la ACC1 de 265 kDa y la ACC2 de 280 kDa, que se expresan predominantemente en corazón y en músculo esquelético. En tejidos lipogénicos, ACC1 provee de malonil CoA para la síntesis de ácidos grasos, mientras que ACC2 produce malonil-CoA para inhibir la importación de acilcarnitina a la mitocondria y así restringir la  $\beta$ -oxidación. También se le ha relacionado con el almacenamiento celular de biotina (16, 17). Esta enzima tiene una estructura compleja que está sujeta a regulación alostérica por citrato, y puede encontrarse en estado monomérico o polimérico, siendo este último el estado activo de la enzima que se ve afectado por fosforilación (18).

La PCC cataliza la conversión de propionil-CoA a metilmalonil-CoA en la degradación de los ácidos grasos de cadena impar y el colesterol, así como en el catabolismo de los aminoácidos treonina, metionina, valina e isoleucina. La enzima nativa es un hexámero de protómeros compuestos por 2 subunidades, la subunidad  $\alpha$  de 750 kDa y la subunidad  $\beta$  de 56 kDa. La biotina se une a la subunidad mayor, por lo que cada mol de enzima tiene 6 moles de biotina (19, 20). Alteraciones en la actividad de la PCC dan origen a la acidemia propiónica (21).

La PC cataliza la conversión del piruvato a oxaloacetato por lo que tiene un papel indispensable en la gluconeogénesis en riñón e hígado, mientras que en cerebro participa en la anaplerosis del ciclo de Krebs donde el oxaloacetato actúa como precursor para la síntesis de neurotransmisores como glutamato y  $\gamma$ -aminobutirato. Además, el oxaloacetato es la fuente de citrato citosólico utilizado para formar malonil-CoA y ácidos grasos (Fig.3). La enzima activa se encuentra formada por cuatro subunidades idénticas de 30 kDa que poseen un sitio de unión a biotina y es regulada alostéricamente por acetil-CoA (22, 23). La deficiencia de PC es un desorden autosómico recesivo de baja incidencia (1:250000) que se divide en tres tipos de acuerdo a su gravedad. La tipo A, que es la forma menos agresiva de la deficiencia, presenta episodios poco frecuentes de acidosis, la tipo B presenta retraso mental, y la deficiencia tipo C, que es la forma letal de la enfermedad, ocasiona la muerte a los 3 meses de vida (24).

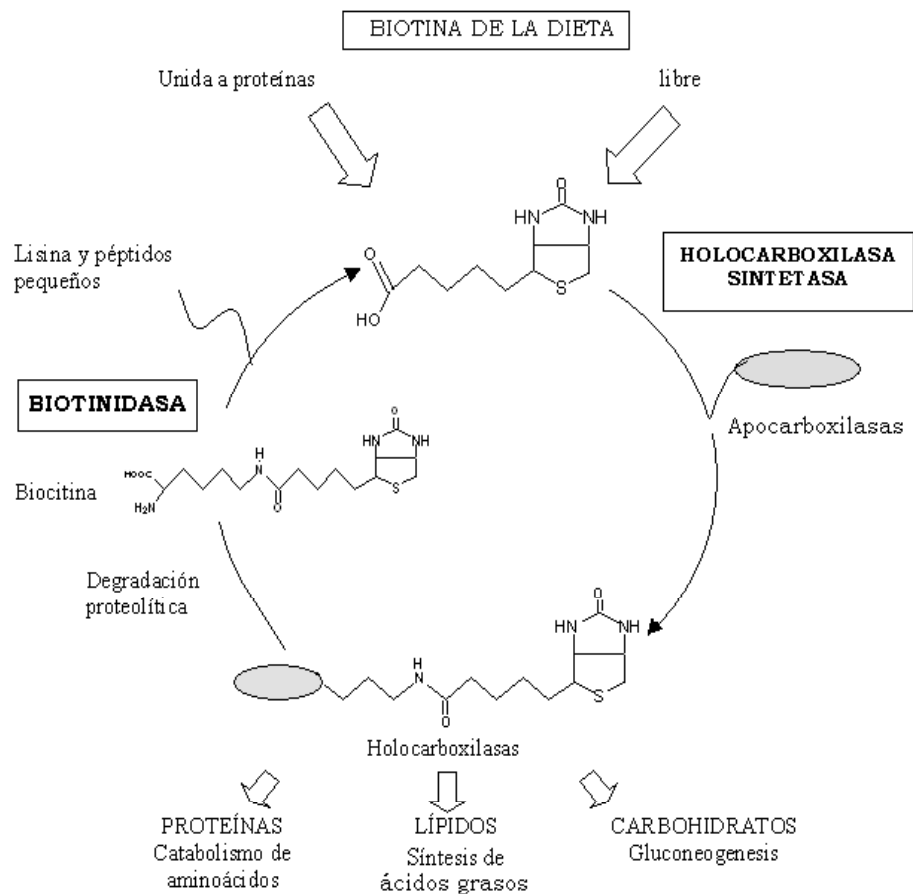


**Figura 3. Carboxilasas dependientes de biotina en el metabolismo celular.** Los bloques rectangulares indican la participación de las enzimas.  $\beta$ MCC, metilcrotonil CoA carboxilasa; PCC, propionil CoA carboxilasa; PC, piruvato carboxilasa; ACC, acetil CoA carboxilasa (25).



## 1.5 Ciclo de la biotina

Aunque la biotina se encuentra ampliamente distribuida en los nutrimentos, su concentración es muy baja comparada con la de otras vitaminas. Para disponer de suficiente biotina que cubra los requerimientos celulares, los mamíferos han desarrollado un ciclo eficiente de reciclaje de biotina para garantizar el suministro y utilización de esta vitamina (Fig.4) (26).



**Figura 4. Ciclo de la biotina.** Las enzimas relacionadas con este ciclo son la holocarboxilasa sintetasa (HCS) que une la biotina a las apocarboxilasas y la biotinidasa que libera la biotina de la biocitina para generar el ciclo de la biotina (26).

Las carboxilasas dependientes de biotina se sintetizan como apocarboxilasas y se activan sólo cuando la biotina está unida covalentemente a un residuo de lisina localizado en el extremo  $\epsilon$ -amino de la apocarboxilasa y entonces es

llamada holocarboxilasa. La biotinilación es un proceso extremadamente selectivo que es catalizado por la holocarboxilasa sintetasa (HCS) en mamíferos (27), BirA en procariontes y biotina proteína ligasa (BPL) en eucariontes unicelulares.

El residuo de lisina que se biotinila en las apocarboxilasas se encuentra en el motivo Ala-Val-Met-Lys-Met, conservado en todos los sitios de unión a biotina (28); este motivo se encuentra dentro de un dominio que funciona como sustrato para la HCS. El reconocimiento de este dominio depende de la posición exacta del residuo de lisina así como de la localización espacial de los aminoácidos que lo rodean. El cambio en una posición de la lisina en la PC de levadura bloquea la biotinilación (29), mientras que en *Plethodon shermanii* sustituciones constitutivas en los aminoácidos que rodean el residuo de lisina modifican la reacción de carboxilación, pero no son esenciales para el reconocimiento por BPL (30).

La biotinilación se lleva a cabo en dos pasos. En el primer paso (Eq.1) se forma un intermediario de alta energía, el biotinil-AMP, a partir de biotina, ATP y  $Mg^{+2}$ ; en el segundo paso (Eq.2) se da origen a la holocarboxilasa mediante la transferencia del grupo biotinilo a la apocarboxilasa.

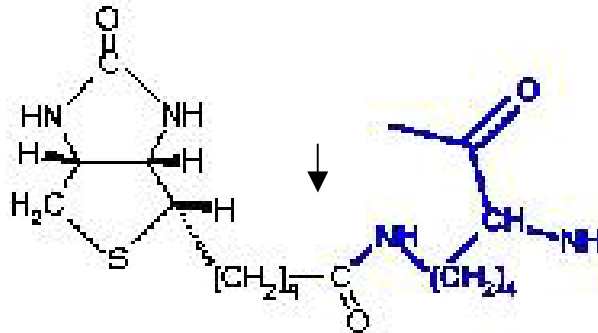


La hidrólisis del enlace biotina-lisina requiere de la acción de la biotinidasa que libera la biotina para su posterior reciclamiento (Fig. 5). Esta enzima también se requiere para el aprovechamiento de la biotina proveniente de la dieta,

---

\* Apocarboxilasa (inactiva)  
\*\* Holocarboxilasa (activa)

debido a que esta vitamina generalmente se encuentra unida a proteínas (31, 32). Recientemente, Ballard y colaboradores propusieron que el rompimiento de la biocitina por la biotinidasa conduce a la formación de biotinil-tioéster y que a partir de este metabolito el grupo biotinil es transferido al extremo  $\epsilon$ -amino de la lisina de histonas, por lo que se ha sugerido que la biotinidasa cataliza la biotinilación y des-biotinilación de histonas (33).



**Figura 5. Estructura de la biocitina.** La flecha indica la unión covalente de la biotina al extremo  $\epsilon$ -amino del residuo de lisina de la apocarboxilasa.

## 1.6 Deficiencia de biotina

Se ha observado deficiencia de biotina en pacientes que reciben alimentación parenteral durante varios años (34, 35). No es habitual la deficiencia en una dieta equilibrada, aunque se incrementa el riesgo de carencia en el caso de tratamientos de larga duración con antibióticos (36). La ingesta habitual o exagerada de alcohol reduce su absorción (37). Estudios en ratas han comprobado que la biotina es indispensable para el buen funcionamiento del sistema inmune; ya que reduce la producción de anticuerpos, reactividad inmunológica y la diferenciación específica de linfocitos T (9, 38). En humanos se ha reportado que una tercera parte de niños con desnutrición energético proteica grave (DEP) presentan deficiencia de biotina (39) aunado a que disminuye la actividad de PCC (40).

Se ha demostrado que en la deficiencia de biotina existe una disminución de la concentración intracelular y la actividad específica de la PC, PCC,  $\beta$ MCC, ACC1 y ACC2 en tejidos obtenidos a partir de ratas deficientes de esta vitamina (41).

### 1.7 Regulación de la expresión genética por biotina

La biotina modifica la expresión de genes relacionados con su función de grupo prostético, como la HCS (42), y de diversas proteínas que no tienen que ver con su función clásica de cofactor, como la glucocinasa (43, 44), la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (45), el receptor de asialoglicoproteínas (46) y la ornitina transcarbamilasa (47).

Se ha propuesto que el biotinil-AMP tiene un papel esencial en la regulación de la expresión genética (48). De acuerdo con este modelo, el biotinil-AMP activa a la guanilato ciclasa soluble por un mecanismo aún desconocido; esta activación incrementa la síntesis de guanosin monofosfato cíclico (cGMP), que a su vez estimula a la proteína cinasa G, dando como resultado la activación de proteínas que incrementan la transcripción de los genes que codifican para la HCS y otras proteínas. Consistente con este modelo, la adición de biotina a cultivos deficientes incrementa la actividad de la guanilato ciclasa en fibroblastos y células HeLa (18).

Recientemente, se demostró que la deficiencia de biotina altera la señalización celular y la remodelación de la cromatina. Estudios realizados en linfocitos y en células de hepatocarcinoma humano (HepG2) demostraron que más de 2000 genes humanos dependen de biotina para su expresión (49, 50); entre estos genes, se encuentran proteínas que participan en la remodelación de la cromatina. Consistente con este hallazgo, se han encontrado cinco residuos de lisina en histonas humanas que son blanco de biotinilación (51, 52). Se ha

demostrado que los fibroblastos de pacientes con deficiencia de HCS presentan una deficiente biotinylación de histonas (53). Asimismo, estudios realizados en PBMC aportan evidencia de que la biotinylación de histonas se incrementa en la primera fase del ciclo celular (G1) y así permanece durante las siguientes fases (S, G2 y M) con respecto a los controles quiescentes (54), por lo que la biotinylación de histonas se asocia con la proliferación celular. Por otro lado, estudios realizados en células Jurkat (línea celular derivada de linfoma humano) mostraron que la deficiencia de biotina incrementa la actividad de unión del NF- $\kappa$ B al DNA (55). Estos resultados aportan evidencia de que la biotinylación de histonas interviene en el silenciamiento genético, la apoptosis y la sobrevivencia celular.

## 1.8 Recambio proteico

Anteriormente los componentes del cuerpo eran considerados como constituyentes estables que estaban sujetos a pequeñas modificaciones, mientras que las proteínas obtenidas a partir de la dieta tenían la función de proveer energía, actuando como entidades separadas, independientemente de las proteínas estructurales del cuerpo. Este concepto fue cambiado por Rudolf Scheonheimer, quien demostró que las proteínas corporales están continuamente sintetizándose y degradándose (56).

El proceso de recambio se ve influenciado por factores que incrementan o disminuyen la síntesis, la degradación o ambas, eventos que determinan la vida media de las proteínas. La vida media de las proteínas varía desde pocos segundos hasta varias horas, o incluso días, en los eucariontes. No obstante, existen proteínas como la hemoglobina, que pueden durar toda la vida del eritrocito (~110 días).

Diversas condiciones fisiológicas inciden sobre el recambio de las enzimas: éstas incluyen alteraciones hormonales (57, 58), disponibilidad de sustratos (59) y el estado nutricional (60, 61). Otro factor que repercute sobre la vida media de las enzimas, es el factor estructural. Durante el proceso de síntesis de una proteína, frecuentemente se introducen aminoácidos incorrectos que dan origen a enzimas defectuosas destinadas a la degradación. Un estudio en líneas celulares derivadas de fibroblastos humanos con la mutación puntual Ala<sup>610</sup>→Thr asociada a la deficiencia de piruvato carboxilasa tipo A, demostró que la disminución en la concentración y en la actividad de la proteína mutada origina una importación mitocondrial deficiente y probablemente un incremento en la velocidad de degradación de la enzima mutante (62).

Además, los cofactores o grupos prostéticos tienen un papel importante en el recambio de las enzimas, protegiéndolas de la desnaturalización y la degradación proteolítica. Este es el caso de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) de *E. coli*, en la que se ha demostrado que la unión de biotina le brinda mayor estabilidad en comparación con su forma de apocarboxilasa (carente de actividad enzimática) (63).

## 1.8 Síntesis y degradación de la piruvato carboxilasa

La vida media de la PC varía de acuerdo a cada tejido celular u organismo estudiado. Estudios realizados en hígado de rata demostraron que esta enzima tiene una vida media de 4.6 días, la cual está ligeramente por arriba de la vida media promedio que presentan las proteínas mitocondriales (3.8 días) (64). Sin embargo, en adipocitos de ratón 3T3-L1 la PC tiene una vida media corta, de 1.2 a 1.4 días (65).

La regulación a corto plazo de la actividad de la PC en tejidos animales ocurre a través de cambios en la concentración de sustrato, particularmente piruvato, a través de la inhibición por ADP, o a través de acetil-CoA, su activador alostérico (66). Estudios realizados en hígado de ratas demostraron que la regulación a largo plazo ocurre a través de la concentración intracelular de la enzima. La cantidad de PC aumenta hasta 3 veces, dependiendo del estado tiroideo (67); además, la cantidad de proteína enzimática se incrementa al doble en diabetes experimental (68). En ambos casos, los cambios en el contenido enzimático están mediados por cambios en la velocidad de síntesis con un mínimo efecto sobre la velocidad de degradación.

La PC en células 3T3-L1 también es regulada por cambios en la concentración intracelular de la enzima, aunque no se ha logrado esclarecer si el incremento en la síntesis de la PC se debe directamente a la inducción por insulina o por el proceso de diferenciación que caracteriza a esta línea celular (69).

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Tomando en cuenta que en la deficiencia de biotina disminuye no sólo la actividad sino también la concentración intracelular de la piruvato carboxilasa y de otras carboxilasas dependientes de biotina, nos interesamos en esclarecer el mecanismo por el cual en la deficiencia de biotina se observa una disminución en la cantidad de proteína.



### **3. HIPÓTESIS**

La deficiencia de biotina afecta el recambio de la piruvato carboxilasa hepática.

## **4. OBJETIVOS**

### OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la deficiencia de biotina sobre la velocidad de síntesis y degradación de la piruvato carboxilasa en cultivos primarios de hepatocitos de rata.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el modelo experimental de deficiencia de biotina.
2. Establecer las condiciones de los cultivos primarios de hepatocitos.
3. Validar la técnica de inmunoprecipitación.
4. Establecer y validar la técnica de pulso-caza.
5. Determinar la velocidad de síntesis de la piruvato carboxilasa.
6. Determinar la velocidad de degradación de la piruvato carboxilasa.

## 5. METODOLOGÍA

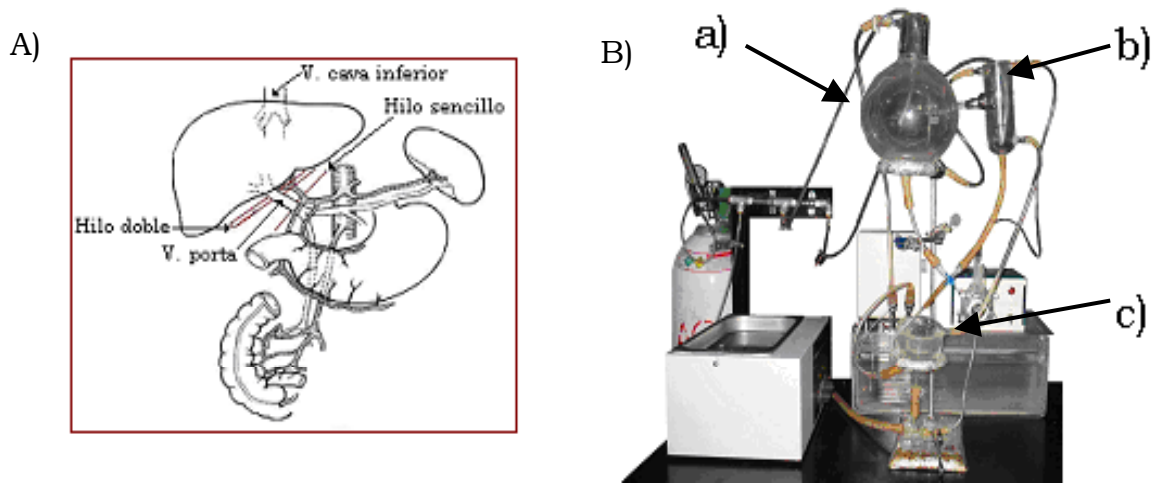
### 5.1 Modelo animal de deficiencia de biotina

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar recién destetadas (21 días), con un peso de ~50 g que fueron alimentadas con dieta normal durante una semana. Posteriormente fueron divididas en dos grupos: ratas control, alimentadas con dieta estándar, y ratas deficientes, alimentadas con una dieta carente de biotina y enriquecida con 0.5 g de avidina/Kg (TD.81079, ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland, USA). Las ratas fueron mantenidas en jaulas individuales y en condiciones estrictamente controladas de luz – oscuridad de 12 h x 12 h, con libre acceso al agua durante 6 a 7 semanas. Como indicadores de la deficiencia de biotina se determinaron la actividad de la propionil CoA carboxilasa en hígado y la concentración del ácido 3-hidroxiisovalérico en orina, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas. Las muestras de orina se colectaron durante 12 h en jaulas metabólicas.

### 5.2 Obtención de hepatocitos de ratas control y deficientes de biotina

A partir de hígados de ratas deficientes de biotina, se obtuvieron cultivos primarios de hepatocitos por perfusión anterógrada (70). Una vez anestesiada la rata, se colocaron dos hilos por debajo de la vena porta, un hilo sencillo que se anudó para cerrar la circulación sanguínea, y un hilo doble que después de canular la vena porta sirve para fijar la cánula a la vena (Fig. 6). El hígado fue perfundido con la solución Krebs Ringer (K-R) sin  $\text{Ca}^{2+}$  durante 5 min y posteriormente fue digerido durante 20 min con 3500 U de colagenasa tipo IV en K-R con  $\text{Ca}^{2+}$ . Finalmente, el hígado fue disgregado cuidadosamente con ayuda de una espátula de teflón. La suspensión celular se sometió a un gradiente de Percoll para descartar células muertas. Finalmente el botón

celular se resuspendió en medio de adhesión. Todas las soluciones fueron mantenidas a 37 °C y con burbujeo constante de CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> (5 %-95 %).



**Fig. 6 Técnica empleada para la obtención de hepatocitos de rata.** A) Perfusión anterógrada en la cual las soluciones entran a través de la vena porta y salen por la vena cava superior, permitiendo la irrigación de los lóbulos hepáticos. B) Equipo utilizado en la perfusión del hígado de rata: (a) Esfera donde se coloca la solución de lavado (K-R sin Ca<sup>2+</sup>), (b) Cono donde se coloca la solución de digestión (K-R con Ca<sup>2+</sup> y colagenasa IV) y (c) Embudo en el cual se coloca el hígado.

### 5.3 Cultivo primario de hepatocitos

Los hepatocitos obtenidos a partir de hígados de ratas controles y deficientes en biotina se sembraron ( $2.5 \times 10^5$  células) en cajas de 60 mm de diámetro previamente cubiertas con 10  $\mu\text{g}$  de colágena/cm<sup>2</sup>. Las células se mantuvieron en el medio de adhesión durante 2 h en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. La viabilidad celular se determinó mediante exclusión de azul de tripano. Como indicador del estado metabólico celular se determinó la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) según el método de Bergmeyer (71). Este método consiste en registrar la disminución de la absorbencia de la muestra debida a la oxidación del NADH a 340 nm durante 5 min. La actividad fue determinada a 25 °C y se expresa en U/ml de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$(\text{Promedio de } \Delta A_{340} / \text{min}) \times 10\,000 = \text{Unidades/ml de homogenado}$$

$\Delta A_{340}/\text{min}$  = Promedio del cambio de absorbancia durante 5 min.

Una unidad es definida como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto.

#### 5.4 Condiciones de cultivo

Se utilizaron 3 concentraciones de metionina: 2, 20 y 200  $\mu\text{M}$  para determinar en cual de ellas los hepatocitos no perdiesen sus características específicas, tales como su forma y la actividad de LDH. Estas concentraciones se escogieron con base en la concentración de metionina radiactiva a la que estarían expuestos los hepatocitos en el período de pulso y la concentración de este aminoácido en los medios de cultivo.

#### 5.5 Especificidad del anticuerpo anti-piruvato carboxilasa (anti-PC)

Para determinar la especificidad del anticuerpo anti-PC donado por el Dr. Janos Zemleni (Universidad de Nebraska, U.S.A) se llevó a cabo la separación de la enzima mediante electroforesis en geles al 10 % de poliacrilamida en presencia de SDS y en condiciones reductoras. Posteriormente los geles obtenidos se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 15 min a 20 voltios. Para evidenciar las bandas que reconoce el anticuerpo, las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-PC a una concentración de 1:1 000 durante 1 h a 25 °C, transcurrido este tiempo, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa a una concentración de 1: 10 000 durante 45 min a 25 °C. Finalmente las bandas se revelaron por quimioluminiscencia. Para verificar si el anticuerpo reconoce a la holo-PC, se realizó un blot de estreptavidina, ya que esta enzima tiene una alta afinidad por la biotina ( $K_d = 10^{-15}$ ). Después de la electrotransferencia de los geles, las membranas obtenidas se incubaron con 5  $\mu\text{l}$  de estreptavidina acoplada a

fosfatasa alcalina durante 2 h, transcurrido este tiempo, las membranas se incubaron con los sustratos de la enzima para finalmente identificar las proteínas biotiniladas.

## 5.6 Inmunoprecipitación

Para determinar la concentración necesaria del anticuerpo para realizar la inmunoprecipitación, se determinó la actividad de la PC en alícuotas de 100 µg de proteína total a partir de un homogenado completo y de muestras sometidas a inmunoprecipitación con 5, 10 y 15 µl de anticuerpo. Alícuotas de 25 µl fueron incubadas a 30 °C durante 30 min en 100 µl de amortiguador de reacción bajo condiciones de velocidad inicial (10 veces la  $K_m$  de los sustratos). La reacción se detuvo adicionando 100 µl de ácido tricloroacético al 20 %. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 1200 rpm durante 15 min y el sobrenadante se recuperó. Para eliminar los residuos volátiles las muestras se incubaron a 60 °C durante 4 h. El residuo de la incubación se resuspendió en 500 µl de H<sub>2</sub>O y 5 ml de líquido de centelleo. Finalmente se determinó la incorporación de NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> en un contador de centelleo líquido. Para cada reacción se corrió un blanco sin sustrato de acuerdo al método de Suormala (72). La actividad específica se expresó como nmol CO<sub>2</sub> fijado · min<sup>-1</sup> · mg proteína<sup>-1</sup> utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{dpm}^{14}\text{CO}_2 \text{ fijado}}{(\text{min. de incubación}) (\text{mg prot.})} \times \frac{1\,000\ \mu\text{g}}{1\ \text{mg}} \times \frac{0.001\ \text{nmol}^{14}\text{CO}_2}{\text{dpm } 0.1012} = \frac{\text{nmol}^{14}\text{CO}_2}{\text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}}$$

## 5.7 Marcaje metabólico (pulso-caza)

Para determinar la velocidad de síntesis de la PC los hepatocitos deficientes y controles se sembraron en cajas de 60 mm de diámetro a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células /cm<sup>2</sup>. Los cultivos celulares se incubaron con medio de pulso conteniendo 187  $\mu$ Ci de <sup>35</sup>S-metionina /ml a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante 96 h tomando muestras a las 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 h. En cada toma de muestra se recuperaron 3 cajas de cultivo.

Para determinar la velocidad de degradación, se determinó el decaimiento de la radiactividad a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h después de adicionar 3 ml de medio de caza para los cultivos controles y 0, 1, 1.5 y 2 h para los hepatocitos deficientes de biotina. Terminado el tiempo de caza, las células fueron recuperadas mediante raspado con ayuda de un gendarme de teflón (rubber policeman); el botón celular se resuspendió en 200  $\mu$ l de amortiguador de lisis. Los lisados celulares se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 min a 4 °C; los sobrenadantes fueron conservados a -70 °C, no más de 24 h antes de usarse.

Posteriormente 200  $\mu$ l del homogenado se incubaron con 25  $\mu$ l de proteína G-sefara y 15  $\mu$ l del anticuerpo anti-PC durante 12 h a 4 °C. Terminada la incubación, el complejo PC-antiPC-proteína G se colectó centrifugando a 12000 rpm durante 2 min y se lavó con 1 ml de PBS-Tritón X-100 al 0.5 % y posteriormente con 1 ml de PBS-Tritón X-100 al 0.05 %. El botón se resuspendió en 40  $\mu$ l de amortiguador de carga conteniendo 20 % de  $\beta$ -mercaptoetanol, las muestras se incubaron a 80 °C durante 10 min y se corrió el sobrenadante en geles de poliacrilamida al 12 % (1.5 mm). Una vez terminada la electroforesis, los geles se deshidrataron por 1 h en un secador de geles (BIO-RAD). El gel se expuso con una placa de autorradiografía por 2 días a -70 °C. El patrón de bandas se analizó con el densitómetro TIFON.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 ESTANDARIZACIÓN

#### 6.1.1 Modelo animal de deficiencia de biotina

Para evaluar el grado de deficiencia de biotina se consideró la aparición de las características fenotípicas propias de este padecimiento. Las ratas alimentadas con una dieta carente de biotina (0.5 g de avidina /Kg de alimento) presentaron claros signos de deficiencia de biotina, incluyendo alopecia, conjuntivitis periorificial y retraso en el crecimiento (Fig. 7).

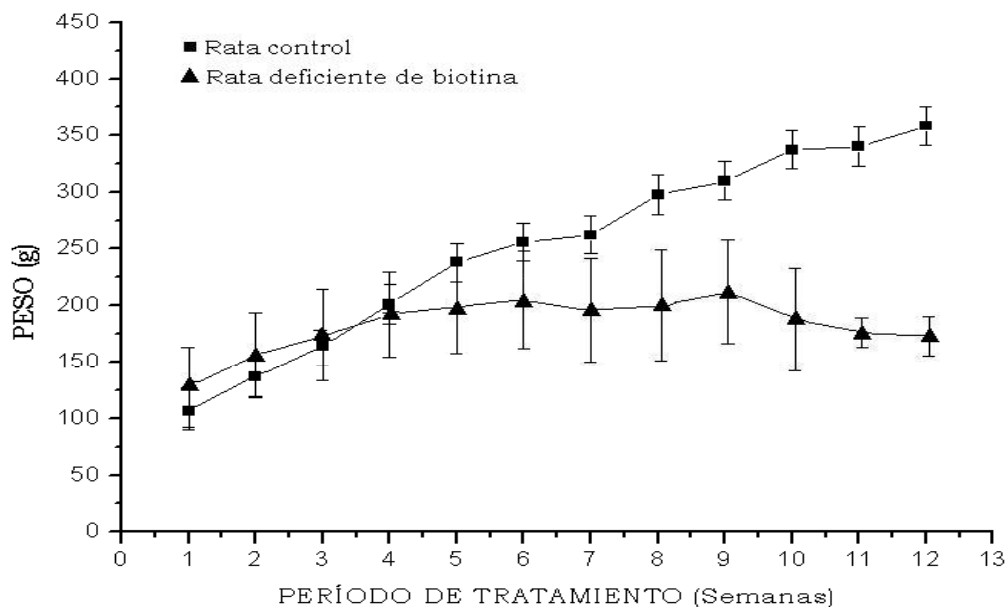


**Fig. 7. Características fenotípicas de la deficiencia de biotina.** Rata control (izquierda) y rata deficiente (derecha). Se muestra la presencia de alopecia y bajo peso en la rata alimentada durante 6 semanas con dieta deficiente de biotina y suplementada con 0.5 g de avidina /Kg de alimento.

La pérdida de peso se presentó a partir de la semana cinco, tiempo en el cual las ratas deficientes pesaron 50 g menos que las ratas controles. El retraso en el crecimiento es claro en las semanas 5-10 debido a que las ratas deficientes de biotina no aumentan visiblemente de talla ni de masa corporal (peso) en comparación con las ratas controles que en la semana diez pesaron 325 g. La acidemia ocasionada por la deficiencia de biotina es demasiado agresiva en la

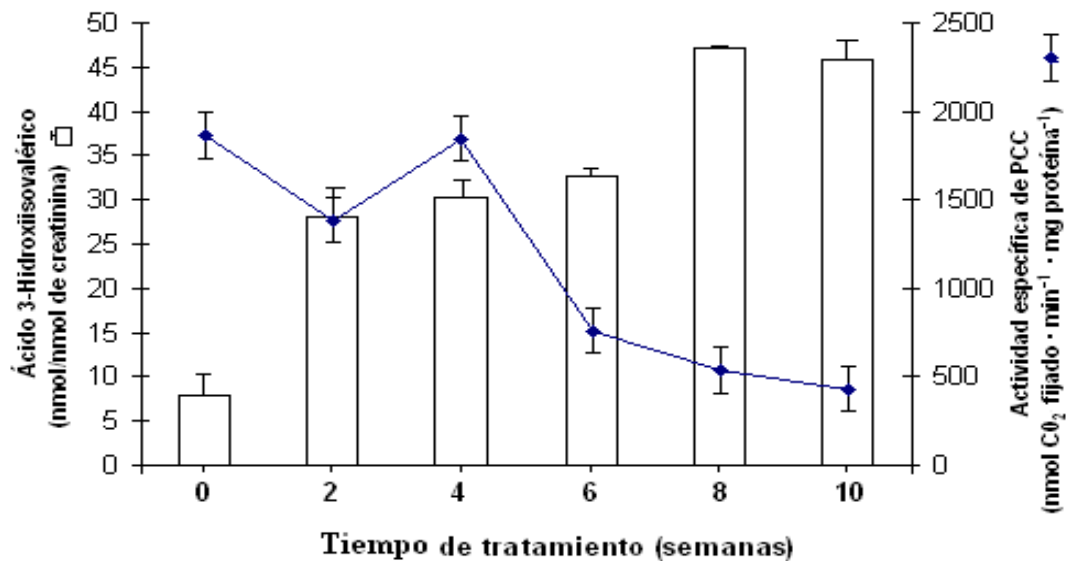


semana once, a este tiempo las ratas deficientes de biotina empiezan a morir (Fig. 8). Para los experimentos ulteriores se utilizaron ratas de seis a siete semanas de deficiencia de biotina; a este tiempo los fenómenos que se observan se deben exclusivamente a la deficiencia de biotina y no a las complicaciones mortales de este padecimiento.



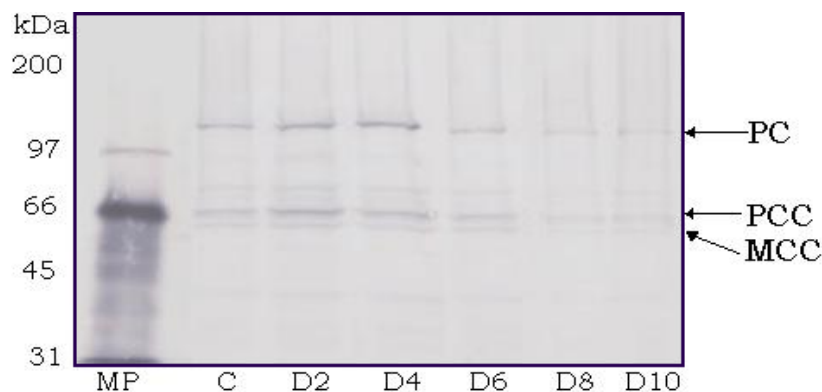
**Fig.8. Efecto de la deficiencia de biotina sobre el peso de las ratas.** El retraso en el crecimiento se aprecia a partir de la semana 5. Los valores representan la media  $\pm$  SD (n =6).

La deficiencia de biotina se demostró bioquímicamente a través de la excreción urinaria del ácido 3-hidroxiisovalérico (3-HV), marcador de deficiencia de esta vitamina. Se encontró que su excreción incrementa conforme al tiempo de tratamiento, lo que demuestra el grado de deficiencia de esta vitamina. Este metabolito se acumula debido a que la actividad de la MCC está disminuida, por ello se puede observar que el ácido 3-HV incrementa desde 8 nmoles /nmol de creatinina en la semana cero hasta 45.8 nmoles /nmol de creatinina en la semana número diez de tratamiento. Como un control del estado de deficiencia de biotina se determinó la actividad de la PCC. Las ratas con 6 semanas de tratamiento presentaron una actividad del 43.5 % respecto a las ratas control (Fig. 9), como se había reportado anteriormente (41).



**Fig. 9. Cambios en la actividad de la PCC y en la excreción del ácido 3-HV durante la deficiencia de biotina.** Las líneas representan la actividad de la propionil-CoA carboxilasa de hepatocitos deficientes, relativo a su control ( $1861.1 \pm 93.1 \text{ nmol CO}_2 \text{ fijado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ ). Barras verticales representan la excreción urinaria del ácido 3-Hidroxiisovalérico durante el período experimental. Los valores representan la media  $\pm$  SD ( $n=2$ ).

Para verificar que la disminución de la cantidad de la PC observada en hígado de ratas deficientes de biotina se reproduce en los cultivos primarios de hepatocitos, se determinó la concentración intracelular de la PC a las 2, 4, 6, 8 y 10 semanas de deficiencia de biotina. (Fig. 10). La concentración intracelular de HOLO-PC disminuyó conforme el tiempo de tratamiento, en la semana 6, la cantidad de PC disminuyó el 60 % como se había reportado (42).



**Fig. 10. Disminución de la masa de la holo-PC debido a la deficiencia de biotina.** MP, marcador de peso molecular, C, alícuota de 100  $\mu\text{g}$  de proteína total de hepatocitos control, D2, D4, D6, D8 Y D10, corresponden a muestras de 100  $\mu\text{g}$  de proteína total provenientes de hepatocitos con 2, 4, 6, 8 y 10 semanas de deficiencia de biotina.

### 6.1.2 Condiciones de cultivo

Hepatocitos obtenidos a partir de ratas deficientes de biotina se cultivaron en medio de adhesión durante 2 horas y posteriormente se incubaron en medios con diferentes concentraciones de metionina. Se observó que los hepatocitos conservan su morfología característica así como sus niveles de actividad de la LDH (Tabla 1); asimismo, la disminución de la viabilidad está dentro del intervalo reportado en este tipo celular (73). Lo anterior sugiere que los hepatocitos conservaron su viabilidad y especificidad en las condiciones empleadas durante el período de estudio.

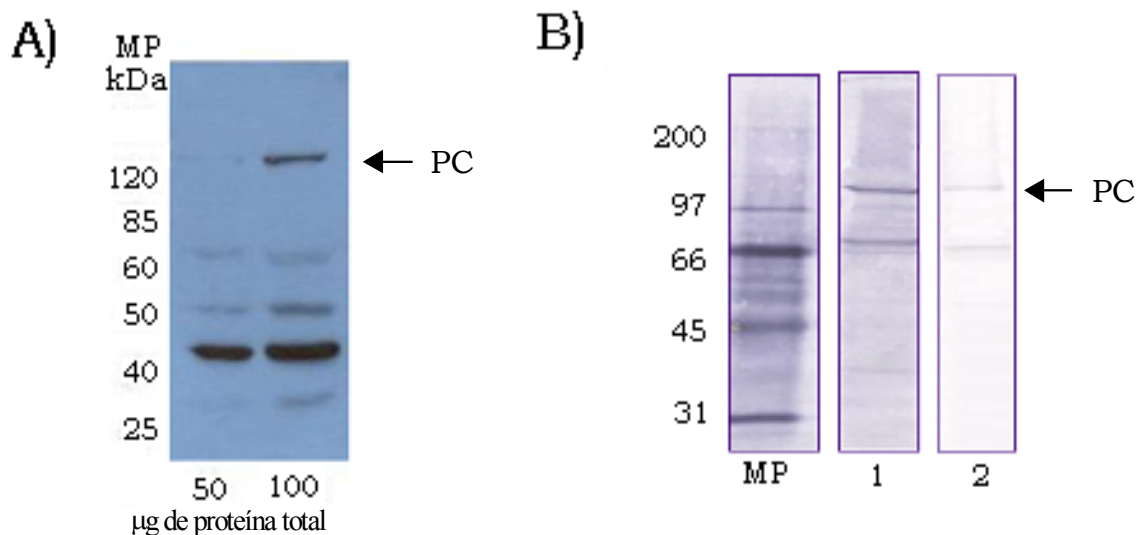
**Tabla 1. Condiciones de cultivo**

Concentración de metionina ( $\mu$ M)	Hepatocitos control		Hepatocitos deficientes de biotina	
	Viabilidad (%)*	LDH(U/ml)**	Viabilidad (%)*	LDH(U/ml)**
2	80	210	80	232
20	80	212	77	256
200	80	208	79	247

Los hepatocitos se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. (\*) Porcentaje de viabilidad durante un período de 24 h. (\*\*) Actividad de la LDH en un período de 24 h. U = Cantidad de enzima que cataliza la transformación de un  $\mu$ mol de sustrato por minuto.

### 6.1.3 Especificidad del anticuerpo anti-piruvato carboxilasa (anti-PC)

El anticuerpo utilizado en los experimentos de pulso-caza es un anticuerpo policlonal que reconoce a 4 bandas además de la PC, como se demostró por Western Blot (Fig. 11-A). La banda que se observa en quimioluminiscencia con un peso de ~130 kDa corresponde a la PC (Fig. 11-B). Por otro lado, utilizando 5  $\mu$ l del anticuerpo anti-PC para inmunoprecipitar 100  $\mu$ g de proteína total no se logró inmunoprecipitar el 100 % de la PC contenida en la muestra control no inmunoprecipitada (Fig. 11-B). Sin embargo, este experimento permite demostrar que el anticuerpo anti-PC reconoce a la PC tanto en su forma de apocarboxilasa como en la de holocarboxilasa.

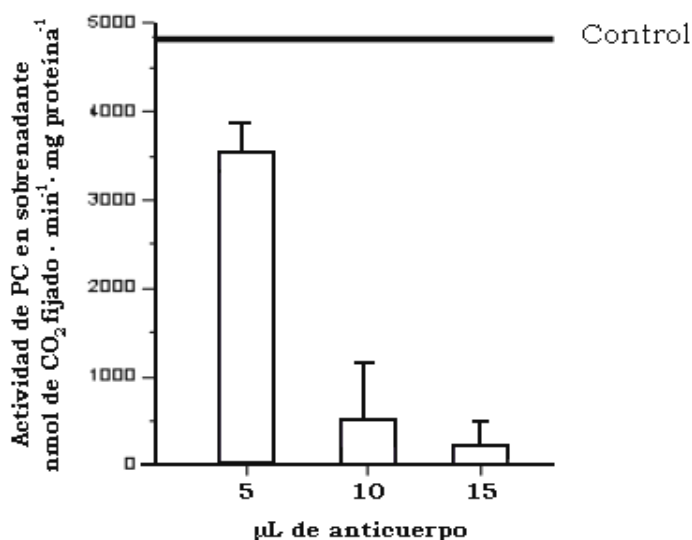


**Fig. 11. Especificidad del anticuerpo anti-PC.** A) Western Blot . Alícuotas de 50 y 100 µg de homogenado de hepatocitos fueron separadas en PAGE-SDS 10 %, transferidas a una membrana de nitrocelulosa y reveladas por quimioluminiscencia. MP, marcador de peso molecular. B) Blot de estreptavidina. MP, marcador de peso molecular biotinilado, alícuota de 100 µg sin inmunoprecipitar (1) y alícuota de 100 µg sometida a inmunoprecipitación con 5 µl del anticuerpo anti-PC (2). La flecha indica la banda correspondiente a la PC.

Para determinar la identidad de las otras bandas que reconoce el anticuerpo se realizó una búsqueda con la secuencia CYSEQDTQMHRQ que es el antígeno utilizado para producir el anticuerpo, en el genoma de rata. Los resultados indican que posiblemente se trate de la ubiquilina 1 (~62.07 kDa), calmodulina dependiente de calcio (~54.11 kDa), protocaderina 2 (~48.06 kDa) y el precursor de integrina 1 (~30.86 kDa).

#### 6.1.4 Inmunoprecipitación

Utilizando 15 µl del anticuerpo se reduce en un 95 % la actividad de la PC en el sobrenadante de la inmunoprecipitación, por lo que en los experimentos de pulso-caza se utilizarán 15 µl del anticuerpo anti-PC (Fig. 12).



**Fig. 12. Actividad de la PC en el sobrenadante de la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-PC.** Alícuotas de 100 µg de proteína total de hepatocitos control, se inmunoprecipitaron con 5, 10 y 15 µl del anticuerpo anti-PC. La actividad de PC fue determinada en 25 µl del sobrenadante de la inmunoprecipitación. La barra superior indica el valor de la muestra control no inmunoprecipitada. Los valores representan la media ± SD (n =2).

#### 6.1.5 Marcaje metabólico (Pulso-caza)

Para conocer cómo la deficiencia de biotina modifica la velocidad de síntesis y degradación de la PC hepática, se estandarizó la técnica de pulso-caza. Para ello hepatocitos controles y deficientes de biotina se incubaron durante 96 h con <sup>35</sup>S-metionina. La incorporación del isótopo se detectó a las 30 h para los hepatocitos controles mientras que en los hepatocitos provenientes de ratas deficientes de biotina se detectó a las 48 h (Fig. 13 y Fig. 14). Por ello, el tiempo de pulso utilizado para los experimentos de marcaje metabólico fue de 48 h tanto para hepatocitos deficientes de biotina como para los hepatocitos control. Durante el periodo de estudio la actividad de la LDH de hepatocitos deficientes de biotina se incrementó conforme al tiempo de tratamiento. Aunado a éste hallazgo la viabilidad celular disminuyó conforme la actividad de la LDH incrementó (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la deficiencia de biotina sobre la sobrevivencia celular

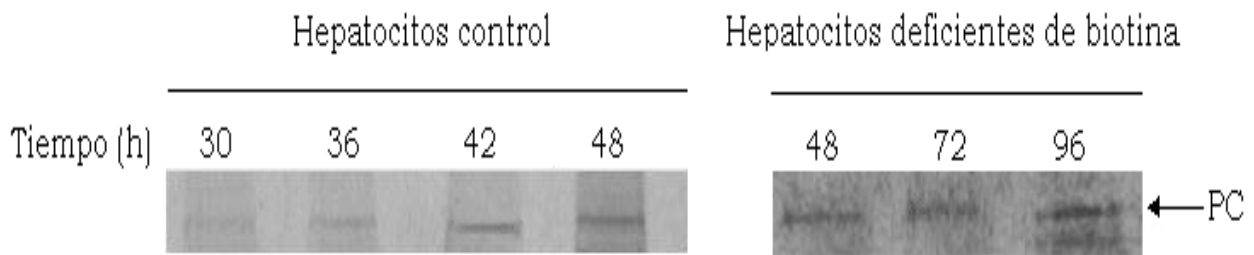
Tiempo de tratamiento (h)	Hepatocitos control		Hepatocitos deficientes de biotina	
	Viabilidad (%)	LDH(U/ml)	Viabilidad (%)	LDH(U/ml)
0	100	215	100	232
2	98	212	92	230
4	100	234	83	241
6	93	220	90	252
12	87	218	77	256
24	80	208	79	247
36	73	229	53	327
48	67	241	60	370
72	64	250	58	456
96	56	233	45	800

Los hepatocitos se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. La actividad de LDH y la viabilidad se determinaron en alícuotas de 100 µg de proteína total en los tiempos indicados en la tabla.

## 6.2 EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BIOTINA SOBRE LA VELOCIDAD DE SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE LA PIRUVATO CARBOXILASA

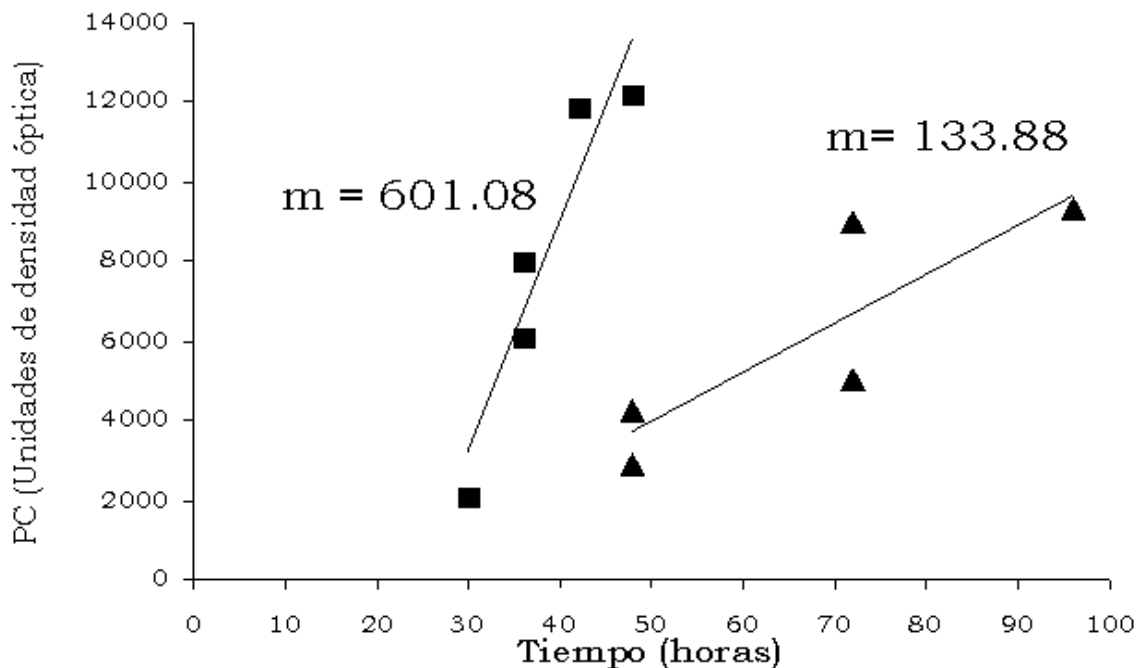
### 6.2.1 Velocidad de síntesis de la piruvato carboxilasa

La velocidad de síntesis se determinó en cultivos primarios de hepatocitos incubados con <sup>35</sup>S-metionina a las 30, 36, 42 y 48 h para los hepatocitos control y 48, 72 y 96 h para los hepatocitos deficientes de biotina (Fig. 13). El gel obtenido de la electroforesis se expuso con una placa de autorradiografía durante 2 días a -70 °C. El patrón de bandas se analizó por densitometría.



**Fig. 13. Síntesis de la PC en hepatocitos controles y deficientes de biotina.** Experimento representativo del patrón de bandas obtenido después de la incubación con  $^{35}\text{S}$ -metionina en los tiempos indicados. La incorporación se observó a las 30 h y a las 48 h para los hepatocitos controles y deficientes de biotina respectivamente.

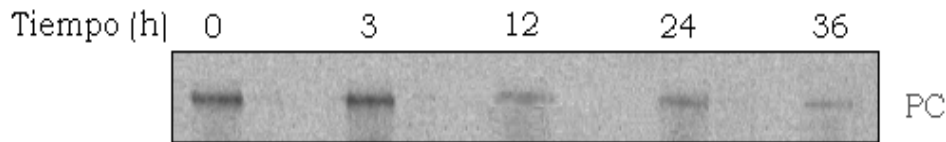
En condiciones de deficiencia de biotina la velocidad de síntesis se estimó en 133.88 PC /h a partir de la gráfica 14. Por otro lado, la velocidad de síntesis para los hepatocitos controles se estimó en 601.08 PC /h (Fig. 14). Estos resultados indican que la cantidad de PC sintetizada por los hepatocitos deficientes es 4.5 veces menor que la sintetizada por los hepatocitos controles, lo que podría explicar en parte, la disminución de su masa reportada anteriormente (42).



**Fig. 14. Velocidad de síntesis de la PC en cultivo primario de hepatocitos.** Cultivos primarios de hepatocitos control se incubaron con  $187 \mu\text{Ci}$  de  $^{35}\text{S}$ -metionina a  $37^\circ\text{C}$  durante los tiempos indicados. La incorporación de la marca en hepatocitos deficientes de biotina inició a las 48 h mientras que en hepatocitos control se detectó a las 30 h. ▲ Hepatocitos deficientes de biotina, ■ Hepatocitos control.

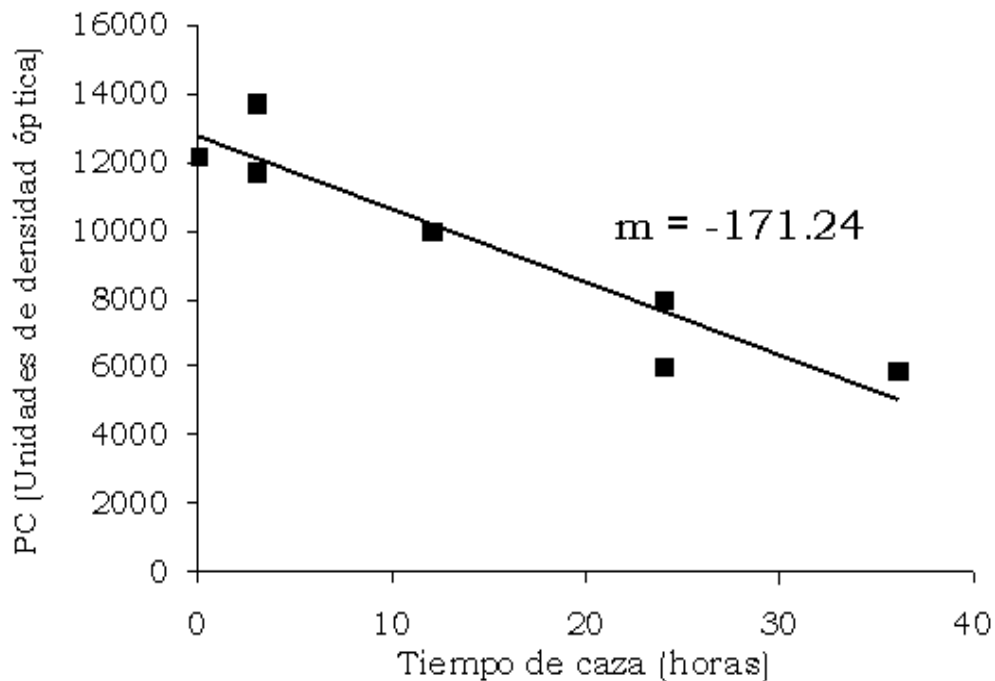
### 6.2.2 Velocidad de degradación de la piruvato carboxilasa

Para la determinación de la velocidad de degradación de la PC se consideró como tiempo cero, las 48 h. Los geles obtenidos se expusieron en una placa de autorradiografía durante 2 días a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Fig. 15). A partir del análisis densitométrico se determinó la velocidad de degradación.



**Fig. 15. Autorradiografía de las bandas correspondientes a la PC durante el período de caza en hepatocitos control.** Hepatocitos provenientes de ratas control se incubaron durante 48 h con  $187\text{ }\mu\text{Ci}$  de  $^{35}\text{S}$ -metionina a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para determinar la velocidad de degradación de la PC se adicionaron 5 ml de medio de caza conteniendo  $200\text{ }\mu\text{M}$  de metionina no radiactiva.

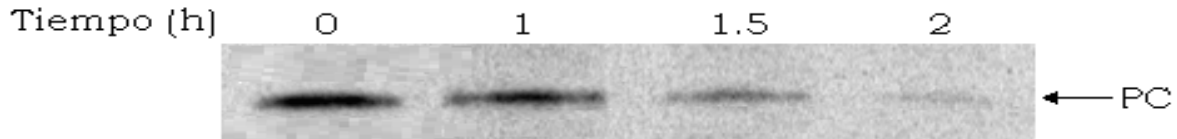
Con base en la recuperación de la  $^{35}\text{S}$ -PC a las 0, 3, 12, 24 y 36 h, la velocidad de degradación se estimó en  $171.24\text{ PC/h}$  que corresponde a una vida media de  $34.7\text{ h}$  (Fig.16), como se reportó para la línea celular 3T3-L1 (28-35 h) (73).



**Fig. 16. Velocidad de degradación de la PC en cultivo primario de hepatocitos control.** El tiempo de caza se inició adicionando 5 mL del medio conteniendo un exceso de metionina no radiactiva, los intervalos señalados en la figura representan el valor densitométrico dado por las bandas de la PC menos el valor dado por el fondo de la autorradiografía,  $n = 2$ .

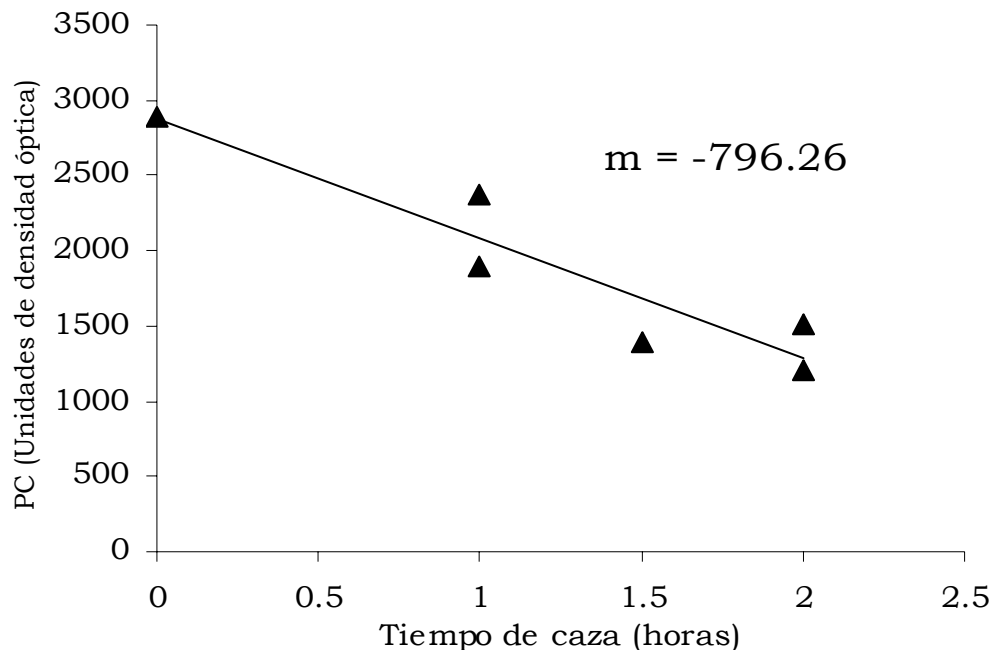


Para la determinación de la velocidad de degradación de la PC de hepatocitos deficientes de biotina se recuperó la  $^{35}\text{S}$ -PC después de 1 h, 1.5 h y 2 h. Las muestras se procesaron del mismo modo que para las muestras control. La cantidad de PC se determinó mediante análisis densitométrico (Fig. 17).



**Fig. 17. Autorradiografía de las bandas correspondientes a la PC durante el período de caza en hepatocitos deficientes de biotina.** Las muestras se colectaron a los tiempos indicados después de la incubación con 5 ml de medio de caza conteniendo 200 M de metionina no radiactiva. Las bandas obtenidas se evaluaron por densitometría y se graficaron para calcular la velocidad de degradación.

Bajo las condiciones experimentales utilizadas, la velocidad de degradación se estimó en 796.26 PC /h que corresponde a 4.6 veces más que en hepatocitos control (Fig. 18), lo que demuestra que la deficiencia de biotina incrementa la velocidad de degradación de la PC, además de disminuir su velocidad de síntesis (Fig. 14).



**Fig. 18. Velocidad de degradación de la PC en cultivo primario de hepatocitos deficientes de biotina.** Para la determinación de la velocidad de degradación de la PC. Cultivos primarios de hepatocitos se incubaron con  $^{35}\text{S}$ -metionina durante 48 h, transcurrido este tiempo se determinó el decaimiento de la radiactividad, n = 2.

## 7. DISCUSIÓN

Las carboxilasas dependientes de biotina se activan cuando se encuentran unidas covalentemente a la biotina; por lo tanto, no sorprende que en condiciones de deficiencia de biotina exista una disminución de la actividad de la PC y de otras carboxilasas dependientes de biotina (41, 42). Sin embargo, es interesante que esta disminución en la actividad se acompañe de la disminución de la concentración intracelular de proteína (masa). Este efecto no es exclusivo de hígado; también se observa en riñón, músculo esquelético y un mínimo efecto en cerebro (42).

Para determinar el mecanismo por el cual disminuye la masa de la piruvato carboxilasa hepática en condiciones de deficiencia, y basados en los reportes publicados acerca de la estabilidad conformacional que ofrecen ciertos grupos prostéticos a sus enzimas (63), determinamos la velocidad de síntesis y degradación de la PC en cultivos primarios de hepatocitos provenientes de ratas deficientes de biotina. Los resultados concuerdan con nuestra hipótesis de que la biotina le brinda estabilidad conformacional a la PC, puesto que la PC de hepatocitos deficientes de la vitamina se degrada 4.6 veces más que en el control (Fig. 16 y 18). Sin embargo, este efecto no explica completamente la disminución de la concentración de la PC en células deficientes de biotina, ya que en ellas la PC también se sintetiza a menor velocidad (4.5 veces más que en el control) (Fig. 14).

En la disminución de la síntesis de la PC probablemente estén involucrados factores transcripcionales que se apagan cuando la célula está carente de biotina. Esta hipótesis es consistente con el hecho de que, recientemente, se reportó que la biotina regula la expresión de más de 2000 genes en el humano, incluidos los genes localizados en el cromosoma 11 donde se encuentra el gen que codifica para la PC (49, 50). Del mismo modo, la deficiencia de biotina podría disminuir la expresión del gen de la PC en rata. Además de esto, se ha

reportado que en la deficiencia de biotina existe una disminución en el mRNA de la PC de rata (74). Estos resultados contrastan con nuestras observaciones iniciales sobre la ausencia de cambios en los niveles de mRNA de la PC en hígados de ratas deficientes de biotina (42). Por lo tanto, aún no existe información definitiva sobre si el aporte de biotina, además de modificar la cantidad de las carboxilasas por efectos sobre su velocidad de recambio, modifique o no sus niveles de mRNAs.

Por otro lado, el incremento en la velocidad de degradación probablemente se deba a que la apo-PC es más susceptible a la degradación que su forma holo como es el caso de la apo-ACC de *E. coli* (63). Además de esto, se ha reportado que en la deficiencia de biotina disminuye el mRNA de la HCS que es la enzima encargada de activar a la apo-PC (42). Esto ocasionaría una menor proporción de HOLO-PCs que de APO-PCs, siendo estas últimas más susceptibles a la degradación, hecho que explica el incremento en la velocidad de degradación de la APO-PC de hepatocitos deficientes de biotina.

Un hallazgo importante es el efecto de la deficiencia de biotina sobre la sobrevivencia de los hepatocitos en cultivo. En condiciones de deficiencia de biotina encontramos que la viabilidad disminuye más rápido en comparación con los hepatocitos control. Este efecto probablemente se deba a que la baja actividad y cantidad de la PC origina una alteración en la concentración de piruvato. Un exceso de piruvato puede convertirse a alanina vía transaminación, propiciando la acumulación de este aminoácido. Un exceso de alanina ocasionaría una disminución en la utilización del ácido aspártico y el ácido glutámico como fuentes de carbono para el ciclo de Krebs. Como resultado, la capacidad del ciclo para producir equivalentes para el transporte de electrones disminuye propiciando una disminución en la síntesis de ATP. Además, la baja actividad y cantidad de la PC inducidas por la deficiencia de biotina alteran el flujo de sustrato a través de LDH incrementando la

concentración de lactato, propiciando de este modo una acidosis láctica como se ha reportado en ratón (75). Esta observación nos llevó a determinar la velocidad de degradación a tiempos cortos (3 h), ya que después de las 60 h de cultivo los hepatocitos deficientes de biotina incrementan en un 96 % la actividad de la LDH ocasionando la muerte celular (Tabla 2).

## **8. CONCLUSIONES**

Nuestros resultados sugieren que la deficiencia de biotina tiene efectos similares sobre la velocidad de síntesis (4.5 veces menor que en el control) que sobre la velocidad de degradación (4.6 veces mayor que en el control). Este efecto dual que tiene la biotina sobre el recambio de la PC hepática explica la disminución de su masa y probablemente de la masa de otras carboxilasas dependientes de biotina reportada en órganos obtenidos a partir de ratas deficientes de esta vitamina así como de pacientes con deficiencia de piruvato carboxilasa (41, 42, 62). En contraste, otros padecimientos como hipertiroidismo y diabetes experimental, que inducen cambios en el contenido de la piruvato carboxilasa en ratas, están mediados por alteraciones en la velocidad de síntesis con un mínimo efecto sobre la velocidad de degradación (67, 68).

## 9. PERSPECTIVAS

Para el total entendimiento de la disminución de la PC hepática en condiciones de deficiencia de biotina habría que estudiar si la disminución del mRNA de la HCS está involucrada en este efecto, así como estudiar otros mecanismos post-transcripcionales mediados por la deficiencia de biotina que participen en la reducción de la síntesis de la enzima.

Una alternativa para confirmar los efectos de la biotina sobre la velocidad de degradación de la PC es a través de experimentos de proteólisis limitada, como se reportó para la triptofano isomerasa de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* (76). Estos estudios aportarían evidencia de la susceptibilidad de la PC de hepatocitos deficientes de biotina a la degradación proteolítica, además de comprobar nuestra hipótesis de si la biotina le brinda estabilidad estructural a la carboxilasa cuando se encuentra unida covalentemente a ella, como es el caso de la ACC de *E. coli* (63). Sin embargo, el experimento que reforzaría los resultados encontrados en esta investigación sería determinar las velocidades de síntesis y degradación de la piruvato carboxilasa en condiciones de suplementación de biotina. Esto bajo la hipótesis de que si en deficiencia disminuye la síntesis e incrementa la degradación, cuando se suplemente biotina es probable que incremente la síntesis y/o disminuya la degradación de la PC hepática.

El efecto dual que tiene la deficiencia de biotina sobre la velocidad de síntesis y de degradación de la piruvato carboxilasa ofrece la posibilidad de determinar qué factores intervienen para que se den a cabo estos eventos.

## 9. REFERENCIAS

1. Combo G. The vitamins fundamental aspects in nutrition and health. Second edition. Academia Press, Inc. San Diego, California. Págs. 9-46, 1998.
2. Brown J, Filer L, Guthrie H. Conocimientos actuales sobre nutrición. 6ª ed. ILSI, Washington, D.C. USA. págs. 54-98 1991.
3. Goodman G. Bases farmacológicas de la terapéutica. Vol. 2. 9ª ed. Madrid, McGraw-Hill-Interamericana de España. Págs. 1471-1474, 1996.
4. Vigneaud V. Growth stimulating effect of biotin for diphtheria bacillus in absence of pimélico acid. *Science* 96:183-187, 1942.
5. Ifuku O, Miyaoka H, Koga N, Kishimoto J, Haze S, Wachi Y, Kajiwara M. Origin of carbon atoms of biotin: <sup>13</sup>C-NMR studies on biotin biosynthesis in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 220:585-591, 1994.
6. Appel A, Briggs M. The Vitamins-Biotina. The foundations of Nutrition. Págs. 274-279, 1998
7. Said M. Cellular uptake of biotin: mechanisms and regulation. *J Ntr.* 129:490-493, 1999.
8. Prasad D, Wang H, Kekuda R, Fujita T, Jun F, Devae H. Cloning and functional expression of a cDNA encoding a mammalian sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin and lipoate. *J Biol Chem* 273:7501-7506, 1998.
9. Chatterjee S, Ruin A, Said M. Molecular characterization of the 5' regulatory region of rat sodium-dependent multivitamin transporter gene. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:548-555, 2001
10. Halestrap P, Price T. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343:281-299, 1999.
11. Daberkow L, White R, Cederberg A, Griffin B, Zempleni J. Monocarboxylate transporter 1 mediates biotin uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr* 133:2703-2706, 2003.
12. McMahon J. Biotin Metabolism and molecular biology. *Annu Rev Nutr* 22:221-239, 2002.
13. Attwood V, Wallace C. Chemical and catalytic mechanism of carboxyl transfer reactions in biotin-dependent enzymes. *Acc Chem Res* 35:113-120, 2002.
14. Harland G, Barden E. Biotin enzymes. *Annu Rev Biochem* 46: 385-413, 1977.
15. Donald M, Henrich L, Carnell N, Nell M. Indicators of marginal biotin deficiency and repletion in humans: validation of 3-hidroxyisovaleric acid excretion and a leucine challenge. *Am J Clin Nutr* 76:1061-1068, 2002.
16. Allred B, Roman C, Jurin R, McCune A. Mitochondrial storage forms of acetyl CoA carboxylase: Mobilization-activation accounts for increased activity of the enzyme in liver of genetically obese Zucker rats. *J Nutr* 119: 478-483, 1989.

17. Shriver J, Roman C, Allred B. Depletion and repletion of biotinyl enzymes in liver of biotin-deficient rats: evidence of a biotin storage system. *J Nutr* 123: 1140-1149, 1993.
18. Dakshinamurti K, Chahuan J. Biotin. Vitamins and hormones. 45:3338-3342, 1989.
19. Frantisek K, Darigo D, Rosenberg E. Isolation and characterization of propionyl-CoA carboxylase from normal human liver. *J Biol Chem* 255:60-65, 1980.
20. Kraus P, Kalousek F, Rosenberg E. Biosynthesis and mitochondrial processing of the  $\beta$  subunit of propionyl coenzyme A carboxylase from rat liver. *J Biol Chem* 258:7245-7248, 1983.
21. Rosenberg E, Fenton A. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. Scriver CR. Vol I. McGraw-Hill. Págs. 829-832, 2001.
22. Wallace C, Jitrapakdee S, Chapman A. Pyruvate carboxylase. *J Biochem Cell Biol* 30:1-5, 1998.
23. Dakshinamurti K, Chauhan J. Regulation of biotin enzymes. *Ann Rev Nutr* 8:211-233, 1988.
24. Lawrence S, Julisn C. Branched chain organic acidurias. Scriver CR. Vol II, 8a ed. McGraw-Hill. Págs. 1012-1027, 2001.
25. Wolf B. Disorders of biotin metabolism. Scriver CR. Vol III, 7th ed. McGraw-Hill. Págs. 3151-3177, 1995.
26. Rodríguez R. Importance of biotin metabolism. *Rev Invest Clin* 52:194-199, 2000.
27. Chapman A, Cronan E. The enzymatic biotinylation of proteins: a posttranslational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem Sci* 24:359-363, 1999.
28. Polyak W, Chapman A, Mulhern D, Cronan E, Wallace C. Mutational analysis of protein substrate presentation in the post-translational attachment of biotin to biotin domains. *J Biol Chem* 276: 3037-3045, 2001.
29. Shenoy C, Xie Y, Park L, Kumar K, Beegen H, Wood G, Samols D. The importance of methionine residues for the catalysis of the biotin enzyme, transcarboxylase: Analysis by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 267:18407-18412, 1992.
30. Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta* 255:1-11, 1996.
31. González E, Marrero N. Deficiencia de Biotinidasa. *Bioquímica*. 27:80-86, 2002.
32. Hymes J, Wolf B. Human biotinidase isn't just for recycling biotin. *J Nutr* 129:485-489, 1999.
33. Ballard D, Wolff J, Griffin B, Stanley S, Van S, Zempleni J. Biotinidase catalyzes debiotinylation of histones. *Eur J Nutr* 41:78-84, 2002.
34. Lebental E. Total parenteral nutrition: Indications, utilization, complications and pathophysiological considerations. Raven Press, pp. 91-96, 1986.
35. Rombeau L. J, Caldwell M. Parenteral nutrition. Vol. 2, pp. 123-130, 1986.



36. Kathleen M. L, Stum S. E. Krause's food, Nutrition & diet therapy. 9<sup>th</sup> edition. Saunders company, pp. 109-110, 1996.
37. Said H. M, Sharifian A, Bagherzadeh A, Mock D. Chronic ethanol feeding and acute ethanol exposure *in vitro*: effect on intestinal transport of biotin. *Am J Clin Nutr* 52:1083-1086, 1990.
38. Hay W. W, Groothuis J, Hayward R. A. Diagnóstico y tratamiento pediátricos. Manual Moderno. México, 10<sup>a</sup> ed. Pp. 827, 2001.
39. Velázquez A, Rodríguez M. R. La biotina: ¿Cenicienta de las vitaminas? *Boletín de la Sociedad Mexicana de Bioquímica*, Vol. 5, Núm. 12, 1993.
40. Velázquez A, Terán M, Baéz S. A, Gutiérrez J, Rodríguez M. R. Biotin supplementation affects lymphocyte carboxylases and plasma biotin in severe protein-energy malnutrition. *Am J Clin Ntr* 61:385-391, 1995.
41. Rodríguez R, Pérez M, Díaz A, Deolarte A, Camacho I, Cicerón I, Ibarra I, Velázquez A. Differential effects of biotin deficiency and replenishment on rat liver pyruvate and propionyl-CoA carboxylases and on their mRNAs. *Mol Gen and Met* 66:16-23, 1999.
42. Rodríguez R, Cano S, Méndez T, Velázquez A. Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J Nutr* 131:1909-1913, 2001.
43. Spence J, Koudelka A. Effect of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 259:6393-6396, 1984.
44. Chauhan J. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem*. 266:1035-1038, 1991.
45. Dakshinamurti K, Li W. Transcriptional regulation of liver phosphoenol pyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 132:127-132, 1994.
46. Collings J. Biotin-dependent expression of the asialoglycoproteins receptor in HepG2. *J Biol Chem* 263:11280-11283, 1988.
47. Maeda Y, Kawata S, Inui Y, Fukuda K, Igura T, Matuzawa Y. Biotin deficiency decreases ornithine transcarbamylase activity and mRNA in rat liver. *J Nutr* 126:61-66, 1996.
48. Solórzano S, Pacheco D, León A. Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc Natl Acad Sci* 99:5325-5323, 2000.
49. Rodríguez R, Griffin B, Zempleni J. The expression of genes encoding ribosomal subunits and eukaryotic translation initiation factor 5A depends on biotin and bisnorbiotin in HepG2 cells. *J Nutr Biochem* 17:23-30, 2005.
50. Wiedmann S, Eudy D, Zempleni J. Biotin supplementation causes increased expression of genes encoding interferon-g, interleukina-1b, and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, and causes decreased expression of the gene encoding interleukina-4 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr* 133:716-719, 2003.

51. Camporeale G, Shubert E, Sarath G, Cerny R, Zempleni J. K8 and K12 are biotinylated in human histone H4. *Eur J Biochem* 271:2257-63, 2004.
52. Sarath G, Kobza K, Rueckert B, Camporeale G, Zempleni J, Haas E. Biotinylation of human histone H3 and interactions with biotinidase. *FASEB J* 18:103-108, 2004.
53. Narang A, Dumas R, Ayer M, Gravel A. Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: A nuclear role for holocarboxylase synthetase. *Hum Mol Gen* 13:15-23, 2004.
54. Stanley S, Zempleni J. Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation. *Eur J Biochem* 268:5424-5429, 2001.
55. Rodríguez R, Schwab D, Zempleni J. Jurkat cells respond to biotin deficiency with increased nuclear translocation of NF-kB, mediating cell survival. *Int J Vitam Nutr Res* 74:209-216, 2004.
56. Ciechanover A. Proteolysis: From the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6:79-87, 2005.
57. Knox E, Mehler H. Two mechanism which increase in vivo the liver tryptophan peroxidase activity: specific enzyme adaptation and stimulation of the pituitary adrenal system. *Science* 113:237-242, 1951.
58. Lin C, Knox E. Specificity of the adaptative response to tyrosine-alpha-ketoglutarate transaminase in the rat. *J Biol Chem* 233:1186-1189, 1958.
59. Rosen F. Glucocorticosteroids and transaminase activity. Increased activity of glutamic pyruvic transaminase in four conditions associated with gluconeogenesis. *J Biol Chem* 234:476-480, 1959.
60. Conney A, Gilman A. Puromycin inhibitor of enzyme induction by 3-methylcholanthrene and Phenobarbital. *J Biol Chem* 238:3682-3685, 1963.
61. Fredland R. Metabolic adaptations in higher animals. The study of metabolic pathways by means of metabolic adaptations. *J Biol Chem* 234:1350-1354, 1959.
62. Carbone A, Robinson H. Expression and characterization of human pyruvate carboxylase variant by retroviral gene transfer. *Biochem J* 370:275-282, 2003.
63. Solbiati J, Chapman A, Cronan E. Stabilization of the biotinoyl domain of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase by interactions between the attached biotin and the protruding "thumb" structures. *J Biol Chem* 277:21604-21609, 2002.
64. Jitrapakdee S, Wallace C. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J* 340:1-16, 1999.
65. Chandler S, Ballard J. Distribution and degradation of biotin-containing carboxylases in human cell lines. *J Biochem* 232:385-393, 1985.
66. Wimhurst M, Manchester L. Some aspects of the kinetics of rat liver pyruvate carboxylase. *Biochem J* 120:79-93, 1970.
67. Weinberg B, Utter F. Effect of thyroid hormone on the turnover of rat liver pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase. *J Biol Chem* 254:9492-9499, 1979.

68. Weinberg B, Utter F. Effect to streptozotocin-induced diabetes mellitus on the turnover of rat liver pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem J* 188:601-608, 1980.
69. Freytag S, Utter F. Induction of pyruvate carboxylase apoenzima and holoenzyme in 3T3-L1 cells during differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 77:1321-1325, 1980.
70. Berry N, Friend S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cell. A biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43:506-520, 1969.
71. Bergmeyer U, Bern E, Hess B. Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press. págs. 737-740, 1963.
72. Suormala T, Wick H, Bonjour P, Regula E. Rapid differential diagnosis of carboxylase deficiencies and evaluation for biotin-responsiveness in a single blood sample. *Clin Chem Acta* 145:151-162, 1985.
73. Bonney J, Becker E, Walker R, Potter R. Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of the regulation of enzyme synthesis. *In vitro* 9:399-413, 1974.
74. Pacheco D, Solórzano S, Gravel A, Cervantes R, Velázquez A, León A. Paradoxical regulation of biotin utilization in brain and liver and implications for inherited multiple carboxylase deficiency. *J Biol Chem* 279:312-318, 2004.
75. Sparrow R, Thompson C, Woo B, Selevonchick D, Schaup H. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced alterations of pyruvate carboxylase levels and lactate dehydrogenase isoenzyme shifts in C57BL/6J male mice. *J Bio Tox* 9:329-335, 1994.
76. Reyes H, Martínez E, Mendoza G, López G, Pérez R, Gómez T, Gómez A. Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: Characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 48:580-590, 2002.

## 10. ÍNDICE DE MATERIALES Y REACTIVOS

### Krebs Ringer

REACTIVO	Concentración final (mM)
NaCl	125.4
KCl	5.10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25
MgSO <sub>4</sub>	0.72
NaHCO <sub>3</sub>	9.94-12.78

Llevar a volumen con H<sub>2</sub>O y ajustar el pH burbujeando CO<sub>2</sub>, cuando el pH sea 7.2-7.4 tomar 300 ml y adicionar CaCl<sub>2</sub> para obtener una concentración final de 0.42 mM

### Hank's sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>

REACTIVO	CONCENTRACIÓN (M)
KCl	4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.60
NaCl	80
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.90
D-Glucosa	10

### Solución de Percoll

REACTIVO	VOLUMEN (ml)
Percoll	180
Hank's/sin Ca <sup>2+</sup>	18
HEPES	2

Preparar en condiciones estériles y conservar a 4 °C

### Colágena tipo I (de cerdo) 1mg/ml

REACTIVO	VOLUMEN (ml)
Colágena (10 mg/ml)	6.96
Ácido acético 0.02 M	50

Preparar en condiciones estériles y conservar a 4 °C

### Cajas para cultivo

Cubrir las cajas para cultivo con colágena (1 mg/ml)

Recuperar y guardar el exceso de líquido

Secar en la campana de flujo laminar con luz uV durante 2 h.

Conservar en bolsa cerrada a 4 °C

### **Medio de adhesión**

Disolver 13.48 g de DMEM con glucosa (GIBCO 12800-082) que no contiene biotina, en 800 ml de agua destilada y adicionar 3 g de bicarbonato de sodio. Adicionar 5 % de suero fetal bovino dializado. Esterilizar por filtración y conservar a 4 °C.

Para los cultivos controles se adicionó biotina para obtener una concentración final de 5 nM.

### **Medio de pulso**

DMEM sin metionina ni biotina (GIBCO 21013-024) conteniendo 187 µCi de <sup>35</sup>S-metionina/ml.

Para los cultivos controles se adiciono biotina para obtener una concentración final de 5 nM.

### **Medio de caza**

Para el medio de caza se utilizó el mismo medio que para la adhesión.

### **PBS – Triton X-100**

Solución A. 10 mM de fosfato de sodio dibásico y 150 mM de cloruro de sodio, llevar a volumen (800 ml) con agua desionizada.

Solución B. 0.28 g de fosfato de sodio monobásico y 1.75 g de cloruro de sodio, llevar a volumen (200 ml) con agua desionizada.

Mezclar la solución A y B, esterilizar por filtración y conservar a 4 °C. Adicionar Triton X-100 según el porcentaje requerido. 0.5 % y 0.05 %

### **Amortiguador de lisis**

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Tris-HCl pH 8	50 mM
NaCl	120 mM
NP40	0.5 %
NaF	100 mM
NaVO <sub>5</sub>	20 µM
Aprotinina	10 µg/ml
Leupeptina	10 µg/ml
PMSF	1 mM