

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE DOSIS  
FARMACOLÓGICAS DE BIOTINA SOBRE LAS  
CARBOXILASAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JOSÉ LUIS GARCÍA HERNÁNDEZ**

**MÉXICO, D.F.**

**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.

Jurado asignado :

Presidente

Prof. Homero Hernández Montes

Vocal

Prof. Luz Del Carmen Castellanos Román

Secretario

Prof. Maria Cristina Fernández Mejía

1er. Suplente

Prof. Ignacio Camacho Arroyo

2º. Suplente

Prof. Ricardo Jasso Chávez

Esta tesis fue desarrollada en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM-INP.

---

Dra. Cristina Fernández Mejía

Directora de tesis

---

José Luis García Hernández

Sustentante

*La ciencia es la herramienta usada por el hombre  
para demostrar que Dios es la justificación  
de lo que no se comprende*

A mis padres, José Luis y Sofía, porque gracias a ustedes me he convertido en lo que soy ahora, y por la felicidad que me provoca que estén conmigo en este momento de mi vida. Ustedes junto con Normita, son mi inspiración y más que mi motivo, son la fuerza que me hace seguir siempre adelante. Este pequeño logro no es solo mío, es de nosotros.

A mis abues, María y Pedro, Josefina y Rafael, porque Dios me dio la oportunidad de conocerlos y de aprender de ustedes.

A mi tía Ángela Hernández por su ejemplo de valor hacia la vida, por ser como mi segunda madre y por su apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por haberme dado la vida y por permitirme llegar hasta este momento.

A mis padres por su apoyo incondicional y constante, su motivación, sus consejos y por el ejemplo de nobleza y perseverancia que los caracteriza.

A la Dra. Angelina Quintero Ruiz<sup>†</sup>, por ser un ejemplo de vida y por llevarme de la mano en ese mundo tan genial como es la Bioquímica.

A la Dra. Cristina Fernández Mejía por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por su paciencia, por su confianza y por todo el apoyo recibido para realizar este proyecto y verlo realizado.

A Nayeli, por todos los momentos que hemos compartido juntos, por ser parte de mi vida y mi más grande amor.

A Zazil Olivares y Sara Méndez, por todos sus consejos, críticas y comentarios, por dejarme aprender de ustedes y por su grandiosa amistad.

A Saúl Cano por la ayuda para la estandarización de las técnicas usadas en esta tesis.

A Gretel por su apoyo, por sus consejos, por su sinceridad y por que durante todos estos años siempre has estado conmigo.

A Claudia por lo enriquecedor de todas nuestras pláticas, por ser una de mis mejores amigas, por tener siempre las palabras perfectas y por estar siempre ahí, en las buenas y en las malas.

A Ivette por su apoyo y por saber escucharme y darme siempre el mejor consejo.

A Pedro, creo que si Dios me hubiera dado otro hermano, ese serías tú.

A Ángel por su forma de vivir y su actitud frente a la vida, por todos sus consejos, por saber escuchar y saber ser un gran amigo.

A mis amigos de la Facultad, Israel, Dulce, Susana, Ivan, Liliana, Francisco, Érika, Aldo, Diana, Margarita, Belem, Luis, Edgar, Batis, Cristian, Gabriel, Griselda y Amilcar; junto a quienes empecé este camino y estuvieron ahí para compartir una gran cantidad de alegrías y una que otra tristeza.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Guillermo, Alonso, Alberto, Teresita, Ángeles, Paz y Elena por su ayuda para realizar este trabajo, sus consejos, por su amistad, y por hacer un gusto el trabajar en la Unidad de Genética de la Nutrición.

Al Dr. Javier Cabiedes por su apoyo y las facilidades para poder concluir este trabajo.

A la H. Facultad de Química, mi segundo hogar, por todas las experiencias que pude vivir dentro y fuera de sus aulas.

# I. INDICE

## 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las vitaminas	1
1.2 Biotina	
1.2.1 Historia	5
1.2.2 Química de la biotina	6
1.2.3 Metabolismo de la biotina	7
1.2.4 La biotina como cofactor de las carboxilasas	9
1.2.5 La biotina como regulador de la expresión génica	12
1.2.6 La biotina como agente terapéutico	15
1.2.7 Deficiencia de biotina	16
1.2.8 Carboxilasas dependientes de biotina	18
1.3 Piruvato Carboxilasa	
1.3.1 Función	20
1.3.2 Mecanismo de reacción	21
1.3.3 Estructura	22
1.3.4 Síntesis y degradación	23
1.3.5 Regulación alostérica	24
1.3.6 Deficiencia	24
1.4 Propionil-CoA Carboxilasa	
1.4.1 Mecanismo de reacción	26
1.4.2 Estructura	27
1.4.3 Deficiencia	27
1.5 Acetil-CoA Carboxilasa	
1.5.1 Mecanismo de reacción	28
1.5.2 Estructura	29
1.5.3 Deficiencia	29



1.6 $\beta$ -Metilcrotonil-CoA Carboxilasa	
1.6.1 Mecanismo de reacción	30
1.6.2 Estructura	31
1.6.3 Deficiencia	31
1.7 Integración del metabolismo de las carboxilasas dependientes de biotina	32
2. ANTECEDENTES DEL PROYECTO DE TESIS	33
3. MARCO TEÓRICO	34
4. HIPÓTESIS	36
5. OBJETIVO	36
6. METODOLOGÍA	
6.1 Modelo animal	37
6.2 Obtención de órganos	37
6.3 Preparación de los homogeneizados	37
6.4 Cuantificación de la proteína	38
6.5 Actividad de las carboxilasas	38
6.6 Determinación de la masa biotinilada de PC y PCC por Western Blot de proteínas biotiniladas	41
6.6.1 Preparación de las muestras	42
6.6.2 Cargado de las muestras	42
6.6.3 Transferencia	43
6.6.4 Bloqueo y revelado	44
6.7 Análisis estadístico	45
7. RESULTADOS	
7.1 Actividad específica	46
7.2 Masa biotinilada	51
8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
9. PERSPECTIVAS	58
10. CONCLUSIÓN	59
11. BIBLIOGRAFÍA	60
12. APÉNDICE	67

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 LAS VITAMINAS

Los alimentos son la fuente de aproximadamente cuarenta nutrimentos para el hombre. Éstos nutrimentos se dividen clásicamente en productores de energía (hidratos de carbono, grasas y proteínas), fuentes de aminoácidos esenciales y no esenciales (proteínas), ácidos grasos insaturados esenciales (grasas), minerales (incluyendo los que aparecen en trazas) y vitaminas (compuestos orgánicos solubles en agua y en grasas) (Shils y Young, 1988)

Hace siglos los médicos describían muchas de las enfermedades que ahora reconocemos como deficiencias vitamínicas, principalmente la ceguera nocturna (deficiencia de vitamina A), el beriberi (deficiencia de tiamina), la pelagra (deficiencia de niacina), el escorbuto (deficiencia de ácido ascórbico) y el raquitismo (deficiencia de vitamina D).

Mucho antes de la era de las vitaminas, se consideraba que había factores en la dieta implicados en todas estas enfermedades. Sin embargo, la identificación final del factor activo de la dieta, requería de la reproducción de la enfermedad en un animal de experimentación, alimentado de una manera similar a la que se suponía causaba la enfermedad en el hombre, seguido por la prevención o la cura de la enfermedad por la adición de ciertos alimentos o extractos de alimentos a la dieta experimental. Por ejemplo: el beriberi, una forma de polineuritis aparecía en poblaciones que ingerían arroz sin cáscara (refinado). En 1897 Eijkman demostró que aves de corral alimentadas con arroz refinado desarrollaban una polineuritis semejante al beriberi, el cual se curaba cuando se agregaban las cáscaras o un extracto de las cáscaras a la dieta de las aves. Este modelo animal permitió que en 1911, Funk aislara la sustancia antiberiberi que él creía era una *amina*. Dado que era *vital* llamó a la sustancia *vitamina* y sugirió que el escorbuto, la pelagra y probablemente el raquitismo se debían a la carencia en la dieta de sustancias orgánicas similares. Se mantuvo el nombre de vitaminas, aunque posteriormente se descubrió que este tipo de factores de la dieta no son necesariamente aminas y tienen estructuras muy diferentes (Combo, 1998).

Para 1915 se conocían ya las vitaminas liposolubles, denominadas A, y las vitaminas hidrosolubles, denominadas B. Rápidamente se esclareció que tanto las vitaminas liposolubles como las hidrosolubles están formadas por varios componentes activos. Se mostró que las grasas contenían un factor (vitamina D) que evitaba el raquitismo y podía distinguirse de la vitamina A, factor de crecimiento de las ratas,. Trabajos ulteriores habían identificado otros factores liposolubles (las vitaminas E y K), como componentes esenciales de la dieta El factor antiescorbuto, hidrosoluble, que se descubriera más tarde, fue llamado vitamina C (Combo, 1998).

La fracción B hidrosoluble también mostró estar integrada por varios componentes necesarios para el hombre, como tiamina o riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico y cianocobalamina. Originalmente fueron agrupadas porque podían extraerse en grandes cantidades de ciertos alimentos, notablemente de hígado y de las levaduras. Cuando los constituyentes activos pudieron reconocerse de manera separada en el factor b, recibieron los nombres de vitamina B1, B2 y así sucesivamente, actualmente éstas denominaciones han sido reemplazadas por el nombre químico de cada sustancia. Los miembros del complejo de la vitamina B son notablemente distintos en estructura química y también difieren en función. Sin embargo siguieron clasificándose juntos por la similitud de los alimentos donde se encuentran y la tendencia consecuente de las enfermedades carenciales, que dependen de la ingesta inadecuada de más de un miembro de este grupo (Combo, 1998).

Aunque las vitaminas individuales varían ampliamente en estructura y función, pueden aplicarse algunas afirmaciones generales. Las vitaminas hidrosolubles se almacenan sólo en cantidades limitadas y es necesario el consumo frecuente para mantener saturados los tejidos. Las vitaminas liposolubles pueden almacenarse en cantidades masivas y esta propiedad les confiere un potencial para ser gravemente tóxicas. Al ser consumidas, muchas vitaminas no son activas biológicamente y requieren de un procesamiento *in vivo*. En el caso de varias vitaminas hidrosolubles, la activación incluye la fosforilación (tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina) y puede requerir del acoplamiento a nucleótidos de purina o pirimidina (riboflavina, niacina). En sus principales funciones conocidas, las vitaminas hidrosolubles participan como cofactores

de enzimas específicas, mientras que al menos dos vitaminas liposolubles, la A y la D, se comportan de manera semejante a las hormonas e interactúan con receptores intracelulares específicos en sus tejidos diana.

Así por definición, las vitaminas son un grupo de sustancias de diversa composición química, se denominan como sustancias orgánicas que deben ser provistas en pequeñas cantidades desde el ambiente porque no pueden ser sintetizadas de novo en el hombre, o bien, su velocidad de síntesis es insuficiente para el mantenimiento de la salud (por ejemplo, la producción de niacina a partir del triptofano). En la mayoría de los casos, la fuente ambiental es la dieta, aunque una excepción a esta regla es la síntesis endógena de la vitamina D, bajo la luz ultravioleta. Esta definición diferencia a las vitaminas de los minerales esenciales, que son nutrimentos inorgánicos necesarios en cantidades pequeñas. Excluye también a los aminoácidos esenciales, que son sustancias orgánicas necesarias, preformadas en la dieta en cantidades mucho mayores.

El vocablo vitamina se refiere sólo a sustancias orgánicas necesarias para la nutrición de los mamíferos; las sustancias requeridas sólo por microorganismos y células en cultivo se definen como factores de crecimiento (Combo, 1998)

En muchos países en todo el mundo, comités científicos evalúan periódicamente la evidencia acerca de las necesidades de nutrimentos individuales para la población, recomendando cantidades necesarias de consumo en la dieta para asegurar la salud de cada individuo (Combo, 1998)

Estas cantidades se establecen en niveles lo suficientemente altos para cubrir las necesidades de casi todos los individuos para cada edad y categoría sexual. El consumo de las cantidades recomendadas hace improbable que ocurra una deficiencia vitamínica en la población, y el consumo por debajo de las cantidades recomendadas no necesariamente provocará una deficiencia, pero el riesgo de que suceda está en función de cuanto se aleje el consumo de la cantidad recomendada. Sin embargo, se reconoce que muchas personas ingieren suplementos vitamínicos, aunque la autosuplementación no ha demostrado beneficios, por lo que la Asociación Médica Americana ha recomendado que la ingesta diaria de vitaminas en personas saludables

no exceda el 150% de las cantidades recomendadas para ninguna vitamina (Council on Scientific Affairs, 1987)

## 1.2 BIOTINA

### 1.2.1 Historia

En 1901, el microbiólogo belga E. Wilder observó que las levaduras no sólo requerían de sales y glucosa para crecer, sino también un factor indispensable proveniente del mosto de cerveza, a este factor se le denominó “bios” y se dieron inicios para su aislamiento. En los siguientes 30 años se encontró que “bios” era la mezcla de varios compuestos; el primero bios I, fue identificado como mesoinositol; posteriormente se aisló bios IIA identificado como el ácido pantoténico. Finalmente el bios IIB, el tercer componente de la mezcla, fue aislado y cristalizado por Kögl y Tonnis en 1936 a partir de yema de huevo, extracto de levadura y una preparación de hígado; a este último compuesto, también llamado desde las primeras observaciones factor de crecimiento de levaduras, se le llamó biotina (Moss y Lane, 1971)

Boas fue el primero en demostrar la necesidad de biotina en mamíferos a partir de la observación de ratas alimentadas con clara de huevo. En 1916, Bateman observó que las ratas alimentadas con una dieta con clara de huevo cruda como única fuente de proteína desarrollaban un síndrome caracterizado por enfermedades neuromusculares, dermatitis grave y pérdida de pelo (alopecia). El síndrome podía evitarse cocinando la proteína o administrando levadura, hígado o extracto de ellos; a dicho efecto se le denominó mal de las claras de huevo (Moss y Lane, 1971)

En 1940, Snell descubrió una glicoproteína tetramérica de 67 kDa presente en la clara de huevo, que presenta en su superficie regiones hidrofóbicas, que le permiten unir con gran afinidad y de forma irreversible a la biotina. Esta glicoproteína fue llamada avidina (Goodman, 1996). La avidina fue aislada por primera vez por Eakin y cols. en 1941. La constante de afinidad entre avidina y biotina es de  $10^{-15}$  M, y sus propiedades se utilizan en una gran variedad de técnicas en biología molecular (Mock, 1996; Goodman, 1996)

### 1.2.2 Química de la biotina

La estructura de la biotina fue definida por Du Vigneaud y cols., en 1942; Harris, un año después, confirmó su estructura mediante experimentos de síntesis total y análisis de rayos X (Moss y Lane, 1971). A partir de esos estudios se demostró que la biotina es el *ácido hexanidro-2-oxo-1H-tieno[3,4-d]imidazol.4-pentanoico*, un ácido monocarboxílico, estable al calor, soluble en agua (0.02% p/v) y etanol (0.08% p/v) y susceptible a la oxidación (Dakshinamurti y Chauhan, 1988).

La biotina tiene un peso molecular de 244.31 g/mol y su punto de fusión es de 232-233°C; la molécula contiene tres carbonos asimétricos en su estructura, por lo que existen ocho estereoisómeros de los cuales solo uno, conocido como d-(+)-biotina o simplemente biotina, se encuentra en la naturaleza y es activo enzimáticamente (Merk, 1996).

La biotina es un compuesto bicíclico, uno de los anillos contiene un grupo ureido (-N-CO-N-), y el otro anillo contiene un átomo de azufre (denominado anillo tetrahidrotiofano) y una cadena de ácido valérico (Mock, 1996).(Fig 1)

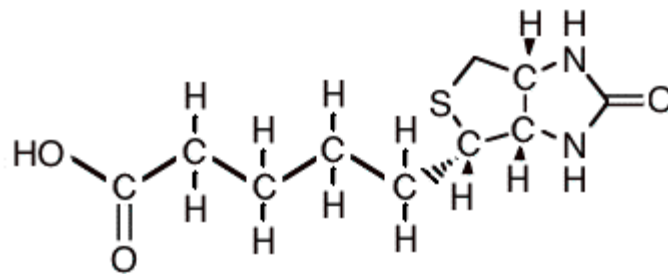


Figura 1. Estructura molecular de la biotina

No se ha reportado toxicidad de la biotina hacia el hombre, a pesar de la administración de 5 a 10 mg diarios durante periodos de hasta 6 meses (Appel y Briggs 1988).

### 1.2.3 Metabolismo de la biotina

La biotina se encuentra en una gran variedad de alimentos, algunos de ellos son: hígado, riñón (100 µg/100 g); la yema de huevo (52 µg/100 g); soya, cacahuates, avellanas, coliflor, hongos, lentejas y nueces (29 a 100 µg/100 g); carne de pollo (11 µg/100 g); cereales enteros cocidos como maíz, sorgo, cebada y avena (7 a 30 µg/100 g); plátano toronja y sandía (2-4 µg/100 g); la leche y el pescado (23 y 60 /100 g. La biotina puede ser sintetizada por bacterias que habitan el tracto gastrointestinal de los seres humanos y otras especies de animales, donde una parte puede ser absorbida (Appel y Briggs 1988). El requerimiento diario de biotina en los adultos se ha fijado en un valor provisional de 30 a 100 µg, por parte del Committee on Dietary Allowances. La dieta norteamericana en promedio provee entre 100 y 300 µg de la vitamina.(Mock, 1996).

La biodisponibilidad de la biotina varía sustancialmente dependiendo de cada alimento, en general es menor al 50%, aunque en algunos alimentos puede llegar hasta el 100%, esto refleja una susceptibilidad diferencial que depende de la digestión, sin embargo los factores que controlan la disponibilidad de la biotina han sido poco estudiados. En los alimentos la biotina se encuentra en tanto en forma libre como unida covalentemente a proteína, específicamente a un residuo de lisina (*biocitina*) (Dakshinamurti y Chauhan, 1994). Para su absorción se requiere romper el enlace formado por la biotina y las proteínas por acción de la enzima biotinidasa (Hymes y cols., 1996). La biotina libre se absorbe rápidamente por los enterocitos de la porción distal del duodeno y proximal del yeyuno, y posteriormente pasa al torrente sanguíneo. La entrada a las células se lleva a cabo a través de un transportador múltiple de vitaminas dependiente del sodio (SMVT) que reconoce principalmente la porción del ácido valérico de la biotina (Cohen y cols., 1982; Chatterjee y cols., 1999). El SMVT es una proteína transmembranal de 69 kDa que funciona como simportador electrogénico, con un amplio rango de sustratos. Transporta biotina, ácido lipoico y ácido pantoténico junto con el sodio, con una estequiometría de 2:1 sodio-sustrato, es decir, por cada molécula de vitamina que entra a la célula, dos iones de sodio son cotransportados al interior de la misma (Prasad y cols., 1999; Wang y cols., 1999).



La afinidad del SMVT para el ácido pantoténico y ácido lipoico es de 1~4.9  $\mu\text{M}$  y de 1.6~5  $\mu\text{M}$  respectivamente, mientras que para la biotina es de 3~20  $\mu\text{M}$  (Wang y cols., 1999; y Prasad y cols., 1999, 2000). Aunque hay una baja afinidad del SMVT por la biotina, recientemente se ha demostrado que es el responsable del transporte de esta vitamina en hígado e intestino (Grafe y cols., 2003).

Existen estudios que aportan evidencia de que la biotina puede ser transportada por más de un acarreador. Zemleni y cols.. demostraron la existencia de un transporte de biotina de alta afinidad en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La  $K_m$  estimada para este transportador es de 2.6 nM, valor cercano a los niveles de biotina reportados en plasma de individuos sanos. Otros sistemas semejantes de transporte de biotina de alta afinidad han sido reportados en queratinocitos y astrocitos. (Grafe y cols., 2003)

#### 1.2.4 La biotina como cofactor de las carboxilasas.

Las enzimas carboxilasas son sintetizadas como apocarboxilasas, carentes de actividad enzimática. Cada enzima es activa sólo cuando se encuentra unida covalentemente a la biotina y entonces es llamada holocarboxilasa.

La biotina es unida a un grupo ( $\epsilon$ )-amino de un residuo de lisina de la carboxilasa en su sitio activo, lo que se conoce como biotinilación, esta reacción es catalizada por la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS) que une covalentemente la biotina al residuo lisina de la carboxilasa en su sitio activo. Esta modificación post-transduccional es altamente específica para proteínas aceptoras de biotina.

La biotinilación de las apocarboxilasas requiere la activación de biotina por ATP, lo que resulta en la formación de un intermediario llamado *biotinil-adenilato* (Wallace y Jitrapakdee, 2003). Este compuesto es esencial en la acción de la biotina tanto en su función de cofactor como en su función sobre la expresión de genes.

El grupo biotinilo es transferido a la apoenzima para formar la carboxilasa activa. Estas dos reacciones parciales son catalizadas por la HCS (Achuta y cols., 1977).

Como todas las proteínas, las carboxilasas tienen una vida media y requieren de recambio. En el proceso de recambio proteico, las proteínas con biotina son catabolizadas hasta péptidos pequeños y aminoácidos, entre los que se encuentra la biotinil-lisina, también conocida como *biocitina* (Weiner y cols., 1985; León-Del Río y cols. 1990). La biotina es liberada de la *biocitina* por la acción de la enzima *biotinidasa*, la cual corta específicamente la unión del péptido entre la biotina y el grupo ( $\epsilon$ )-amino del residuo de lisina quedando disponible nuevamente para ser utilizada (Fig. 2). A partir de este ciclo de recambio de biotina, los mamíferos han desarrollado una forma eficiente para asegurar un suplemento y utilización adecuados de la biotina.

En estudios recientes se ha sugerido que las enzimas que participan en el recambio de biotina: la biotinidasa y la HCS, pueden tener otras funciones además de participar en el reciclamiento de la biotina, se ha demostrado que la biotinidasa participa en el transporte de la biotina y que la HCS y la biotinidasa están localizadas tanto en citoplasma como en núcleo. En este organelo intervienen en la biotinilación de histonas;

estas modificaciones parecen tener un papel importante en el ciclo y proliferación celular (Hymes y cols., 1995, 1996).

La biotina aparece en la orina predominantemente en la forma de biotina intacta y en cantidades menores como los metabolitos *bis*-norbiotina y sulfóxido de biotina. Los mamíferos son incapaces de degradar el sistema bicíclico de la biotina (Goodman, 1996)

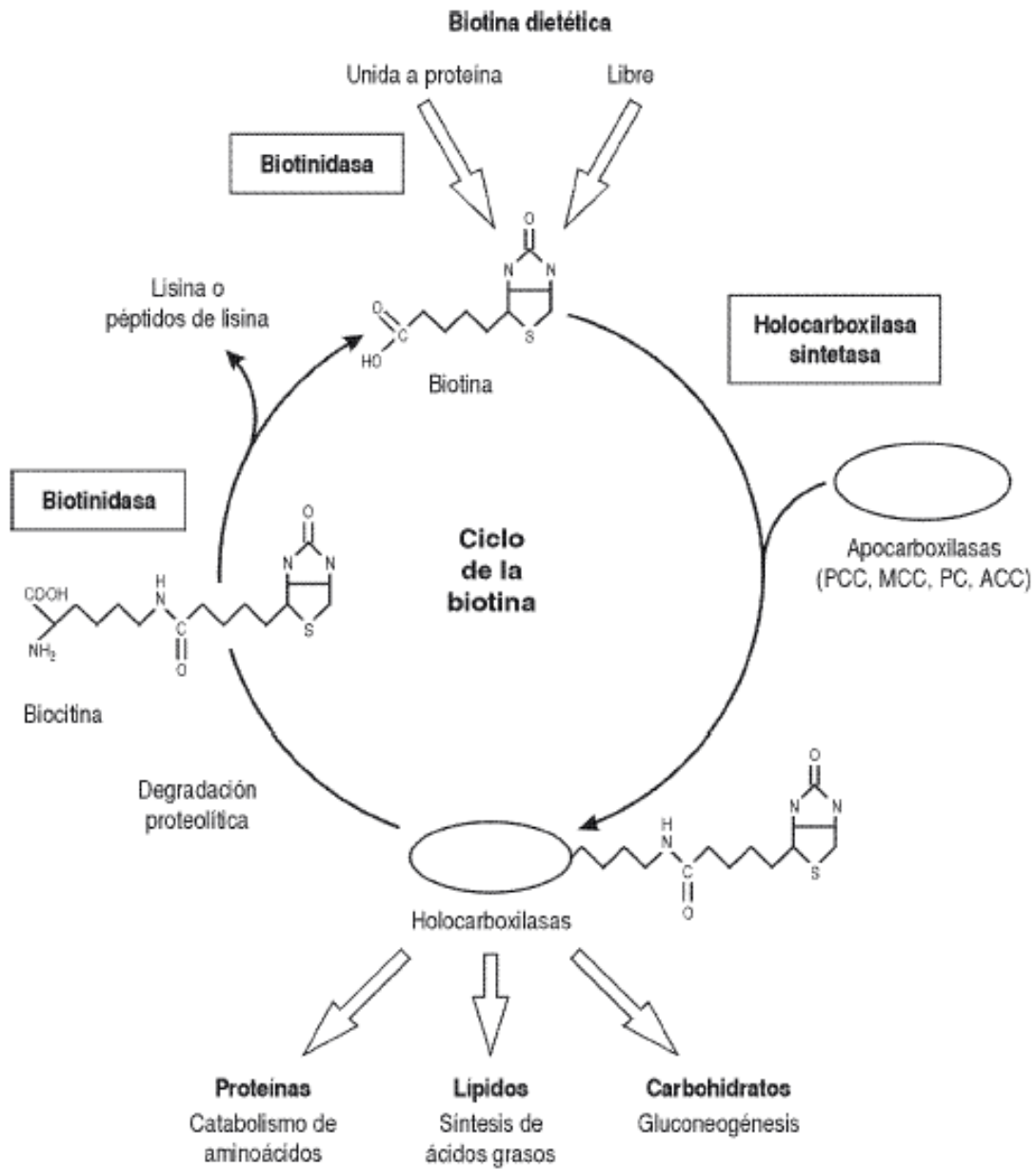


Figura 2. Ciclo de la biotina (Rodríguez-Melendez 2000).

### 1.2.5 La biotina como regulador de la expresión genética

En la actualidad se ha establecido que, además de su función clásica como grupo prostético, la biotina modifica la expresión genética, tanto a nivel de la transcripción como de la traducción. Este efecto es análogo al de otras vitaminas que, aparte de sus funciones como sustratos y cofactores, regulan la expresión genética. Los ejemplos mejor estudiados son los de las vitaminas A y D, que actúan como ligandos de receptores nucleares de la superfamilia de receptores hormonales y, de esta manera, afectan diversas funciones como la morfogénesis, inmunidad, diferenciación y metabolismo (Balmer, 2002).

La biotina participa en la regulación de la transcripción de diversos genes. Esto se ha demostrado tanto para las enzimas que requieren de la vitamina como grupo prostético y sustrato, como son la holocarboxilasa sintetasa (HCS) (Rodríguez-Melendez y cols., 2001; Solorzano-Vargas y cols., 2002); la acetil Coenzima A carboxilasa 1 (ACC1); la propionil Coenzima A carboxilasa A (PCCA) (Solorzano-Vargas y cols., 2002); como para proteínas que no la requieren como cofactor; entre estas últimas se han identificado a la glucocinasa hepática (Chauhan y cols., 1991), la fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática (Dakshinamurti y cols., 1994), la glucocinasa pancreática (Borboni y cols., 1996; Romero-Navarro y cols., 1999); la insulina (Romero-Navarro y cols., 1999; Yoshikawa y cols., 2002); el factor transcripcional PDX-1 (Yoshikawa y cols., 2002), la interleucina 2 y el receptor de interleucina 2 (Manthey y cols., 2002; Rodríguez-Melendez y cols., 2003) y los factores transcripcionales NF- $\kappa$ B, N-myc, c-myc, N-ras y raf (Rodríguez-Meléndez y cols., 2003; Scheerger y cols., 2003).

La acción de la biotina sobre la expresión genética parece ser muy amplia: en un estudio de microarreglos en células mononucleadas de sangre periférica humana, se encontró que la biotina afecta positivamente la expresión de 139 genes, mientras que disminuye la de otros 131 (Wiedmann y cols., 2004).

En los últimos años han comenzado a delinearse los mecanismos moleculares a través de los cuales la biotina modifica la expresión de genes. Se han identificado diferentes vías, no necesariamente excluyentes, que podrían participar en la acción genética de la vitamina: la activación de la guanilato ciclasa soluble y la biotinilación de histonas.

Estudios pioneros de Vesely en 1982 descubrieron que la adición de biotina a extractos celulares aumentaba la actividad de la guanilato ciclasa soluble.(Vesely, 1982). Posteriormente Spence y Koudelka, encontraron que el aumento producido por la biotina en la actividad de la glucocinasa hepática estaba precedido por un incremento en las concentraciones intracelulares de GMPc (Spence y Koudelka 1984), lo que sugería que la biotina ejercía su efecto génico a través de este segundo mensajero. A partir de entonces, diversos estudios han identificado que un denominador común en el efecto de la biotina sobre la expresión genética involucra el incremento en la actividad de la guanilato ciclasa soluble (GCs), la elevación de las concentraciones de guanosil monofosfato cíclico (GMPc) intracelular, y la participación de la proteína cinasa G (PKG) (Chauhan y cols., 1991; De la Vega, 2000 ;Solorzano-Vargas y cols., 2002).

Se ha propuesto que el compuesto biotinil-AMP es el vínculo en la cascada de fosforilaciones involucradas en la regulación de la expresión genética por la biotina. Este compuesto es formado por la holocarboxilasa sintetasa en la primera etapa de su acción catalítica (Solorzano-Vargas y cols., 2002). Estos investigadores encontraron que la regulación de la expresión de la acetil-CoA carboxilasa 1, la propionil-CoA carboxilasa y de la propia holocarboxilasa sintetasa requiere de la actividad enzimática de la holocarboxilasa sintetasa. Con base en sus resultados proponen que el biotinil-AMP, por un mecanismo aún desconocido, activa la guanilato ciclasa soluble, y que, de esta manera, se incrementa el contenido de GMPc, que a su vez activa a la PKG, favoreciendo así una serie de fosforilaciones que modifican la expresión de los genes (Solorzano-Vargas y cols., 2002)

Otro mecanismo molecular que podría estar involucrado en el efecto de la vitamina sobre la expresión genética es la biotinilación de histonas. Diversas observaciones en la décadas de los 60 y 70 sugerían acciones nucleares de la biotina: la presencia de biotina en el núcleo (Dakshinamurti y cols., 1963), las alteraciones en animales deficientes de biotina en la fosforilación, metilación y acetilación de las histonas, y en la asociación de estas últimas con el DNA indicaban un posible efecto de la vitamina sobre la cromatina (Petrelli y cols., 1978). Posteriormente, estudios in vitro demostraron

que las histonas son susceptibles a ser biotiniladas, lo que otorgaba una explicación a la presencia de biotina en el núcleo y a la relación entre biotina e histonas (Hymes y cols., 1995). En años recientes se ha encontrado que, efectivamente, las histonas en las células se encuentran biotiniladas) y se ha propuesto que esta modificación covalente, similar a modificaciones covalentes como la metilación y/o acetilación de las histonas, podrían ser parte de los mecanismos a través de los cuales la biotina modifica la expresión genética (Crisp y cols. 2004; Stanley y cols., 2001; Peters y cols. 2002). La presencia en el núcleo de dos enzimas claves en el metabolismo de la biotina, la biotinidasa y la holocarboxilasa sintetasa (Hymes y cols., 1999; Stanley y cols., 2001), así como su demostrada capacidad de biotinilar histonas, apoyan igualmente esta hipótesis. Recientemente se encontró que la holocarboxilasa sintetasa está asociada con la cromatina y la lámina nuclear, y que durante la mitosis se encuentra distribuida en estructuras en forma de anillo. Además, los fibroblastos de pacientes con deficiencia en la enzima presentan menos histonas biotiniladas que los fibroblastos de individuos no deficientes (Narang y cols., 2004). Entre las funciones relacionadas con la biotinilación de histonas se encuentran el incremento en la abundancia de éstas durante la proliferación celular de linfocitos polimorfonucleares (Zempleni y cols., 2001), los cambios en la biotinilación de histonas durante el ciclo celular (Stanley y cols., 2001) y el incremento en la biotinilación de histonas producidas por daño al DNA causado por luz ultravioleta (Peters y cols. 2002). Estas funciones sugieren que la biotinilación de histonas podría estar ligada a la reparación y/ o replicación del DNA.

### 1.2.6 La biotina como agente terapéutico

Existen investigaciones que han encontrado que dosis farmacológicas de biotina pueden ser usadas terapéuticamente en el tratamiento de diversas afecciones como la diabetes mellitus, y la hipertrigliceridemia (Fernández-Mejía, 2005): Se ha reportado que la administración de dosis farmacológicas de biotina entre 2 y 16 miligramos al día disminuyen la hiperglucemia y la hipertrigliceridemia en humanos: Pacientes con diabetes tipo 1 tratados durante una semana con biotina (16 miligramos al día), disminuyeron sus concentraciones de glucosa en ayuno (Coggeshal y cols., 1985). En un estudio en pacientes japoneses con diabetes tipo 2 (Maebashi y cols., 1993), se encontró que la administración oral de 9 mg de biotina diariamente durante un mes disminuyó las concentraciones sanguíneas en ayuno de glucosa, piruvato y lactato; al suspender la administración de la vitamina se produjo un retorno a las concentraciones hiperglucémicas observadas antes del inicio del tratamiento. Nuestro grupo ha encontrado que en pacientes diabéticos tipo 2 y en individuos no diabéticos con hipertrigliceridemia, el tratamiento con 15 mg/ día de biotina durante 28 días disminuye las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (Revilla-Monsalve y cols. 2006). En modelos animales con diabetes tipo 2 también se ha reportado que dosis de biotina de 2 mg/ Kg. de peso disminuye la hiperglucemia (Reddi y cols., 1988, Zhang y cols., 1996). El efecto terapéutico de la biotina sugiere estar ligado a su efecto sobre la expresión genética (Fernández-Mejía, 2005). Es interesante resaltar que recientemente ha aparecido en el mercado un medicamento de patente (Diachrome®) conteniendo biotina (2 mg) y picolinato de cromo (600 microgramos) como alternativa para el tratamiento de diabetes tipo 2 (Fernández-Mejía, 2005).



### 1.2.7 Deficiencia de biotina

En el humano se han descrito dos defectos en el ciclo de utilización de biotina y ambos producen un padecimiento conocido como deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC). El primer tipo se debe a una deficiencia en la enzima holocarboxilasa sintetasa y se conoce como DMC Neonatal o de aparición temprana, consiste en una alteración en el mecanismo de unión de la biotina a las apocarboxilasas evitando que se produzcan enzimas activas y debe su nombre a que los síntomas se presentan poco después del nacimiento. La DMC Juvenil o de aparición tardía, es causada por la deficiencia de la enzima biotinidasa, lo que ocasiona un defecto en el reciclamiento de biotina. (Wolf y Heard, 1991 y Wolf, 1995).

Gompertz y cols.. identificaron por primera vez un error congénito asociado al metabolismo de biotina, la ( $\beta$ )-metilcrotonil glucinuria (Gompertz, 1973). A partir de esos estudios han surgido una serie de numerosos reportes describiendo a pacientes con una o múltiples deficiencias de las enzimas dependientes de biotina (PC, PCC ACC y MCC). Los pacientes con alguna deficiencia de las carboxilasas no responden al tratamiento oral de biotina, y su tratamiento en su mayoría es dietético; mientras que la mayoría de los individuos con algún tipo de DMC que han recibido tratamiento con biotina han mejorado su condición al administrárseles dosis farmacológicas de la vitamina (Cowan, 1982).

Los síntomas clínicos de la deficiencia de biotina son alopecia, glositis atrófica, dermatitis, erupciones eritematosas, lasitud, anorexia, anemia leve, resequedad en la piel, infecciones producidas por hongos y cambios en el sistema cardiovascular. Los síntomas neurológicos notados en adultos incluyen depresión ligera, somnolencia, dolor muscular hiperestesia y parestesia. Estos síntomas pueden ser producidos de manera artificial en individuos y animales en experimentación con una dieta con alto contenido de clara de huevo y deficiente de biotina (Appel y Briggs 1988).

Actualmente no se puede definir un cuadro clínico característico de estas deficiencias debido a la gran variabilidad observada en la expresión de estos errores del metabolismo, por ello el diagnóstico se realiza determinando la actividad específica de

la biotinidasa sérica y de las carboxilasas mitocondriales en cultivo de fibroblastos o en linfocitos de sangre periférica (Burri y cols., 1985 )



Figura 3. Ejemplo de deficiencia de biotina inducida en ratas comparada con su control a las 6 semanas de tratamiento con dieta deficiente.

### 1.2.8 Carboxilasas dependientes de biotina

Las reacciones de carboxilación tienen una participación muy importante en el metabolismo intermediario, ya que actúan en reacciones clave de la síntesis y elongación de los ácidos grasos, anaplerosis del ciclo de Krebs, gluconeogénesis y catabolismo de algunos aminoácidos. ( Combs, 1992)

Existen cinco carboxilasas dependientes de biotina: la piruvato carboxilasa (PC) que cataliza la conversión de piruvato a oxalacetato en la gluconeogénesis; la propionil-CoA carboxilasa (PCC), que lleva a cabo la reacción en la que propionil-CoA se convierte en d-metilmalonil-CoA que pertenece a la vía catabólica de los ácidos grasos de cadena impar; la 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) que convierte 3-metilcrotonil-CoA a 3-metilglutaconil-CoA en la vía degradativa de la leucina; y dos isoformas de la acetil-CoA carboxilasa (ACC-1 y ACC-2) que carboxila la acetil-CoA para formar malonil-CoA en la síntesis de ácidos grasos. (Mock, 1996).

Tres de las cinco carboxilasas son mitocondriales y ACC se encuentra tanto en mitocondria (en su isoforma 2), como en el citosol (en su isoforma 1) las cinco enzimas usan un mecanismo catalítico similar dependiente de ATP (Moss y Lane, 1971 y Wolf, 1995).

La mayoría de las reacciones catalizadas por las carboxilasas dependientes de biotina tienen mecanismos catalíticos similares. La mayoría contiene tres componentes funcionales: la región de carboxilación de la biotina (BC), la región de transferencia del complejo carboxibiotina (CT) y la región acarreadora del complejo carboxibiotina (BCCP). La reacción de carboxilación ocurre en dos pasos y en dos sitios separados, en la primera parte de la reacción, la biotina es acarreada a la región de carboxilación (BC) donde se une al  $\text{CO}_2$ , el cual proviene de un intermediario formado entre ATP y bicarbonato, la unión se realiza en la posición N1 de la biotina formando el complejo carboxibiotina. Este complejo se traslada con ayuda de la región BCCP hasta la región CT que descarboxila el complejo carboxibiotina y transfiere el grupo carboxilo al sustrato aceptor que puede ser piruvato, acetil-CoA, propionil-CoA o 3-metilcrotonil-CoA, respectivamente. (Wallace y Jitrapakdee, 2003) (Fig 5).

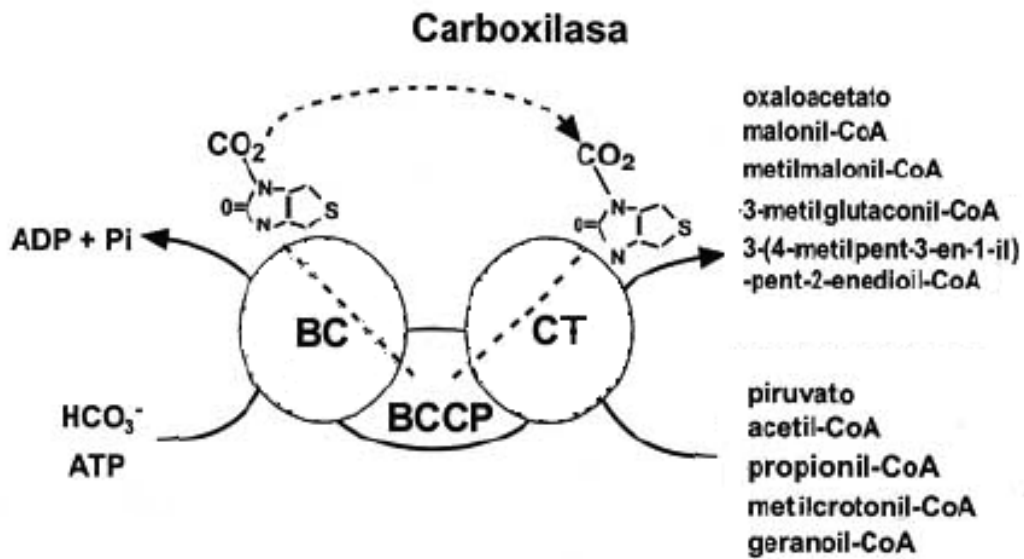


Figura 4. Mecanismo de reacción de las carboxilasas dependientes de biotina

Las enzimas dependientes de biotina requieren de un catión metálico divalente en exceso, esto sugiere que los cationes metálicos están involucrados en la orientación del bicarbonato para ser atacado por el grupo fosfato del ATP, disminuyendo la repulsión por las cargas negativas entre ambos compuestos.

Se sabe que no sólo hay similitud entre el mecanismo de reacción de las enzimas dependientes de biotina, también existe un alto grado de similitud entre la secuencia de aminoácidos de los dominios funcionales. Por ejemplo, el dominio BCCP se encuentra conservado en todas las carboxilasas dependientes de biotina; y el dominio de carboxilación de la biotina tiene gran similitud entre la ACC de *E. Coli* y la PC de eucariotes (Jitrapakdee y Wallace, 2003)

### 1.3 PIRUVATO CARBOXILASA (PC) [EC 6.4.1.1]

La enzima piruvato carboxilasa es miembro de la familia de enzimas dependientes de biotina; fue descrita por primera vez en 1960 por Utter y Keech cuando estudiaban la gluconeogénesis en el hígado de pollo. Estudios posteriores demostraron que la PC existe en la mayoría de los organismos (Wallace y cols.. 1998)

#### 1.3.1 Función

Es una enzima clave de la gluconeogénesis y en mamíferos se expresa de manera tejida específica, se sabe que tiene una mayor actividad en hígado y riñón (tejidos gluconeogénicos), tejido adiposo y glándulas mamarias (tejidos lipogénicos) e islotes pancreáticos. La actividad de PC es moderada en cerebro, corazón y glándulas adrenales y muy baja en leucocitos y fibroblastos (Wallace y cols.. 1998; Jitrapakdee y Wallace, 1999)

En hígado y riñón, cataliza el primer paso de la gluconeogénesis. En los tejidos lipogénicos participa en la síntesis de ácidos grasos, en el transporte de grupos acetilo vía citrato y de equivalentes reducidos vía malato desde la mitocondria al citosol. En todos los tejidos, pero particularmente en el cerebro, tiene un papel anaplerótico en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, al catalizar la formación de oxaloacetato (Wallace y cols.. 1998; Jitrapakdee y Wallace, 1999).

En condiciones de ayuno la gluconeogénesis aporta más del 96% de la producción total de glucosa (Rothman y cols., 1991). Se ha encontrado que al igual que las enzimas gluconeogénicas la actividad de la PC se encuentra incrementada, lo que sugiere un papel principal en esta vía (Owen y cols., 1976).

Aunque al principio la PC fue considerada sólo una enzima gluconeogénica, también se ha reconocido que tiene un nivel de expresión alto durante la diferenciación de los adipocitos (Mackall, 1977).

### 1.3.2 Mecanismo de reacción

La PC cataliza la carboxilación dependiente de ATP del piruvato para formar oxalacetato en dos pasos y en dos regiones diferentes (Fig 6).

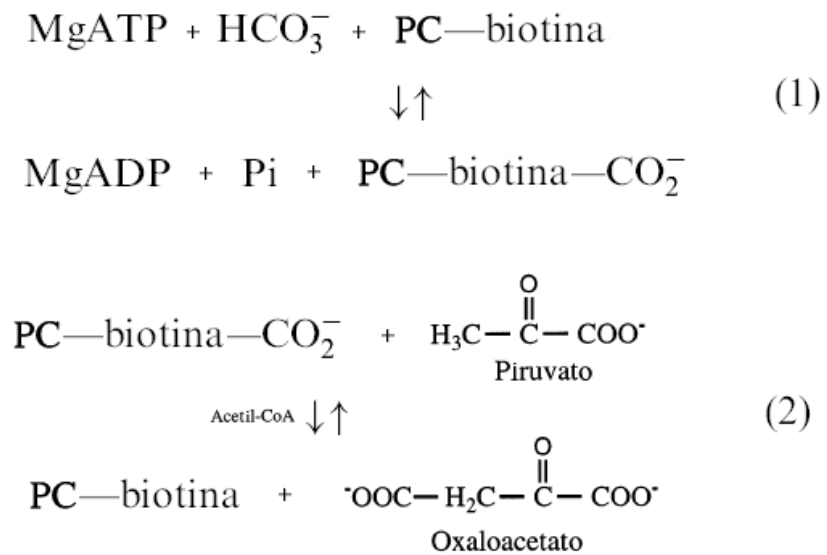


Figura 5. Mecanismo de reacción de la PC. Formación del complejo carboxibiotina (1); formación de oxalacetato por carboxilación del piruvato.(2) (Jitrapakdee y Wallace, 2003)

### 1.3.3 Estructura

La forma nativa de la PC está compuesta por cuatro subunidades idénticas ( $\alpha_4$ ) ordenadas en diferentes planos de forma ortogonal a cada una, conformando una estructura tetraédrica (Fig 5). Cada subunidad pesa entre 120-130 kDa y cada una contiene unida a la biotina de forma covalente. La secuenciación del gen que codifica para la PC indica la existencia de tres dominios funcionales, dominio BC (ubicado en la región N-terminal), el dominio BCCP y el dominio CT, descritos anteriormente y comunes para todas las carboxilasas dependientes de biotina (Wallace y cols., 1985; Jitrapakdee y cols., 1996)

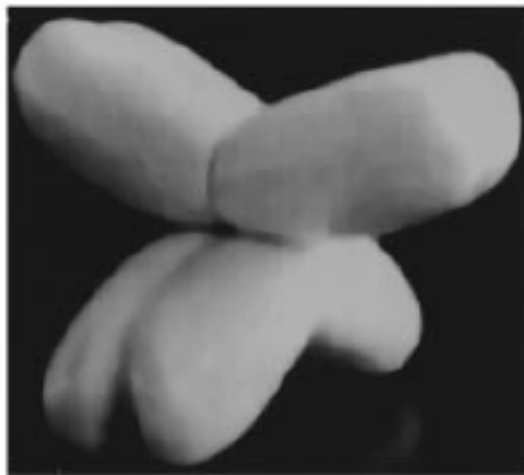


Figura 6. Microscopía electrónica de la estructura cuaternaria de la PC (Jitrapakdee y Wallace, 1999)

#### 1.3.4 Síntesis y degradación.

En mamíferos la PC es codificada por un solo gen que da lugar a varias isoformas de mRNA con diferentes 5'-UTRs (regiones no traducibles) pero que contienen la misma región codificante. La expresión de estas isoformas es tejido-específica, sin embargo no se han reportado isoenzimas tejido-específicas (Jitrapakdee y cols., 1996).

La enzima recién sintetizada sufre una modificación post-transduccional donde la biotina se le une covalentemente a un residuo específico de lisina localizado en la parte C-terminal de cada proteómero, generando así la proteína activa (Chapman y Cronan, 1999). La reacción de biotilación fue descrita en el ciclo de la biotina.

La PC se localiza exclusivamente en la matriz mitocondrial (Jitrapakdee y Wallace, 1999). Muchos estudios han demostrado que las enzimas que participan en el metabolismo de la glucosa se encuentran asociadas formando complejos multienzimáticos, (Jitrapakdee y Wallace, 1999). La PC se encuentra asociada de manera específica con otras enzimas mitocondriales: se asocia con aspartato transferasa o malato deshidrogenasa formando complejos binarios; y se asocia con aspartato aminotransferasa y glutamato deshidrogenasa formando complejos terciarios (Jitrapakdee y Wallace, 1999)

El tiempo de vida media de la PC en hígado de rata es de 4.6 días; lo que es relativamente mayor al tiempo de recambio promedio de 3.8 días para las proteínas mitocondriales (Jitrapakdee y Wallace, 1999). Sin embargo en líneas celulares humanas, (HE(39)L y 3T3-L1) y en adipocitos de ratón (Chandler, 1985), se ha encontrado que el tiempo de vida media de la PC es menor. La degradación de la PC en estas líneas celulares puede deberse a la vía degradativa autofágica/lisosomal de la mitocondria (Chandler, 1985)



### 1.3.5 Regulación alostérica

Uno de los aspectos de la función de la PC que ha recibido mayor atención, es su regulación por acetil-CoA. En general, la actividad de la enzima de vertebrados es dependiente de acetil-CoA. En el caso de la enzima de hígado del pollo, se ha visto mediante microscopía electrónica, que la acetil-CoA tiene un efecto estabilizador sobre la estructura de la enzima (Mayer, 1980)

El acetil-CoA tiene un efecto positivo sobre la actividad de la enzima. A concentraciones saturantes de acetil-CoA ( $K_a = 6,6 \text{ mM}$ ), la actividad máxima que se obtiene es tres o cuatro veces mayor que cuando está ausente. El efecto activador del acetil-CoA, está en concordancia con la función anaplerótica de la enzima. Esta activación es inhibida competitivamente por el NADH, el cual, no afecta la actividad basal. Además del acetil-CoA, los acil-CoA de cadena larga son también potentes activadores de la enzima; la  $K_a$  para el palmitoil-CoA es dos órdenes de magnitud menor que la del acetil-CoA (Myers, 1983).

El aspartato, por otra parte, es un inhibidor no competitivo de la enzima ( $K_i = 1,9 \text{ mM}$ ), mientras que el oxalacetato muestra una inhibición competitiva con respecto al piruvato ( $K_i = 0,22 \text{ mM}$ ). La inhibición por aspartato parece ser un mecanismo de control específico, ya que otros ácidos dicarboxílicos no producen una inhibición sustancial (Millei, 1972).

### 1.3.6 Deficiencia

La deficiencia de PC es de origen genético donde se afecta la actividad de la enzima por alguna mutación, es una enfermedad autosómica recesiva de baja incidencia (1: 250 000). Se caracteriza por una acumulación de ácido láctico, citrulina, amonio y lisina en sangre (Wallace y cols., 1998). La deficiencia de PC es heterogénea y se divide en tres grupos dependiendo del tipo de manifestaciones clínicas y la población en la cual se presente. El grupo A, se caracteriza por acidemia láctica y retraso psicomotor, ha sido observado en la población nativa de América del norte y en estadounidenses de

origen caucásico y japonés. El grupo B presenta un cuadro clínico complejo que incluye acidemia láctica neonatal severa, hiperamonemia, citrulinemia e hiperlisinemia. Es una enfermedad neonatal y puede producir la muerte antes de los tres meses. Se han localizado casos Canadá, Francia, Arabia Saudita, Suecia y Alemania Occidental. El tercer grupo lo conforma un solo caso donde el paciente padecía de episodios intermitentes de acidosis metabólica en etapa infantil, pero a diferencia de los parámetros clínicos del grupo A, no presentó retraso psicomotor y tuvo un desarrollo normal (Robinson, 2001)

## 1.4 PROPIONIL-CoA CARBOXILASA (PCC) [EC 6.4.1.4]

La propionil-CoA carboxilasa es una enzima mitocondrial multimérica involucrada en el catabolismo de ácidos grasos de cadena impar, de los aminoácidos isoleucina, treonina, metionina y valina y del colesterol. Cataliza la carboxilación de propionil-CoA para formar metilmalonil-CoA, que alternativamente se convierte en succinil-CoA, para entrar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. También forma parte del grupo de enzimas dependientes de biotina. (Frantisek y cols., 1980)

### 1.4.1 Mecanismo de reacción

La PCC cataliza la carboxilación dependiente de ATP del propionil-CoA para formar metilmalonil-CoA (Fig 8)

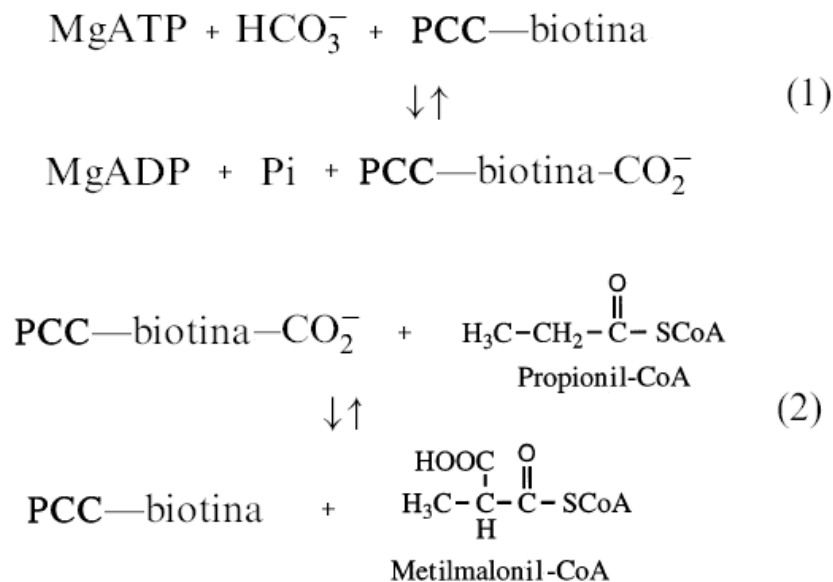


Figura 7. Mecanismo de reacción de la PCC. Formación del complejo carboxibiotina (1); formación de metilmalonil-CoA por carboxilación del propionil-CoA

#### 1.4.2 Estructura

La estructura de PCC está compuesta de por dos unidades diferentes, una subunidad llamada PCC- $\alpha$  y una subunidad PCC- $\beta$ , en una configuración dodecamérica con arreglo  $\alpha_6\beta_6$ . La subunidad  $\alpha$  tiene un peso molecular de 72 kDa y la subunidad  $\beta$  pesa 56 kDa. Cada subunidad es codificada por genes independientes denominados *PCCA* y *PCCB*. La subunidad  $\alpha$  es la que contiene el dominio de unión a la biotina.

#### 1.4.3 Deficiencia de

En humanos la deficiencia de PCC es causada por una mutación de la enzima que altera su actividad, es de tipo hereditaria y genera la enfermedad conocida como acidemia propiónica. Los individuos afectados presentan cetoacidosis metabólica severa, hiperamonemia, hiperglicinemia, hipoercarnitinemia y un patrón característico de ácidos orgánicos en orina.(Pérez-Cerda y cols., 2003). La acidemia propiónica se divide en dos grupos dependiendo en que gen se localiza la mutación, *PCCA* o *PCCB*. Hasta el momento se han localizado alrededor de 60 mutaciones en los genes *PCCA* y *PCCB* alrededor del mundo. Una de las características más notables de la acidemia propiónica es el grado en que los pacientes son afectados, ya que algunos no presentan cuadros clínicos, mientras que en otros, puede ser potencialmente mortal (Wolf, 2001; Campeau y cols., 1999).

## 1.5 ACETIL-CoA CARBOXILASA (ACC) [EC 6.4.1.2]

La acetil-CoA carboxilasa cataliza la carboxilación de acetil-CoA, que lleva a la formación de malonil-CoA, que es utilizado como un donador activo de átomos de carbono en la síntesis de novo y elongación de los ácidos grasos y tiene un papel regulador en la lipogénesis y en la  $\beta$ -oxidación, además interviene en la génesis de la membrana celular (Kim y cols., 1989).

### 1.5.1 Mecanismo de reacción

La ACC cataliza la carboxilación dependiente de ATP del acetil-CoA para formar malonil-CoA (Fig 9).

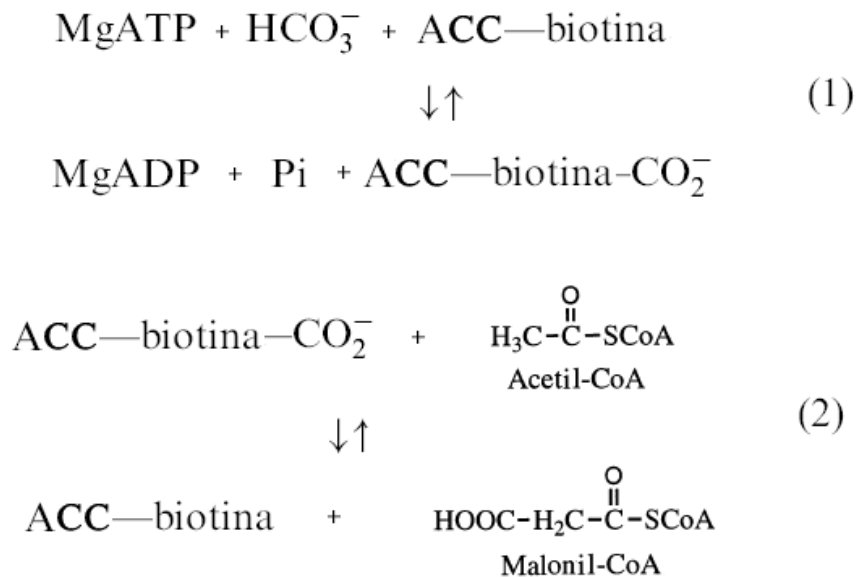


Figura 8. Mecanismo de reacción de la CC. Formación del complejo carboxibiotina (1); formación de malonil-CoA por carboxilación del acetil-CoA (2)

### 1.5.2 Estructura

En la ACC de *E. coli* las tres regiones que participan en la carboxilación están compuestas de la siguiente forma: la región BC en un homodímero de 49 kDa cada uno, la región CT es un heterotetrámero con una subunidad a (35 kDa) y una subunidad b (30 kDa) en un arreglo a<sub>2</sub>b<sub>2</sub> y la región BCCP es un homodímero de 16.7 kDa cada uno, donde la mitad C-terminal de ambos abarca la región acarreadora de biotina. En mamíferos las tres regiones que intervienen en la carboxilación se encuentran en el mismo polipéptido formando una enzima multifuncional. Existen dos isoenzimas la ACC-1 (265 kDa) y ACC-2 (280 kDa) que se han encontrado como productos de genes separados en el humano y presentan un 75% de similitud en su secuencia de aminoácidos. ACC-1 es una enzima citosólica, y se expresa predominantemente en tejidos lipogénicos (hígado, tejido adiposo y glándulas mamarias) donde su papel principal es la síntesis de ácidos grasos. En contraste la ACC-2 está asociada con la región de la mitocondria que está en contacto con el citoplasma, y se expresa en corazón y músculo esquelético donde su papel fisiológico es el de regulación de la oxidación de los ácidos grasos (Boone y cols., 1999). La actividad de ACC está regulada post-transcripcionalmente por fosforilación y desfosforilación (Kim y cols., 1989)

### 1.5.3 Deficiencia

A diferencia de otras carboxilasas dependientes de biotina, la deficiencia de ACC es extraordinariamente rara. Hasta el momento, sólo ha sido reportado un solo caso en un recién nacido que presentaba miopatía hipotónica, daño cerebral y crecimiento lento. Los análisis bioquímicos revelaron la acumulación de productos derivados del butiril-CoA intermediario en la síntesis de ácidos grasos, así como deficiencia en la actividad de acetil-CoA en tejido hepático y fibroblastos. (Blom y Scholte, 1981)

## 1.6 $\beta$ -METILCROTONIL-CoA CARBOXILASA (MCC) [EC 6.4.1.4]

La enzima MCC cataliza el cuarto paso en la degradación de la cadena del aminoácido leucina. Es una enzima mitocondrial y se expresa predominantemente en hígado y riñón.

### 1.6.1 Mecanismo de reacción

La MCC cataliza la carboxilación dependiente de ATP del  $\beta$ -metilcrotonil-CoA para formar  $\beta$ -metilglutaconil-CoA (Fig 10).

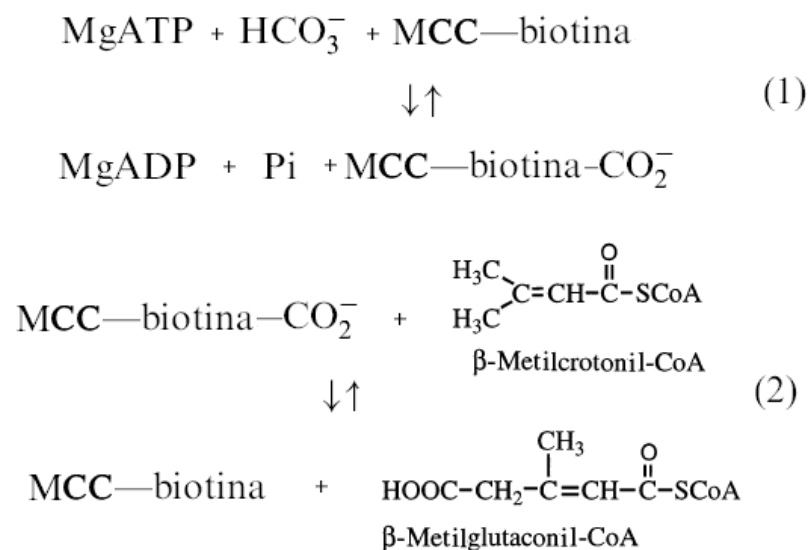


Figura 9. Mecanismo de reacción de la MCC. Formación del complejo carboxibiotina (1); formación de malonil-CoA por carboxilación del acetil-CoA

### 1.6.2 Estructura

La MCC, al igual que la PCC está compuesta por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$  codificadas por los genes *MCCA* y *MCCB*. Su forma funcional está compuesta por seis heterodímeros formando una estructura con un arreglo  $(\alpha\beta)_6$ . La subunidad a pesa alrededor de 80.5 kDa y contiene el dominio de unión a biotina; la subunidad b pesa 61.3 kDa (Jitrapakdee y Wallace, 2003; Desviat y cols., 2003)

### 1.6.3 Deficiencia de MCC

La deficiencia de MCC causa una enfermedad conocida como metilcrotonilglicinuria. Los pacientes con esta enfermedad presentan un fenotipo variable, que puede ir desde lo asintomático hasta lo severo y en algunos casos puede conducir a un estado de coma e incluso la muerte. A nivel bioquímico, los pacientes presentan una excreción elevada de 3-metilcrotonilglicina y ácido 3-hidroxisovalérico, así como niveles elevados de 3-hidroxi-isovaleril-carnitina en sangre y orina. La mayoría de las mutaciones encontradas en los genes *MCCA* y *MCCB* son mutaciones sin sentido, es decir, que hay inserciones y deleciones pero sin que exista una correlación entre genotipo y fenotipo. El tamiz neonatal ha revelado que esta enfermedad parece ser la aciduria orgánica más frecuente en Norteamérica, Europa y Australia. (Desviat y cols., 2003; Baumgartner y cols., 2004)



## 1.7 INTEGRACIÓN DEL METABOLISMO DE LAS CARBOXILASAS DEPENDIENTES DE BIOTINA

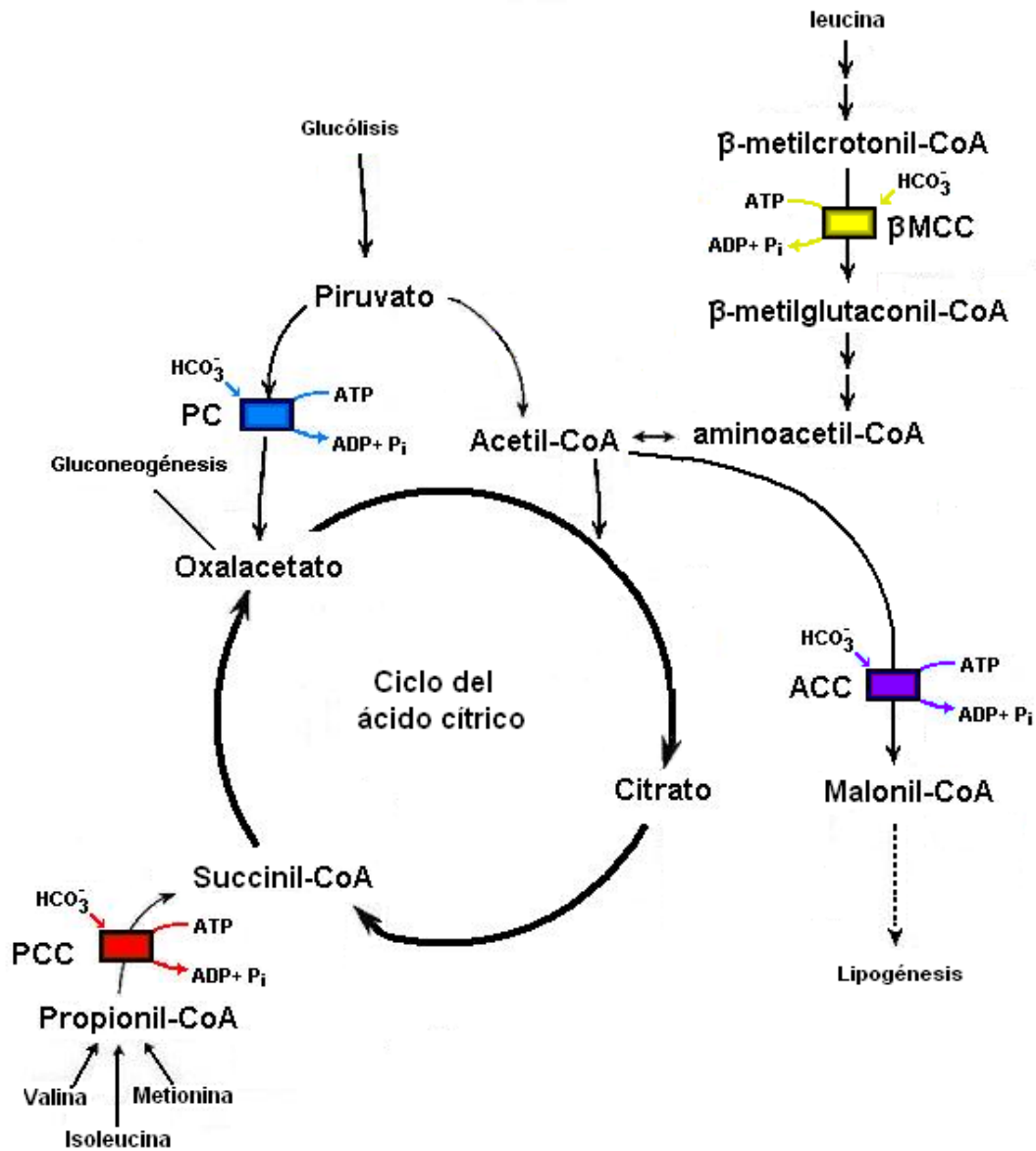


Figura 10 .Rutas metabólicas en las que participan las carboxilasas dependientes de biotina.

## 2. ANTECEDENTES DEL PROYECTO DE TESIS

Estudios previos en han encontrado que la administración de dosis farmacológicas de biotina en humanos no deficientes de la vitamina aumentan la actividad de las carboxilasas en los linfocitos (Báez-Saldaña y cols. 2004). La administración de 15 mg al día de biotina incrementa aproximadamente al doble la actividad de la propionil-CoA carboxilasa, este efecto se observó tanto a los 14 como a los 28 días de tratamiento. La respuesta a la administración de biotina fue todavía mayor sobre la piruvato carboxilasa, donde se observa que la administración de biotina durante 14 días produce un aumento en la actividad de 2.5 veces y este aumento se incrementa a 3.5 veces en respuesta al tratamiento durante 28 días con biotina. Otros autores (Wolf y Rosenberg, 1979; Bartlett y cols., 1980) también encontraron que la administración farmacológica de biotina aumenta la actividad de la propionil-CoA carboxilasa en linfocitos y fibroblastos de individuos no deficientes de biotina. Similarmente en una línea celular de linfocitos T (Jurkat), dosis de 10 nM de biotina incrementan la actividad de la propionil Co-A carboxilasa al igual que la cantidad de la proteína biotinilada (Manthey y cols., 2002). La masa biotinilada de la 3-metil-crotonil-CoA carboxilasa también se ve incrementada en respuesta a la administración de dosis farmacológicas de la vitamina (Manthey y cols., 2002). La administración de dosis farmacológicas de biotina de 20 mg al día durante 21 días en individuos no deficientes de la vitamina produce un aumento en la abundancia del RNAm de la 3-metil-crotonil-CoA carboxilasa (Wiedmann y cols., 2004)

### 3. MARCO TEORICO

Diversas investigaciones han encontrado que la biotina puede ser usada terapéuticamente en dosis entre 9 y 16 mg al día para reducir la hiperglucemia y la hipertrigliceridemia (Coggeshall y cols., 1985; Maebashi y cols., 1993; Reyilla-Monsalve y cols., 2006) y han recientemente aparecido en el mercado, agentes antidiabéticos conteniendo dosis farmacológicas de biotina de 2 a 2.5 mg (Fernández-Mejía, 2005). Un estudio clínico previo de nuestro laboratorio encontró que la administración de dosis farmacológicas de biotina aumentan la actividad enzimática de piruvato carboxilasa y propionil-CoA carboxilasa en linfocitos humanos lo que indica que el exceso de biotina modifica la actividad de las carboxilasa (Báez-Saldaña y cols., 2004). Estos hallazgos fueron inesperados ya que durante mucho tiempo se consideró que la biotina era captada en el organismo de acuerdo a los requerimientos diarios y que su exceso se excretaba por la orina, por lo que se consideraba improbable que un exceso de esta vitamina modificase la cantidad de biotina unida a sus apoenzimas, la actividad y/o la expresión de las carboxilasas. El aumento de la actividad de las carboxilasas en respuesta a dosis farmacológicas de biotina nos indujeron a hacernos la pregunta si la biotina era capaz de modificar la actividad de las carboxilasas en otros tejidos. En particular nos interesó saber si el aumento producido por la biotina sobre la piruvato carboxilasa en los linfocitos, se produce también en tejidos gluconeogénicos en donde esta enzima tiene un papel fisiológico muy importante. Debido a las complicaciones éticas que representa la obtención de tejidos vitales como el hígado y el riñón en humanos, proponemos el estudio del efecto de dosis farmacológicas de biotina sobre la actividad de las carboxilasas en el hígado y en el riñón de ratas, con el objetivo de determinar si la administración de biotina modifica la actividad y la masa biotinilada de las carboxilasas. Se analizarán los efectos de dos concentraciones de biotina: 0.2 mg/ kg de peso y 2 mg/ kg de peso. La primera concentración es análoga a la administrada en nuestro estudio en humanos (Báez-Saldaña y cols., 2004). La dosis de 2 mg/Kg de peso será utilizada debido a que hay investigaciones que han reportado que esta dosis produce modificaciones en el metabolismo de los carbohidratos (Dakshinamurti y cols., 1968, 1970); dado que la piruvato carboxilasa tiene un papel muy importante en la

gluconeogénesis, consideramos importante estudiar el efecto de la biotina a esta dosis. Estos estudios servirán para determinar si dosis terapéuticas de biotina modifican la actividad de las carboxilasas.

#### **4. HIPÓTESIS**

La administración de dosis terapéuticas de biotina en ratas Wistar macho incrementará la actividad de la piruvato carboxilasa y propionil-CoA carboxilasa en el hígado y el riñón.

#### **5. OBJETIVO**

Determinar el efecto de la administración de dosis farmacológicas de biotina en ratas Wistar macho, sobre la actividad de la piruvato carboxilasa y propionil-CoA carboxilasa en el hígado y el riñón.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Modelo animal

Se trabajó con ratas Wistar machos de 200-300g de peso (7 a 9 semanas), alimentación *ad libitum*, a las cuales se administró una dosis diaria de biotina de 0.2 y 2 mg/ kg por vía intraperitoneal en solución salina (1.32  $\mu$ L/ g peso), durante períodos de 12 y 26 días, el grupo de ratas control recibió únicamente solución salina (el mismo volumen que para el grupo en tratamiento).

### 6.2 Obtención de órganos.

Las ratas fueron sacrificadas con una inyección intraperitoneal de 300  $\mu$ L de pentobarbital sódico a una concentración de 63 mg/ mL, después de lo cual se disectaron el hígado y ambos riñones.

### 6.3 Preparación de los homogeneizados

Los tejidos se lavaron con PBS y se pesaron 500 mg de cada tejido. Los tejidos fueron colocados en 3 mL de amortiguador de homogeneizado con 120  $\mu$ L de una solución de inhibidor de proteasas Complete®. El tejido fue homogenizado con ayuda de un Polytron® (Kinemática, Krienslu) a 4°C en tres pulsos de 15 s con intervalos de 30 s entre cada pulso. Las células disgregadas se lisaron usando un sonicador (Branson Cell Disruptor 200, danbury, CT) a 4°C en tres pulsos de 15 s con intervalos de 30 s entre cada pulso. El homogeneizado fue centrifugado 15 min a 7000 g a 4°C. El sobrenadante fué recuperado y se ultracentrifugó por 30 min a 100 000 g a 4°C (Beckman Optima ILX Ultracentrifuge). En el sobrenadante recuperado se cuantificó la

proteína total soluble y se determinó tanto la actividad enzimática como la masa biotinilada de las carboxilasas.

#### 6.4 Cuantificación de la proteína.

La cuantificación se basa en la ley de Lambert y Beer que fundamenta todos los métodos colorimétricos. La proteína participa en una reacción que da origen a un compuesto colorido donde la cantidad de color generado es proporcional a la concentración de proteína.

Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford, tomando 20  $\mu\text{L}$  de homogeneizado y aforando a 1 mL con agua desionizada ( $\text{H}_2\text{O DI}$ ), de esta dilución se tomaron 20  $\mu\text{L}$  aforando a 800  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O DI}$ , finalmente se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de solución de Bradford, se dejaron reposar no más de 10 minutos y se leyó su absorbencia a 595 nm, los valores de absorbencia obtenidos se interpolaron en una curva estándar elaborada con Albúmina Sérica Bovina (ABS) preparada realizando diluciones de una concentración stock de 14 mg/ mL de ABS. Las concentraciones de referencia fueron de 0, 1.4, 2.8, 5.6, 11.2, y 14  $\mu\text{g/ mL}$ .

#### 6.5 Actividad de las Carboxilasas.

La determinación de la actividad de la piruvato carboxilasa y propionil-CoA carboxilasa se basa en la incorporación de  $^{12}\text{CO}_2$  al sustrato (piruvato en el caso de PC y propionil CoA en el caso de PCC) dando origen al  $^{14}\text{C}$ -ácido no volátil correspondiente. La cantidad de  $^{14}\text{CO}_2$  no fijada se remueve por evaporación.

El experimento se realizó en condiciones saturantes por lo que se decidió que la concentración de los sustratos fuera 10 veces arriba de la  $K_m$  para cada enzima. (Wolf, 1995)

Por cada órgano homogeneizado se etiquetaron y prepararon tres tubos de la siguiente manera.

Tubo con sustrato	Tubo sin sustrato	Tubo sin extracto
25 µL de homogeneizado*	25 µL de homogeneizado*	-----
100 µL de solución de reacción con coenzima** y sustrato	100 µL de solución de reacción sin coenzima** ni sustrato	100 µL de solución de reacción con coenzima** y sustrato

· \*Estos 25 µL de homogeneizado contienen 50 µg de proteína

· \*\* Acetil-CoA en el caso de piruvato carboxilasa

Soluciones de reacción para cada enzima.

Solución de reacción para PC	
Concentraciones finales en 100 µL de reacción	
Tris HCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
ATP	0.6 mM
Tritón X-100	0.5 %
DTT	5 mM
NaH <sup>14</sup> CO <sub>3</sub>	10 mM
Piruvato	4 mM
Coenzima:	
Acetil-CoA	2.9 mM

Solución de reacción para PCC	
Concentraciones finales en 100 µL de reacción	
Tris HCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
KCl	94 mM
ATP	0.8 mM
Tritón X-100	1 %
DTT	5 mM
NaH <sup>14</sup> CO <sub>3</sub>	10 mM
Propionil-CoA	0.58 mM

Los tubos se incubaron 30 min a 30°C. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo con 50 µL de ácido tricloroacético (ATC) 20% y se agitó en un



vórtex, los tubos se centrifugaron 15 min a 9000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue recuperado en viales de centelleo, y el botón se resuspendió con 100 µL de ATC 10%. La suspensión se centrifugó nuevamente 15 min a 9000 rpm a 4°C, y se recuperó el sobrenadante adicionándose a su respectivo vial. Los viales fueron colocados en una parrilla de calentamiento por una noche para la evaporación de todo el sobrenadante y así dejar en el vial la radiactividad fijada por cada enzima. Cuando el interior del vial se observó completamente seco se agregaron 500 µL de H<sub>2</sub>O DI para resuspender y 5 mL de líquido de centelleo. Los viales se metieron en un contador de centelleo líquido (MINAXIb TRI-LAB 4 000 SERIES) y se determinaron las desintegraciones por minuto (DPM).

La actividad específica se calculó relacionando las desintegraciones por minuto entre los miligramos de proteína de la muestra y el tiempo de incubación. Y se reportaron los pico moles fijados de CO<sub>2</sub> radiactivo por miligramo de proteína por minuto.

$$\frac{\text{DPM } ^{14}\text{CO}_2 \text{ fijado}}{(\text{mg de proteína})} \times \frac{1 \text{ pmol } ^{14}\text{CO}_2}{(30 \text{ min de incubación})} \times \frac{1 \text{ pmol } ^{14}\text{CO}_2}{0.01012 \text{ DPM}} = \frac{\text{pmol } ^{14}\text{CO}_2}{\text{mg min}}$$

## 6.6 Determinación de la masa biotinilada de PC y PCC por Western Blot de proteínas biotiniladas

Preparación del gel de poliacrilamida 0.75mm 8% (Cantidad para dos geles)

	Gel Separador	Gel Concentrador
Acrilamida 30%	2.7 mL	850 $\mu$ L
Tris HCl	2.5 mL*	1.25 mL**
H <sub>2</sub> O	4.7 mL	2.85 mL
SDS 10%	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L
APS 15%	50 $\mu$ L	25 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L

\* Tris HCl 1.5 M pH 8.8; \*\* Tris HCl 0.5 M pH 6.8

El armado de la cámara de electroforesis y de los portageles fué conforme a las instrucciones de la cámara Miniprotean 3® (BIO-RAD), verificando antes de preparar los geles que no haya fugas de líquido.

Los geles de 0.75 mm se prepararon por separado en tubos de plástico de 14 mL. El gel separador se preparó primero, y se agregaron 3 mL a cada portagel, se agregó agua hasta el borde final para evitar la formación de burbujas, se dejaron gelificar cerca de 20 minutos. Una vez gelificados se preparó el gel concentrador y se agregó hasta el borde, se colocó el peine y se dejaron gelificar 20 min.

Fue ensamblada la cámara y se agregaron 300 mL del amortiguador de Corrida. Los geles pueden utilizarse hasta 24 h después de gelificar si están con el amortiguador de corrida y a 4°C, pero no deben utilizarse después de 48 h.

### 6.6.1 Preparación de las muestras.

Una vez cuantificada la proteína por el método de Bradford, se estandarizó la cantidad de proteína con una dilución, para que todas las muestras tuvieran una concentración de 200 µg de proteína por cada 100 µL.

Cada muestra se preparó agregando 25 µL de la dilución de proteína y 25 µL de amortiguador para muestra, que contiene:

β-mercaptoetanol	5 µL
Amortiguador para muestra	20 µL

El marcador de peso molecular biotinilado fue preparado de la siguiente forma:

Amortiguador para muestra	10 µL
Estándar de peso molecular	1 µL
β- Mercaptoetanol	2 µL
H <sub>2</sub> O	8 µL

Las muestras y el marcador se calentaron en agua a ebullición por 10 min. Se centrifugaron para bajar todo el líquido de las paredes de los tubos y se dejaron enfriar antes de cargarse en el gel.

### 6.6.2 Carga de las muestras.

Se colocaron 10 µL de la mezcla del marcador en el pozo 10 de cada gel y se colocaron 25 µL de muestra en cada uno de los pozos. Además se cargaron 5 µL de un marcador preteñido como control de la transferencia. Se colocaron los electrodos y se aplicó un voltaje de 90 volts, por un tiempo aproximado de una hora y media.

### 6.6.3 Transferencia

Concluido el tiempo de corrida se desmontó la cámara y las placas de vidrio, se separó la parte del gel concentrador y se marcó el gel separador a modo de identificar el orden de cargado posteriormente.

Se cortaron trozos de membrana de nitrocelulosa y papel filtro con medidas de 7 X 10 cm y se usaron 6 trozos de papel filtro por cada membrana.

El gel y su respectiva membrana de nitrocelulosa se colocaron en bandejas de plástico por separado con 25 mL de amortiguador de transferencia cada una. Por separado, en otra bandeja, se colocaron los trozos de papel filtro también con amortiguador de transferencia. Se dejaron en agitación constante por 30 min.

Para transferir:

1. Se colocó una cama de tres trozos de papel filtro previamente escurridos para cada gel; cuidando que no se formaran burbujas de aire ni quedaran fibrillas de papel entre cada capa.
2. Se colocó la membrana de nitrocelulosa cuidando que no se formaran burbujas de aire.
3. Se colocó cuidadosamente el gel cuidando de no romperlo y que quedara perfectamente alineado y sin burbujas.
4. Se colocaron otras tres capas de papel filtro sin burbujas y sin fibrillas y se colocó la plancha de la cámara de transferencia (Trans blot SD, Semi-dry transfer cell, BIO-RAD).

La transferencia se realizó a 18 volts por 20 min. Se cuidó que el amperaje no rebasara los 0.5 A para que la transferencia se realizara correctamente.

#### 6.6.4 Bloqueo y revelado.

Terminada la transferencia se desecharon los papeles filtro. Las membranas se colocaron por separado en bandejas con 25 mL de colorante rojo Ponceau's y se dejaron teñir por 5 min, se enjuagaron con H<sub>2</sub>O DI hasta que se observaron claramente las bandas de proteína. Las membranas se dejaron secar y se escanearon para realizar el análisis densitométrico de proteína total. Para el análisis densitométrico se utilizó el software Collage versión 3.0 que proporciona un valor numérico proporcional a la intensidad de las bandas de proteína.

Las membranas fueron colocadas posteriormente en bandejas de plástico con 25 mL de amortiguador de bloqueo y se dejaron en agitación constante por una noche a 4°C.

Terminado el tiempo de bloqueo, las membranas se lavaron con solución de TBS-Tween 0.1% una vez por 5 min.

Después se agregaron 25 mL de amortiguador de lavado a cada membrana y se adicionaron 5 µL de estreptavidina fosfatasa alcalina. Las bandejas fueron cubiertas de la luz con papel aluminio y se dejaron en agitación constante por 2 horas a 4°C en oscuridad.

Transcurrido el tiempo las membranas nuevamente se lavaron con solución de TBS-Tween 0.1% dos veces por 5 min para cada lavado.

Las membranas se lavaron por última vez con amortiguador de Tris-HCl .0.15 M a pH 8.8 por 5 min.

La estreptavidina fosfatasa alcalina se une a la biotina, lo que permite la detección de la forma de holocarboxilasas de PC y de PCC, y necesita de dos reactivos para producir el complejo colorido detectable; Estos reactivos se prepararon de la siguiente forma.

1 mL de nitro azul de tetrazolio (NBT)	30 mg de NBT disuelto en 700 µL de DMF + 300µL H <sub>2</sub> O DI
1 mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP)	15 mg de BCIP disuelto en 1 mL de DMF

DMF. N,N-dimetilformamida

Después del último lavado se colocan 25 mL del amortiguador de revelado AP y se agregan por las paredes 50  $\mu$ L del reactivo NBT y 50  $\mu$ L del reactivo BCIP a cada membrana.

La aparición de las bandas debe mostrarse a los pocos segundos de homogenizada la mezcla de los reactivos.

Después de aparecidas las bandas, las membranas se enjuagaron con abundante agua y se dejaron secar para después escanearlas. El análisis por densitometría de las bandas correspondientes a las proteínas biotiniladas se realizó usando el mismo software que para la proteína total.

## 6.7 Análisis estadístico

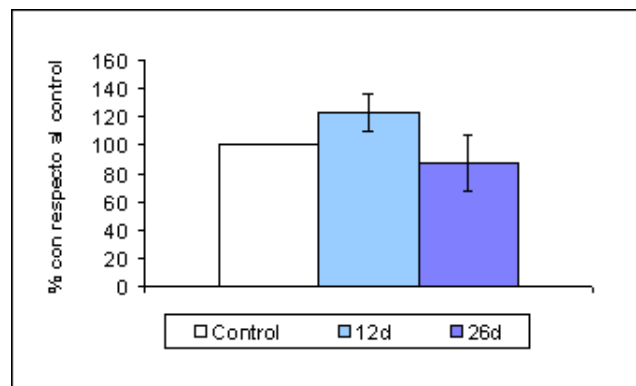
Los cálculos estadísticos se efectuaron con el programa Origin 6.0, los resultados obtenidos se expresan como la media  $\pm$  error estándar del porcentaje de cambio de los grupos tratados con biotina con respecto al grupo control. Las diferencias entre tratamientos fueron analizadas con una prueba ANOVA de una vía. El nivel de significancia fue establecido en  $p \leq 0.05$

## 7. RESULTADOS

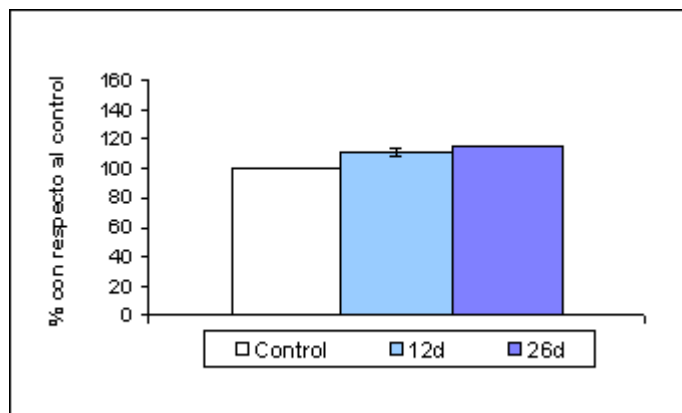
### 7.1 ACTIVIDAD ESPECÍFICA.

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que la administración de biotina incrementa la actividad de las carboxilasas en linfocitos humanos (Báez-Saldaña y cols. 2004). Con el fin de determinar si la administración de biotina modifica la actividad de las carboxilasas en tejidos como el hígado y el riñón, se determinó el efecto de la administración de diferentes concentraciones de biotina sobre la actividad específica de la piruvato carboxilasa y la propionil-CoA carboxilasa.

La gráfica 1 muestra el efecto de la administración de biotina sobre la actividad específica de la piruvato carboxilasa hepática. Los resultados demuestran que la administración intraperitoneal de 2 mg de biotina/ kg de peso durante 12 o 26 días no modificó la actividad de la enzima en relación con la actividad observada en las ratas tratadas con el excipiente (PBS.). De manera similar, no se observan modificaciones sobre la actividad de la PC hepática, cuando se administró una dosis de biotina de 0.2 mg/kg de peso (Gráfica 2)



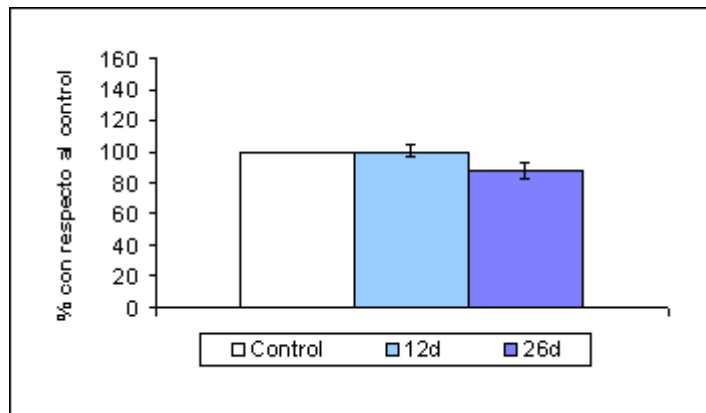
Gráfica 1. Actividad específica de la piruvato carboxilasa en hígado de ratas tratadas con biotina dosis 2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una  $n = 6$ .



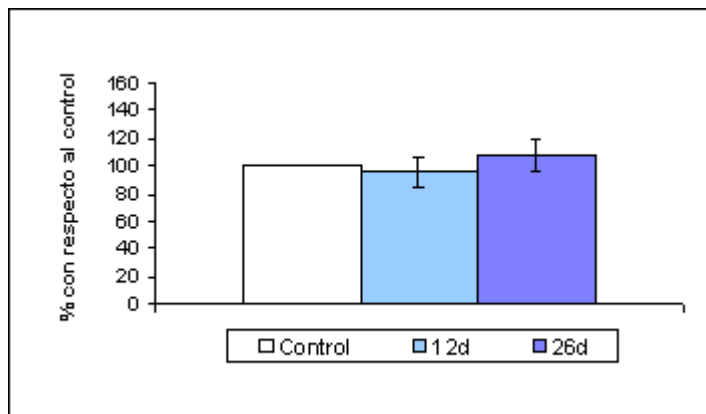
Gráfica 2. Actividad específica de la piruvato carboxilasa en hígado de ratas tratadas con biotina dosis 0.2 mg/ kg, Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar.



En la gráfica 3 se presentan los resultados obtenidos con el efecto de la biotina sobre la actividad específica de propionil-CoA carboxilasa hepática. No se observaron diferencias significativas entre la actividad de la enzima en las ratas control y las tratadas con dosis de 2 mg/ kg de la vitamina. Igualmente, analizamos el efecto del tratamiento con biotina con dosis de 0.2 mg/ kg de peso, como puede observarse en la gráfica 4, no existen diferencias significativas entre las actividades específicas de la PCC de las ratas del grupo control y a las que se les administró la vitamina en ninguno de los días de tratamiento.

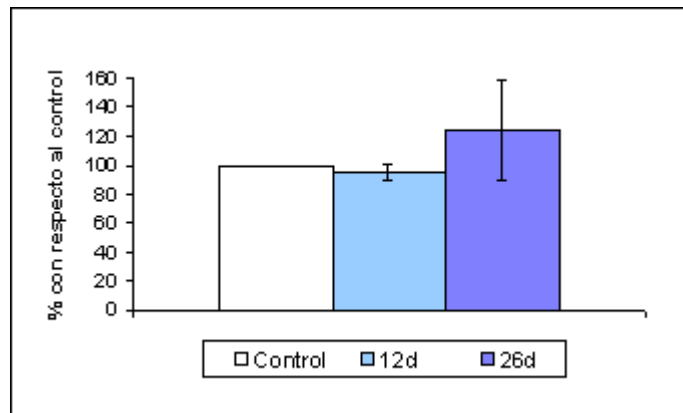


Gráfica 3. Actividad específica de la propionil-CoA carboxilasa en hígado de ratas tratadas con biotina dosis 2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una n = 6.

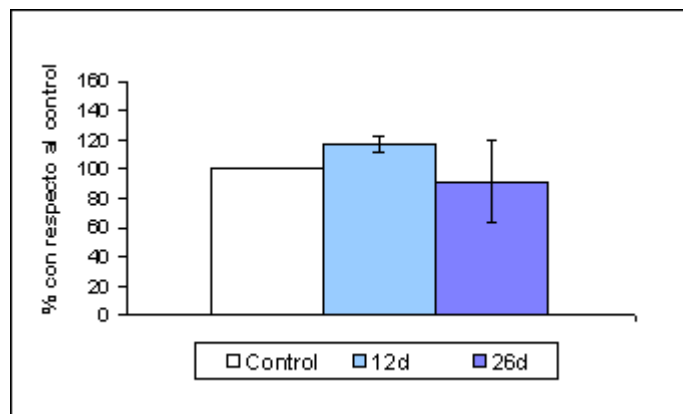


Gráfica 4. Actividad específica de la propionil-CoA carboxilasa en hígado de ratas tratadas con biotina dosis 0.2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una n = 6.

También se analizó el efecto de la administración de biotina sobre la actividad de las carboxilasas en el riñón. La administración de las dosis farmacológicas de la vitamina a los 12 o 26 días no modificó sustancialmente la actividad de la piruvato carboxilasa (Gráfica 5 y Gráfica 6) observada en las ratas tratadas con el vehículo.

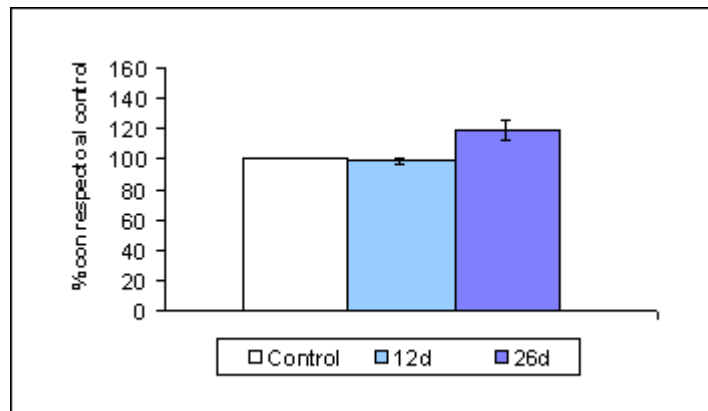


Gráfica 5. Actividad específica de la piruvato carboxilasa en riñón de ratas tratadas con biotina dosis 2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una n = 6.

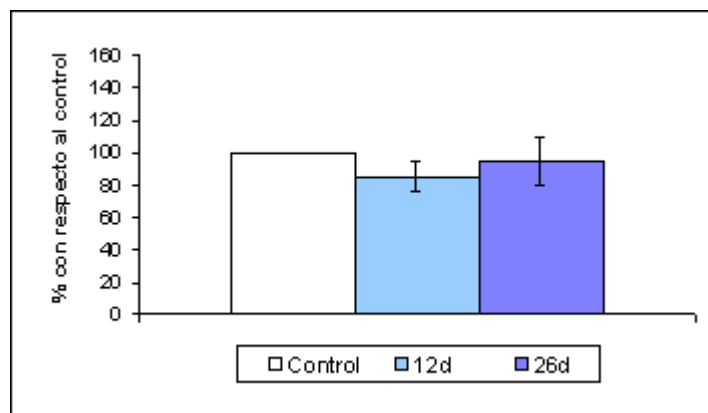


Gráfica 6. Actividad específica de la piruvato carboxilasa en riñón de ratas tratadas con biotina dosis 0.2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una n = 6.

El efecto de la administración de biotina sobre la actividad de la PCC en el riñón también se evaluó. No se observaron diferencias significativas entre la actividad de la enzima renal entre los animales del grupo control y los animales de los grupos tratados con 2 o 0.2 mg de biotina/ kg de peso a ninguno de los días de tratamiento (Gráfica 7 y 8).



Gráfica 7. Actividad específica de la propionil-CoA carboxilasa en riñón de ratas tratadas con biotina dosis 2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una n = 6

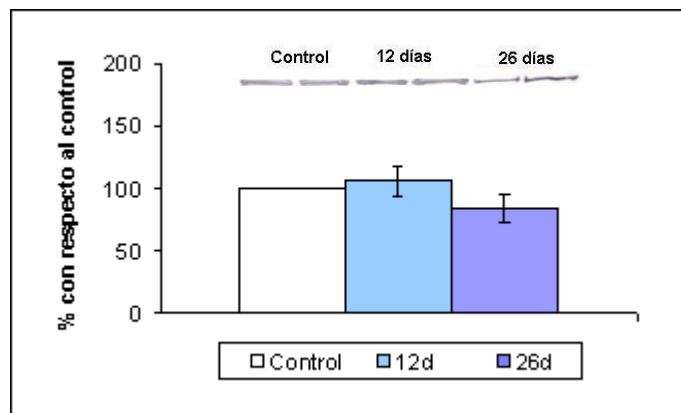


Gráfica 8 Actividad específica de la propionil-CoA carboxilasa en riñón de ratas tratadas con biotina dosis 0.2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una n = 6

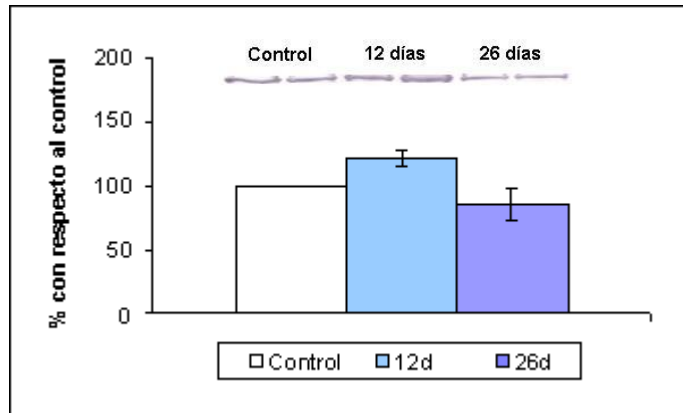
## 7.2 MASA BIOTINILADA

También se determinó el efecto de la administración de diferentes concentraciones de biotina sobre la masa biotinilada de la PC y la PCC.

La gráfica 9 muestra el efecto de la administración de biotina sobre la masa biotinilada de la PC hepática. Los resultados demuestran que la administración intraperitoneal de 2 mg de biotina/ kg de peso durante 12 o 26 días no modificó la masa biotinilada en relación con la actividad observada en las ratas tratadas con el excipiente (PBS). De manera similar, no se observan modificaciones sobre la masa biotinilada de la piruvato carboxilasa hepática, cuando se administró una dosis de biotina de 0.2 mg/kg de peso (Gráfica 10)

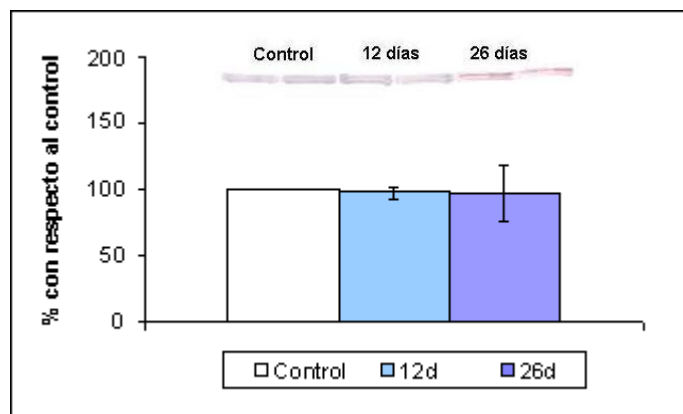


Gráfica 9. Masa biotinilada de la piruvato carboxilasa en hígado de ratas tratadas con biotina dosis 2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una n = 6.

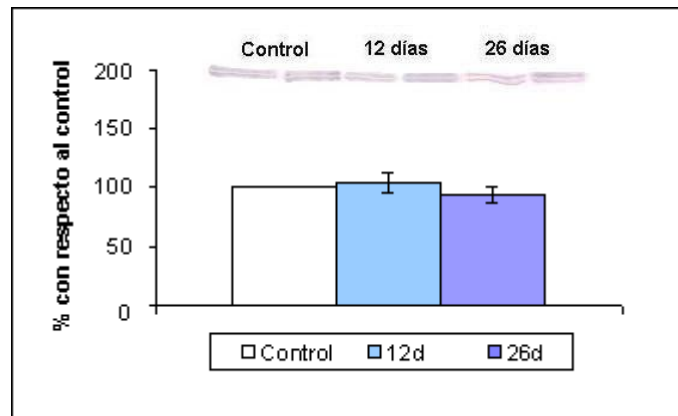


Gráfica 10. Masa biotinilada de la piruvato carboxilasa en hígado de ratas tratadas con biotina dosis 0.2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una n = 6.

En la gráfica 11 se presentan los resultados obtenidos en el efecto de la biotina sobre la masa biotinilada de PCC hepática. No se observaron diferencias significativas entre la masa biotinilada de la enzima en las ratas control y las tratadas con dosis de 2 mg/ kg de la vitamina. En la gráfica 12, se muestran los resultados del efecto del tratamiento con biotina con dosis de 0.2 mg/ kg de peso, como puede observarse no existen diferencias significativas entre las ratas del grupo control y a las que se les administró la vitamina en ninguno de los días de tratamiento.

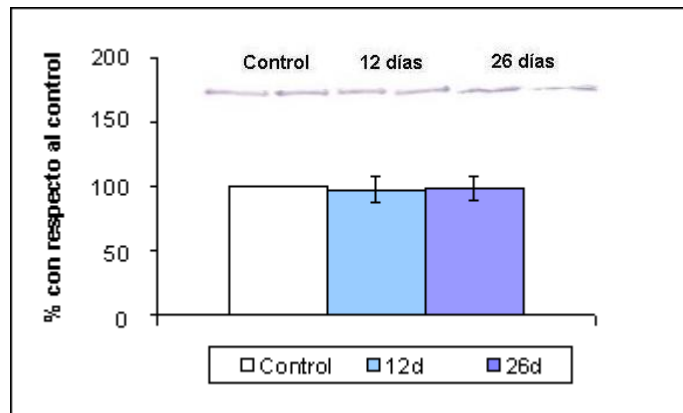


Gráfica 11. Masa biotinilada de la propionil-CoA en hígado de ratas tratadas con biotina dosis 2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una n = 6.

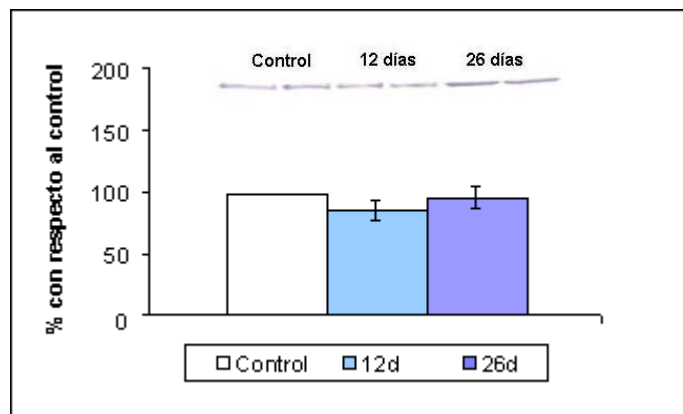


Gráfica 12. Masa biotinilada de la propionil-CoA en hígado de ratas tratadas con biotina dosis 0.2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una n = 6.

También se analizó el efecto de la administración de biotina sobre la masa biotinilada de las carboxilasas en el riñón. La administración de diferentes dosis de la vitamina a los 12 o 26 días no modificó sustancialmente la masa biotinilada de la piruvato carboxilasas (Gráfica 13 y Gráfica 14) observada en las ratas tratadas con el vehículo.

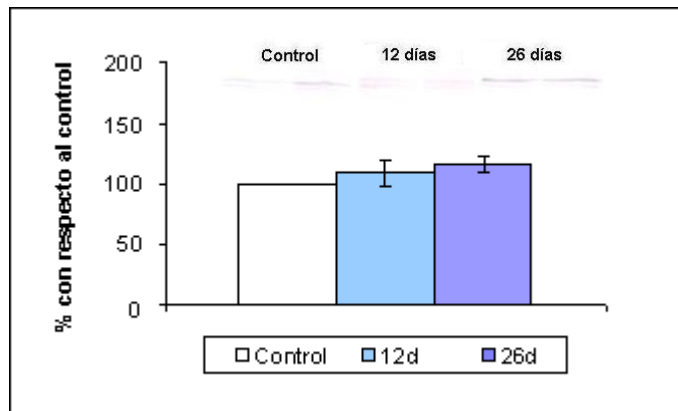


Gráfica 13. Masa biotinilada de la piruvato carboxilasa en riñón de ratas tratadas con biotina dosis 2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una n = 6.

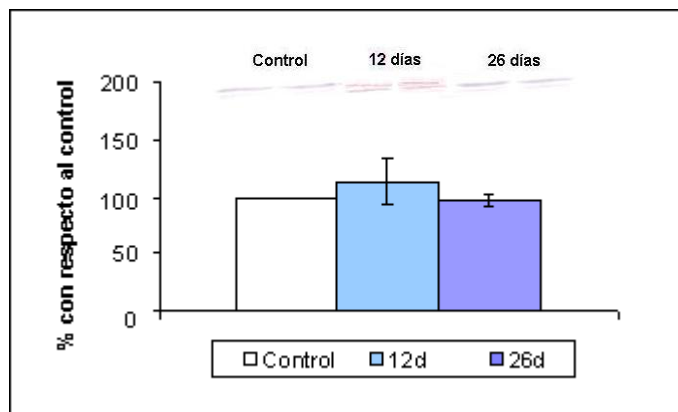


Gráfica 14. Masa biotinilada de la piruvato carboxilasa en riñón de ratas tratadas con biotina dosis 0.2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una n = 6.

El efecto de la administración de biotina sobre la masa biotinilada de la propionil-CoA carboxilasa se evaluó. No se observaron diferencias significativas entre la masa biotinilada de la enzima renal entre los animales del grupo control y los animales de los grupos tratados con 2 o 0.2 mg de biotina por kg de peso a ninguno de los días de tratamiento (Gráfica 15 y 16).



Gráfica 15. Masa biotinilada de la propionil-CoA en riñón de ratas tratadas con biotina dosis 2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una n = 6.



Gráfica 16. Masa biotinilada de la propionil-CoA en riñón de ratas tratadas con biotina dosis 0.2 mg/ kg. Cada columna representa la media  $\pm$  error estándar de una n = 6.



## 8. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Estudios previos en nuestro laboratorio encontraron que la administración de 15 mg al día de biotina (aproximadamente 0.2 mg/ kg de peso) incrementa la actividad de las carboxilasas en linfocitos humanos (Báez-Saldaña y cols., 2004.). Los resultados de esta tesis muestran que la administración de dosis equivalentes a las administradas en humanos, no modificó ni la actividad ni la masa biotinilada de las enzimas piruvato carboxilasa y propionil-CoA carboxilasa ni en el hígado ni en el riñón. La administración de dosis de biotina 10 veces mayores, 2 mg/ kg de peso, dosis que en estudios en ratas han mostrado tener efectos en el metabolismo de los carbohidratos (Dakshinamurti y cols., 1994 ), tampoco modificó la actividad ni la masa biotinilada de las carboxilasas. Hubiese sido muy importante evaluar en este trabajo el efecto de la biotina sobre la actividad de la carboxilasas y la masa biotinilada en los linfocitos de la rata para poder comparar los resultados con los obtenidos en linfocitos humanos, observación que dio pauta a estos estudios. Sin embargo, aunque estos análisis se realizaron, ambas técnicas no tuvieron la sensibilidad necesaria para detectar a las carboxilasas de los linfocitos, lo que indica que la cantidad de las holocarboxilasas así como la actividad de estas enzimas es muy baja en estas células en las ratas.

Los efectos de la administración de dosis supra fisiológicas de biotina en diferentes tejidos ha sido poco estudiada. Estudios efectuados por Lewis y cols en el 2001, en el hígado analizando el efecto de diferentes dosis de biotina sobre la masa biotinilada de las carboxilasas, encontraron que la ingestión de dietas conteniendo dosis farmacológicas de biotina (aproximadamente 6 mg/ kg peso) durante 21 días produjo una disminución de la masa biotinilada de propionil-CoA carboxilasa, sin afectar a la masa de la piruvato carboxilasa. Las dosis usadas en nuestros estudios fueron 3 y 30 veces menores, lo cuál podría explicar las diferencias obtenidas entre nuestros resultados y los datos obtenidos por Lewis. Otra posibilidad de estas diferencias podría estar relacionada con la vía de administración: en nuestra experimentación la administración se efectuó intraperitonealmente, en tanto que en los experimentos de Lewis la biotina formaba parte de la dieta. Nosotros especulamos que la asimilación de

la biotina en la dieta, al ser más fisiológica y gradual podría ser manejada de manera diferente a la administración aguda intraperitoneal usada en nuestra investigación. Esta hipótesis se encuentra investigándose actualmente en el laboratorio, los resultados preliminares indican que la ingesta de 5-10 mg/ kg de peso, a través de una dieta suplementada con biotina (datos no publicados), no modifican la actividad de las carboxilasas en el hígado. No se consideró el evaluar el efecto de la biotina administrada por vía intraesofágica debido al estrés que se produce al animal y porque existen reportes que señalan que los glucocorticoides, hormonas producidas en estados de estrés, modifican el metabolismo de la biotina incrementando su excreción y sus concentraciones plasmáticas (Rathman y cols., 2002).

Con base en nuestros estudios en humanos, la hipótesis al inicio de este trabajo propuso que si la administración de dosis terapéuticas de biotina era capaz de incrementar la actividad de las carboxilasas en linfocitos, era posible que estas dosis de biotina modificasen la actividad de las carboxilasas en otros tejidos. Asumiendo que no existiesen diferencias de especie entre las carboxilasas, de acuerdo con nuestros resultados se podría proponer que la diferente respuesta a dosis terapéuticas de biotina entre las carboxilasas en linfocitos y las carboxilasa hepáticas y renales, podría deberse a distinta regulación de la expresión de las isoenzimas en los diferentes tejidos. Como se señaló en la introducción, en mamíferos la PC es codificada por un solo gen que da lugar a varias isoformas de mRNA, siendo la expresión de estas isoformas tejido-específica, por lo que podría ser posible que dosis farmacológicas de biotina regularan de manera tejido específica la expresión de la PC. No se sabe si la PCC posee isoenzimas. Otra posibilidad sería que las carboxilasas en el hígado y en el riñón se encontrasen en su forma de holocarboxilasas, en tanto que en los linfocitos parte de las enzimas se encontrasen en su forma de apoenzima, de tal manera que la llegada de un exceso de biotina forzase su transformación a la forma de holoenzima activa.

## **9. PERSPECTIVAS.**

Diseñar metodologías con la sensibilidad adecuada para determinar el efecto de dosis farmacológicas de biotina sobre la actividad de las carboxilasas y la masa biotinilada en los linfocitos de rata, con el fin de determinar si el incremento sobre la actividad de estas enzimas observada en humanos se produce también en este roedor; esto permitiría definir si las carboxilasas de los linfocitos de rata y humano responden de similar manera a dosis farmacológicas de biotina.

Alternativamente, se podría establecer un protocolo experimental para obtener biopsias de hígado de humano y comparar el efecto de dosis farmacológicas de biotina sobre la actividad y masa biotinilada de las carboxilasa hepáticas, con el fin de determinar si el efecto de la vitamina sobre las carboxilasas hepáticas y renales es similar entre la rata y el humano.

Analizar el efecto de la administración oral de biotina sobre la actividad y masa biotinilada de las carboxilasas en diferentes tejidos, experimentos que como se mencionó en la discusión, se encuentran en desarrollo.

## **10. CONCLUSIÓN**

La administración intraperitoneal de biotina a dosis farmacológicas de 0.2 mg/ kg y 2 mg/ kg) no modifican ni la actividad ni masa biotinilada de la piruvato carboxilasa y propionil-CoA carboxilasa hepática y renal.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Achuta Murthy PN, Mistry SP. Biotin. *Prog Food Nutr Sci* 2: 405-455. 1977.
2. Appel A y Briggs M. The Vitamins-Biotina. *The Foundations of Nutrition*. Págs 274-279. 1998
3. Baez-Saldana A, Zendejas-Ruiz I, Revilla-Monsalve C, Islas-Andrade S, Cardenas 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*. Feb;79(2):238-43. 2004
4. Baumgartner MR, Dantas MF, Suormala T, Almashanu S, Giunta C, Friebel D, Gebhardt B, Fowler B, Hoffmann GF, Baumgartner ER, Valle D. Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: evidence for an allele-specific dominant negative effect and responsiveness to biotin therapy. *Am J Hum Genet*. Nov;75(5):790-800. Epub 2004 Sep 9. 2004
5. Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. (review). *J Lipid Res*; 43(11):1773-808. 2002
6. Bartlett K, Horsburgh T, Gompertz D. The relationship between plasma biotin concentration and circulating leucocyte beta-methylcrotonyl-CoA carboxylase and propionyl-CoA carboxylase. *Clin Sci (Lond)*. Jan;58(1):111-4. 1980
7. Boone AN, Rodrigues B, Brownsey RW. Multiple-site phosphorylation of the 280 kDa isoform of acetyl-CoA carboxylase in rat cardiac myocytes: evidence that cAMP-dependent protein kinase mediates effects of beta-adrenergic stimulation. *Biochem J*. Jul 15;341 (Pt 2):347-54. 1999
8. Borboni P, Magnaterra R, Rabini RA, Staffolanni R, Porzio O, Sesti G, Fusco A, Mazzanti L, Lauro R, Marlier JNJL. Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured  $\beta$ -cell. *Acta Diabetol*; 33: 154-158. 1996
9. Burri BJ, Sweetman L, Nyhan WL. Heterogeneity of holocarboxylase synthetase in patients with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Am J Hum Genet*. Mar;37 (2):326-37. 1985
10. Campeau E, Dupuis L, Leon-Del-Rio A, Gravel R. Coding sequence mutations in the alpha subunit of propionyl-CoA carboxylase in patients with propionic acidemia. *Mol Genet Metab*. May;67(1):11-22.1999
11. Chandler S, Ballard J. Distribution and degradation of biotin-containing carboxylases in human cell lines. *J Biochem*; 232:385-393, 1985.

12. Chapman A, Cronan E. The enzymatic biotinylation of proteins: a posttranslational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem Sci*; 24:359-363, 1999.
13. Chatterjee N, Kumar C, Ortiz A, Rubin S, Said H. Molecular mechanism of the intestinal biotin transport process. *Am J Physiol*; 277 (46): C605-C613. 1999
14. Chauhan J., Dakshinamurti KC. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem*; 266: 10035-10038. 1991.
15. Coggeshal JC, Heggors JP, Robson MC, Beker H. Biotin status and plasma glucose in diabetes. *Ann NY Acad Sci*; 447: 389-392. 1985
16. Cohen N, Thomas M. Biotin transport into fully differentiated 3T3-L1 cells. *Biochim Biophys Res Comm*; 108 (4): 1508-1516. 1982
17. Combo G. The vitamins fundamental aspects in nutrition and health. 2<sup>nd</sup> Ed. Academia Press, Inc. San Diego, California. Págs 9-46, 1998.
18. Combs Jr GF. The Vitamins: Fundamental aspects in Nutrition and Health. 2nd Ed. San Diego: Academic Press; 1992
19. Council on Scientific Affairs. Vitamins preparations as dietary supplements and as therapeutic agents. *J. A. M. A.*; 257, 1929-1936, 1987.
20. Crisp SE, Griffin JB, White BR, Toombs CF, Camporeale G, Said HM, Zemleni J. Biotin supply affects rates of cell proliferation, biotinylation of carboxylases and histones, and expression of the gene encoding the sodium-dependent multivitamin transporter in JAr choriocarcinoma cells. *Eur J Nutr*; 43(1):23-31. 2004
21. Dakshinamurti K y Chauhan, J. Regulation of the biotin enzymes. *Ann Rev Nutr*; 8:211-233. 1988
22. Dakshinamurti K, Cheah-Tan C. Liver glucokinase of the biotin deficient rat. *Can J Biochem*; 46(1):75-80, 1968.
23. Dakshinamurti K, Ho Chong Hong. Regulation of key hepatic glycolytic enzymes. *Enzymol Biol Clin*; 11(5):423-428, 1970.
24. Dakshinamurti K y Mistry SP. Tissue and intracellular distribution of biotin-<sup>14</sup>C<sup>14</sup>OOH in rats and chicks. *J Biol Chem*; 266: 294-296. 1963
25. Dakshinamurti K, Li W. Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem*; 132: 127-132. 1994

26. De la Vega, L, Stockert R. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol- Cell Physiol*; 279 (6): C2037-C2042. 2000
27. Desviat LR, Perez-Cerda C, Perez B, Esparza-Gordillo J, Rodriguez-Pombo P, Penalva MA, Rodriguez De Cordoba S, Ugarte M. Functional analysis of MCCA and MCCB mutations causing methylcrotonylglycinuria. 1: *Mol Genet Metab. Nov*;80(3):315-20. 2003
28. Diachrome®, Nutrition 21, NY
29. Fernandez-Mejia C. Pharmacological effects of biotin. *J Nutr Biochem*; Jul;16(7):424-7. 2005.
30. Frantisek K, Darigo D, Rosenberg E. Isolation and characterization of propionyl-CoA carboxylase from normal human liver. *J Biol Chem*; 255:60-65, 1980.
31. Goodman G. Bases farmacológicas de la terapéutica. Vol. 2. 9a Ed, Mc Graw-Hill- Interamericana de España. Págs 1471-1474, Madrid 1996
32. Gompertz D, Bartlett K, Blair D, Stern CM. Child with a defect in leucine metabolism associated with beta-hydroxyisovaleric aciduria and beta-methylcrotonylglycinuria. *Arch Dis Child. Dec*;48(12):975-7. No abstract available. 1973
33. Grafe F, Wohlrab W, Neubert RH, Brandsch M. Transport of biotin in human keratinocytes. *J Invest Dermatol. Mar*;120(3):428-33. 2003
34. Gyorgy P. Kuhn R, Lederer E. Attempts to isolate the factor (Vitamin h) curative of egg white injury. *J Biol Chem* 131, 745-749, 1939
35. Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B. Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem Mol Med*; 56: 76-83. 1995
36. Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta*; 225: 1-11. 1996
37. Hymes J, Wolf B. Human biotinidase isn't just for recycling biotin. Review. *J Nutr*; 129(2S Suppl):485S-489S. 1999
38. Jitrapakdee S, Booker GW, Cassady AI, Wallace JC. Cloning, sequencing and expression of rat liver pyruvate carboxylase. *Biochem J*; 316:631-7, 1996
39. Jitrapakdee S, Wallace C. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J*; 340:1-16, 1999.

40. Jitrapakdee S, Wallace JC. The biotin enzyme family: conserved structural motifs and domain rearrangements. *Curr Protein Pept Sci*; 4(3): 217-229. 2003
41. Kim, K.-H., Lopez-Casillas, F., Bai, D.H., Lou, X. and Paper, M.E. *FASEB J*; 3, 2250-2256. (1989)
42. Leon-Del-Rio A, Velazquez A, Vizcaino G, Robles-Diaz G, Gonzalez-Noriega A. Association of pancreatic biotinidase activity and intestinal uptake of biotin and biocytin in hamster and rat. *Ann Nutr Metab*; 34(5):266-72, 1990
43. Mackall JC and Lane MD. Role of pyruvate carboxylase in fatty acid synthesis: alterations during preadipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 79, 720-725, 1977
44. 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*; 14: 211-218. 1993.
45. Manthey KC, Griffin JB, Zempleni J. Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in Jurkat cells. *J Nutr*; 132 (5): 887-892. 2002
46. Manthey KC, Griffin JB, Zempleni J. Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in Jurkat cells. *J Nutr. May*;132(5):887-92. 2002
47. Mayer F, Wallace JC, Keech DB. Further electron microscopic studies on pyruvate carboxylase. *Eur J Biochem*;112:265-72. 1980
48. Miller AL, Atkinson DE. Response of yeast pyruvate carboxylase to the adenylate energy charge and other regulatory parameters. *Arch Biochem Biophys*;152:531-8. 1972
49. Mock, D. M. Biotin. In: *Present Knowledge in Nutrition*, Ziegler and Filer. Washington, DC: International Life Sciences Institutes Nutrition Foundation. Págs. 220–235. 1996.
50. Moss J, Lane MD. The biotin-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*; 35:321-442. 1971
51. Myers DE, Tolbert B, Utter M F. Activation of yeast pyruvate carboxylase: interaction between acyl-Coenzyme A compounds, aspartate and substrates of reaction. *Biochem*; 22:5090-6. 1983



52. Narang MA, Dumas R, Ayer LM, Gravel RA. Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase. *Hum Mol Genet.*; 1, 13(1):15-23. 2004
53. Osmani SA, Scrutton MC, Mayer F. The structure and regulation of fungal pyruvate carboxylase. *Ann N Y Acad Sci.*;447:56-71. 1985
54. Owen OE, Patel MS, Block BS, Kreulen TH, Reichle FA and Mozzoli MA in *Gluconeogenesis* (Hanson RW and Mehlman MA, eds), pp. 533-558, 1976
55. Packman S, Cowan MJ, Golbus MS, Caswell NM, Sweetman L, Burri BJ, Nyhan WL, Baker H. Prenatal treatment of biotin responsive multiple carboxylase deficiency. *Lancet.* Jun 26;1(8287):1435-8. 1982
56. Perez-Cerda C, Clavero S, Perez B, Rodriguez-Pombo P, Desviat LR, Ugarte M. Functional analysis of PCCB mutations causing propionic acidemia based on expression studies in deficient human skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* May 20;1638(1):43-9. 2003
57. Peters DM, Griffin JB, Stanley JS, Beck MM, Zemleni J. Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones in Jurkat cells. *Am J Physiol Cell Physiol*; 283(3):C878-84. 2002
58. Petrelli F, Coderoni S, Moretti P, Paparelli M. Effect of biotin on phosphorylation, acetylation, methylation of rat liver histones. *Mol Biol Rep*; 16;4(2):87-92. 1978
59. Prasad P, Wang H, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Devoe LD, Ganapathy V. Molecular and functional characterization of the intestinal Na<sup>+</sup>-dependent multivitamin transporter. *Arch Biochem Biophys.* Jun 1;366(1):95-106.1999
60. Prasad P, Ganapathy V. Structure and function of mammalian sodium-dependent multivitamin transporter. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* Jul;3(4):263-6. Review. 2000
61. Rathman SC, Lewis B, McMahan RJ. Acute glucocorticoid treatment increases urinary biotin excretion and serum biotin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Mar;282(3):E643-9. 2002
62. Reddi A, De Angelis B, Frank O, Iasker N, Baker H. Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci*; 42: 1323-1330. 1988
63. Revilla-Monsalve C, Zendejas-Ruiz I, Islas-Andrade S, Baez-Saldana A, Palomino-Garibay MA, Hernandez-Quiroz PM, Fernandez-Mejia C. Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomed Pharmacother*; May;60(4):182-185. Epub 2006 Mar 31. 2006.

64. Robinson M, White FJ, Cleary MA, Wraith E, Lam WK, Walter JH. Increased risk of vitamin B12 deficiency in patients with phenylketonuria on an unrestricted or relaxed diet. *J Pediatr.* Apr;136(4):545-7. 2000
65. Rodríguez-Melendez R. Importance of biotin metabolism. 1: *Rev Invest Clin.* Mar-Apr;52(2):194-9. 2000
66. Rodríguez-Melendez R, Cano S, Mendez ST, Velazquez A. Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J Nutr;* 131: 1909-1913. 2001
67. Rodríguez-Melendez R, Camporeale G, Griffin JB, Zempleni J. Interleukin-2 receptor  $\gamma$ -dependent endocytosis depends on biotin in Jurkat cells. *Am J Physiol Cell Physiol;* 284: C415-421. 2003
68. Rodríguez-Melendez R, Zempleni J. Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem;* 14: 680-690, 2003
69. Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM, Wang J, Fernandez-Mejia C. Biotin Regulation of Pancreatic Glucokinase and Insulin in Primary Cultured Rat Islets and in Biotin Deficient Rats. *Endocrinology;* 140; 4595-4600. 1999
70. Rothman DL., Magnusson I, Katz LD, Shulman RG and Schulman GI. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with  $^{13}\text{C}$  NMR *Science;* 254, 573-576, 1991
71. Scheerger SB, Zempleni J. Expression of oncogenes depends on biotin in human small cell lung cancer cells NCI-H69. *Int J Vitam Nutr Res;* 73(6):461-467. 2003
72. Shils, ME and Young VR. *Modern Nutrition in Health and Disease*, 7th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1988.
73. Solorzano-Vargas S, Pacheco-Alvarez D, Leon-Del-Rio A. Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-depend carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc Natl Acad of Sci;* 99, 8: 5325-5330. 2002
74. Spence JT, Koudelka AP. Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem;* 259 (10): 6393-6396. 1984
75. Stanley JS, Griffin JB, Zempleni J. Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation. *Eur J Biochem;* 268 (20):5424-29. 2001
76. The Merk Index. 12<sup>th</sup> Ed. Merk & Co, Inc. No 1272 pág 207. New Jersey 1996.

77. Vesely D. Biotin enhances guanylate cyclase activity. *Science*; 216: 1329-1330. 1982
78. Wallace JC, Phillips NB, Snoswell MA, Goodall GJ, Attwood PV, Keech DB. Pyruvate carboxylase: mechanisms of the partial reactions. *Ann N Y Acad Sci*; 447:169-88, 1985
79. Wallace JC, Jitrapakdee S, Chapman-Smith A. Pyruvate carboxylase. *Int J Biochem Cell Biol*. Jan;30(1):1-5 1998
80. Wang H, Huang W, Fei YJ, Xia H, Yang-Feng TL, Leibach FH, Devoe LD, Ganapathy V, Prasad PD. Human placental Na<sup>+</sup>-dependent multivitamin transporter. Cloning, functional expression, gene structure, and chromosomal localization. *J Biol Chem*. May 21; 274(21):14875-83. 1999
81. Weiner DL, Grier RE, Wolf B. A bioassay for determining biotinidase activity and for discriminating biocytin from biotin using holocarboxylase synthetase-deficient cultured fibroblasts, *J Inher Metab Dis* 8; Págs 101 - 102, 1985
82. Wiedmann S, Rodriguez-Melendez R, Ortega-Cuellar D, Zempleni J. Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr Biochem*; 15(7):433-9. 2004
83. Wolf B. Disorders of biotin metabolism in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, ed. Scriver CR. Vol III, 7th ed. McGraw-Hill. Págs. 3151-3177, 1995.
84. Wolf B, Heard GS. Biotinidase deficiency. *Adv Pediatr*. 38:1-21. 1991
85. Wolf B, Rosenberg LE. Stimulation of propionyl CoA and beta-methylcrotonyl CoA carboxylase activities in human leukocytes and cultured fibroblasts by biotin. *Pediatr Res*. Nov; 13(11):1275-9. 1979
86. Yoshikawa H, Tajiri Y, Sako Y, Hashimoto T, Umeda F, Nawata H. Effects of biotin on glucotoxicity of lipotoxicity in rat pancreatic islets. *Metabolism*; 51(2): 163-168. 2002
87. Zhang H, Osada K, Maebashi M, Ito M, Komai M, Furukawa Y. A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol*; 42(6):517-526. 1996
88. Zempleni J, Helm RM, Mock DM. In vivo biotin supplementation at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release. *J Nutr*; 131(5):1479-1484. 2001

### III APÉNDICE

#### ACRILAMIDA 30% (100m L)

Acrilamida	29.1 g
Bis-Acrilamida	0.9 g
H <sub>2</sub> O DI c.b.p.	100 mL

#### AMORTIGUADOR DE BLOQUEO (100 mL)

Leche descremada	5 g
TBS pH 7.4 c.b.p.	100 mL

#### AMORTIGUADOR DE CORRIDA (1 L)

TRIS-Base	30.3 g
Glicina	144.2 g
SDS	10.0 g

#### AMORTIGUADOR DE MUESTRA (50 mL)

TRIS-HCl pH 6.8	2.5 mL
SDS	1 g
Glicerol	5.8 mL
Azul de bromofenol	5 mg
H <sub>2</sub> O DI c.b.p.	50 mL

#### AMORTIGUADOR DE REVELADO AP

#### AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA (2 L)

TRIS-Base	6.04 g
Glicina	28.82 g
Metanol	400 mL

#### PBS (1L)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.42 g
NaCl	9 g

ROJO DE PONCEAU (1 L)

Concentrado de rojo de Ponceau	10 mL
H <sub>2</sub> O DD c.b.p.	100 mL

TBS (1 L)

TRIS-Base	2.423 g
NaCl	29.5g

TBS TWEEN 0.1% (1 L)

TRIS-Base	2.423 g
NaCl	29.5g
Tween 20	1 mL