



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EFFECTO DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO I SIMILAR A LA
INSULINA (IGF-I) EN RATONES
DEFICIENTES DE BIOTINA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

GEORGINA DEL VECCHYO TENORIO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ARMIDA BÁEZ SALDAÑA

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

Esta tesis se realizó con el apoyo a los Proyectos de Investigación PAPIIT IN230905 e IN224308 y del Proyecto 52746 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

A los miembros del Comité Tutorial:

Dra. Armida Báez Saldaña

Dra. María Cristina Regina Fernández Mejía

Dr. Rogelio Hernández Pando

Por sus observaciones y sugerencias durante el desarrollo del proyecto para esta Tesis y en las presentaciones en los Exámenes Tutorales.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A los miembros del Jurado:

M. en C. Ernesto Ávila González

Dra. Sylvia Leticia Verdugo Díaz

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Por sus observaciones, comentarios y sugerencias para corregir la Tesis.

A la M.V.Z. Georgina Díaz Herrera por el cuidado y atenciones dados por el Bioterio a los ratones utilizados en este proyecto.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina con quien compartimos el laboratorio bajo su cargo.

Dedicatoria

A mis padres que siempre me apoyaron y me inculcaron el interés por la ciencia y la razón.

Índice	Página
Índice de Figuras.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
1. ANTECEDENTES.....	8
1.1 Síntesis y metabolismo de la Biotina.....	8
1.2 Otras funciones de la Biotina.....	9
1.3 Deficiencia de biotina en animales de experimentación.....	12
1.4 Contenido de Biotina en muestras biológicas.....	13
1.5 Deficiencia de biotina y consumo de alimento en animales de laboratorio.....	13
1.6 Hormona del Crecimiento (GH) y Factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-I).....	14
1.7 Modificaciones Génicas del sistema GH/IGF-I.....	15
1.8 Nutrición y sistema GH/IGF-I.....	16
1.9 Métodos de administración de IGF-I.....	17
2 HIPÓTESIS.....	18
3 OBJETIVOS.....	18
4 METODOLOGÍA.....	18
5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
6 RESULTADOS.....	20
7 DISCUSIÓN.....	28
8 CONCLUSIONES.....	32
9 REFERENCIAS.....	33

Índice de Figuras	Página
Figura 1 Estructura química de la biotina.....	8
Figura 2 Ciclo de la Biotina.....	10
Figura 3 Consumo de alimento.....	21
Figura 4 Consumo de alimento relativo al peso corporal.....	22
Figura 5 Peso corporal.....	23
Cuadro 1 Pesos Corporales.....	24
Figura 6 Peso Corporal con IGF-I o placebo.....	25
Figura 7 Peso Corporal con dieta Deficiente de Biotina e IGF-I o placebo.....	25
Figura 8 Longitud del fémur.....	26
Figura 9 Peso del fémur.....	27

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B esencial en la dieta de los mamíferos y ubicada en los seres vivos, está involucrada en el metabolismo celular intermedio, en donde actúa como grupo prostético de 5 enzimas carboxilasas y tiene otras funciones no prostéticas relacionadas con la regulación de la expresión génica y el ciclo celular. La deficiencia de biotina, produce pérdida de peso en animales de experimentación, efecto que se ha reportado como consecuencia de una menor ingesta de alimento. Además, en ratones deficientes de biotina se observan concentraciones séricas alteradas de los factores de crecimiento generales conocidos como Hormona de Crecimiento (GH) y Factor de Crecimiento I similar a la Insulina (IGF-I). Estas observaciones ameritan mayor estudio, dado que la GH controla el crecimiento corporal de los mamíferos mediante la estimulación de la síntesis de proteínas, la proliferación celular y el crecimiento de los tejidos, particularmente de cartílago, hueso y músculo esquelético. A su vez, la mayoría de las acciones de la GH se efectúan a través del IGF-I, el cual incrementa la síntesis de proteínas e inhibe la proteólisis de diversos tejidos, como el hueso y el músculo esquelético. Por otra parte, es bien conocido que, en todos los seres vivos, la desnutrición produce pérdida de peso. En este trabajo se estudia el consumo específico de alimento por los ratones que reciben una dieta que además de carecer de biotina, la elimina; y las acciones de un suplemento de IGF-I sobre el desarrollo corporal de estos animales.

OBJETIVOS: General: Comprobar si la reducción en el crecimiento corporal y las bajas concentraciones séricas de IGF-I en ratones deficientes de biotina, son consecuencia de la desnutrición. Determinar si el menor desarrollo corporal de estos animales se corrige con la administración de IGF-I.

Específicos: 1) Medir el consumo de alimento de ratones de laboratorio alimentados con tres dietas que contienen diferentes cantidades de biotina. **2)** Comparar la interacción de IGF-I con el desarrollo de ratones de laboratorio alimentados con tres dietas que contienen diferentes cantidades de biotina; determinando el consumo de alimento, el peso corporal y la longitud y peso del fémur.

METODOLOGÍA: Se utilizaron tres lotes de ratones macho de la cepa BALB/cAnN de tres semanas de edad. Todos ellos recibieron una de tres dietas; a) dieta control, b) dieta suficiente de biotina y c) dieta deficiente de biotina. En los lotes 1 y 2 (n = 50 ratones) y durante 20 semanas, se determinó el peso corporal una vez por semana y el consumo de alimento tres veces por semana. En el lote 3 (n = 18 ratones), a partir de la 4ª semana de estudio y durante 4 semanas más, se les implantaron microbombas osmóticas para administrarles IGF-I (1 mg IGF-I / 2 mL).

RESULTADOS: En los ratones del lote 1, el consumo diario de alimento por cada ratón fue alrededor de 2.9 g para los grupos con dieta control y dieta suficiente de biotina, mientras que en el grupo con dieta deficiente de biotina fue menor (1.9 g de alimento). Cuando se calculó el consumo específico de alimento (alimento consumido / gramo de peso corporal * día) no hubo diferencias entre los tres grupos que recibieron las dietas con distintas cantidades de biotina. Con las dietas control y suficiente de biotina, los ratones aumentaron de peso durante las 20 semanas, alcanzando 27.4 ± 2.75 g. En cambio, los ratones alimentados con dieta deficiente de biotina alcanzaron su peso máximo a la cuarta semana (17.7 ± 1.5 g), manteniéndolo así hasta la 9ª semana y perdiendo peso a partir de la 10ª semana, terminando con 13.75 ± 1.7 g. a las 20 semanas de experimentación.

En el lote 2, los ratones del grupo con dieta deficiente de biotina y sometido durante 4 semanas a la administración de IGF-I, aumentaron 1.33 g (6.9%); mientras que los que recibieron placebo ganaron 0.74 g (4.3%). Así mismo, la administración de IGF-I no modificó el patrón de ganancia de peso de los ratones alimentados con dietas control y suficiente de biotina, ni influyó en la longitud y el peso del fémur de los tres grupos.

CONCLUSIONES: En este trabajo se reprodujeron los efectos de la deficiencia de biotina en el crecimiento corporal en los ratones macho BALB/cAnN. Este estudio es el primero en el que se usan microbombas osmóticas con IGF-I en ratones con dieta deficiente de biotina y aunque los resultados son preliminares, permiten concluir que la administración de IGF-I durante 4 semanas, restaura sólo ligeramente la ganancia de peso, sin efectos adicionales ni en el consumo diario de alimento, ni en la longitud y peso del fémur.

Abreviaturas utilizadas: GH (Hormona del crecimiento), IGF-I (Factor de crecimiento I similar a la insulina)

ABSTRACT

INTRODUCTION: Biotin is a water soluble B complex vitamin that is essential in the mammal diet and is ubiquitous in all living beings. It is involved in the intermediate metabolism of the cell, where it is a prosthetic group for 5 carboxylase enzymes and also has important non-prosthetic functions related with gene expression and the cell cycle. Biotin deficiency produces weight loss in laboratory animals, this effect had been reported as a low food intake consequence. Besides, altered serum concentrations of the general growth factors known as Growth Hormone (GH) and Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) can be observed in biotin deficient mice. Those observations deserve more studies, given that the GH regulates the corporal growth in mammals through the stimulation of protein synthesis, cell proliferation and tissue growth, particularly cartilage, bone and skeletal muscle. Almost all of the GH actions are done through the IGF-I, which increases protein synthesis and inhibits proteolysis in several tissues, such as bone and skeletal muscle. Additionally, it is well known that in all living beings, malnutrition produces weight loss. This work studies the specific food intake of mice fed with a biotin depleting diet and the possible actions of an IGF-I supplement in the corporal development of these animals.

OBJECTIVES: General. To verify whether the body growth reduction and the low serum IGF-I concentrations in biotin deficient laboratory mice are consequences of malnutrition. To determine if the low corporal development of these animals is corrected with IGF-I administration.

In detail: 1) To measure the food intake in laboratory mice fed with three diets, each one with different biotin contents. **2)** To compare the IGF-I interaction with development in laboratory mice fed with three diets, each one with different biotin contents, determining the food intake, body weight, and femur length and weight.

METHODS: Three lots of BALB/cAnN strain male mice of 3 week of age were used. Every one received one of three diets: a) control diet, b) biotin deficient diet and, c) biotin sufficient diet. In lots 1 and 2 (n = 50 mice) and during 20 weeks, body weight was determined once every week and food intake three times per week. From the fourth week of study and during 4 weeks more, in lot 3 (n = 18 mice), osmotic micropumps were implanted to administer an IGF-I solution (1 mg IGF-I/ 2 mL).

RESULTS: In the mice lot 1, average daily food intake per mouse was 2.9 g for the control and biotin sufficient diet groups, while it was lower in the biotin deficient group (1.9 g of food). When daily food intake by body weight (food intake / body weight gram*day) was calculated, there were no differences between the three groups who received the diets with different biotin contents. The mice with the control and biotin sufficient diets showed body weight gain during the 20 weeks of study, reaching 27.4 ± 2.75 g. On the other side, the biotin deficient mice reached their maximum body weight (17.7 ± 1.5 g) in the fourth week, and it remained constant until the ninth week of the study, and then a weight loss from the tenth week, finishing with 13.75 ± 1.7 g at 20 weeks of study.

In lot 2, the group of the biotin deficient mice administered with IGF-I during 4 weeks increased their body weight gain 1.33 g (6.9%), while the ones who received placebo gained 0.74 g (4.3%). Besides that, the IGF-I administration did not modified the weight gain pattern in the mice fed with control and biotin sufficient diets, and did not influenced the femur length and weight in the three diet groups.

CONCLUSIONS: In this work biotin deficiency effects were reproduced in body growth on male BALB/cAnN mice. This is the first study that uses osmotic micropumps loaded with IGF-I in biotin deficient mice, although the results are preliminary, they let us conclude that IGF-I administration during 4 weeks, lightly restores body weight gain, with no additional effects on daily food intake or femur length and growth.

Abbreviations: GH (Growth Hormone), IGF-I (Insulin-like Growth Factor I)

1. ANTECEDENTES

1.1 Síntesis y metabolismo de la Biotina

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B y como tal debe proveerse en la dieta de los mamíferos ya que estos organismos no la sintetizan. Desde 1936 fue reconocida como un factor esencial de los sistemas vivos. La molécula de biotina consiste en dos anillos heterocíclicos unidos a una cadena de ácido valérico (Figura 1), (1-4)

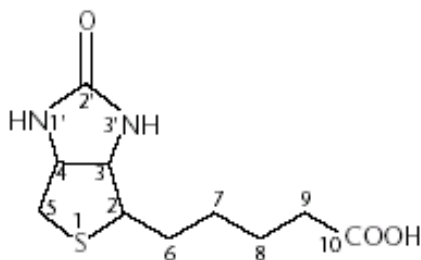


Figura 1. Estructura química de la biotina.

En los mamíferos, la biotina participa directamente en los procesos metabólicos de gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y catabolismo de aminoácidos en donde actúa como grupo prostético de las cinco enzimas carboxilasas que efectúan estas reacciones (Figura 2). Cuatro de estas enzimas, piruvato carboxilasa (PC), propionil coenzima A carboxilasa (PCC), β -metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC) y acetil CoA carboxilasa 2 (ACC2) son mitocondriales y sólo la acetil CoA carboxilasa 1 (ACC1), es citosólica (1-4).

En la célula, la cantidad de biotina libre es controlada por un balance entre la captura y la liberación, así como por el recambio de la unida a las carboxilasas. Para cumplir con los requerimientos de biotina, los organismos han desarrollado un ciclo de

utilización que permite el aprovechamiento de esta vitamina tanto en la célula como en los alimentos (1-4). En los mamíferos, el paso final en la biosíntesis de las carboxilasas es la formación de las holocarboxilasas por medio de la unión covalente de biotina a un residuo específico de lisina en el sitio activo de la apoenzima. Esta reacción es ejecutada por la holocarboxilasa sintasa (HCS) (Figura 2). Al término de su vida, las carboxilasas son degradadas proteolíticamente en el sistema autofágico lisosomal (3). En este proceso, se producen péptidos biotinilados y el dímero biotina-lisina que se conoce como biocitina. La biotina de estos compuestos es liberada por la acción de la enzima biotinidasa, permitiendo que una porción importante de esta vitamina sea reutilizada (Figura 2). La biotinidasa también está presente en la mucosa intestinal de varias especies, en el jugo pancreático y en gránulos de zimógeno de las ratas (2-4) y tiene una función importante en el aprovechamiento de la biotina de la dieta de los mamíferos. La biotina que contienen los alimentos, se encuentra principalmente unida a proteínas, en las cuales después de una proteólisis extensiva en el intestino se produce biotina libre que ahora estará disponible para su absorción y posterior utilización por la HCS.

1.2 Otras funciones de la Biotina

Varios estudios proponen que la biotina puede participar en la regulación de la expresión génica. Por ejemplo, la administración intraperitoneal de biotina a ratas deficientes de esta vitamina, estimula la síntesis de ácido ribonucleico (RNA) total y proteínas totales en el hígado (5), así como la incorporación de aminoácidos en proteínas totales *in vivo* e *in vitro* en hígado, páncreas, mucosa intestinal y piel (6).

La biotinidasa también cataliza tanto la biotinilación como la debiotinilación de las histonas (9). Stanley y colaboradores (8) determinaron que las cinco clases de histonas extraídas de linfocitos humanos pueden ser biotiniladas por la biotinidasa y que

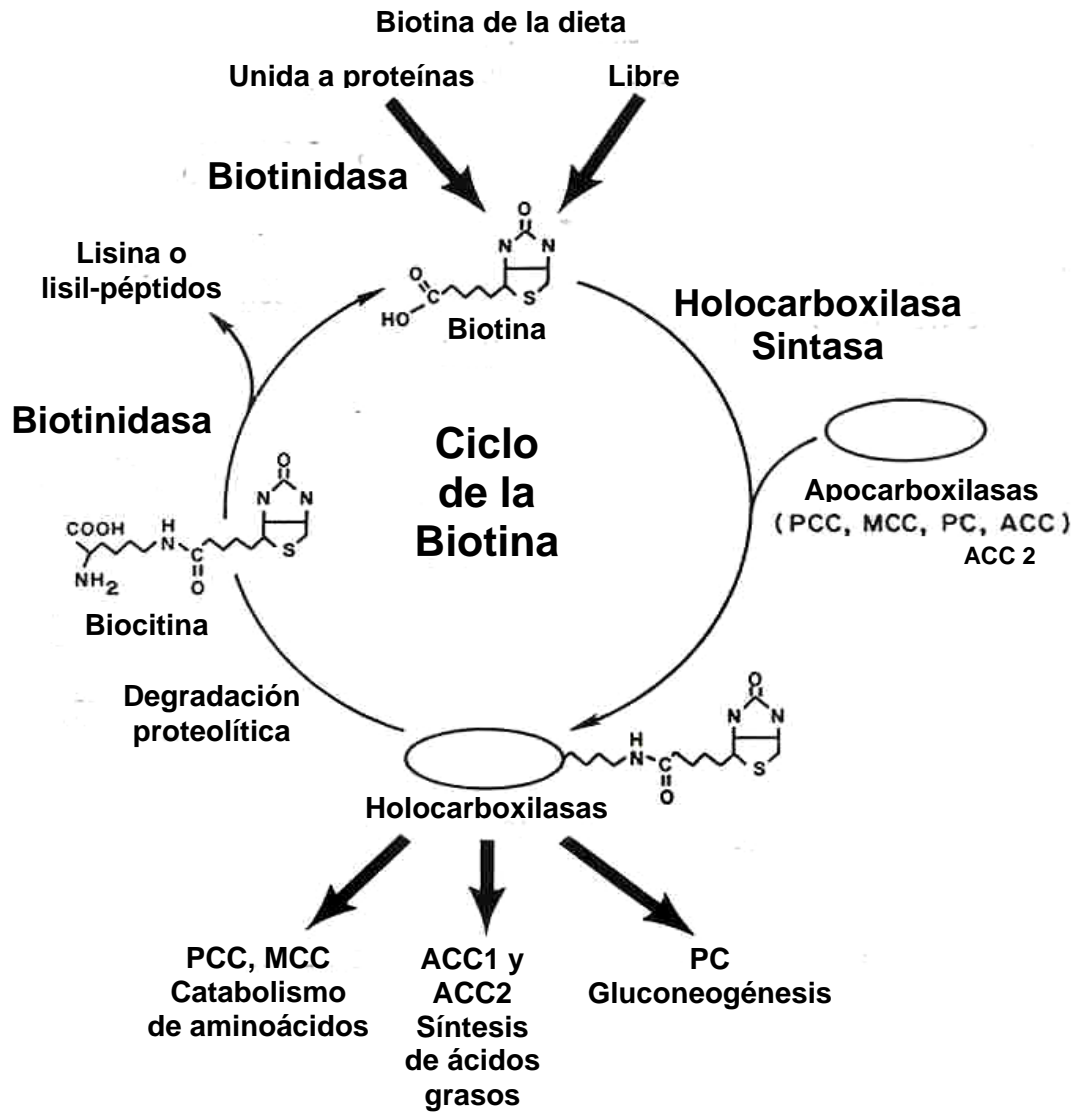


Figura 2. Ciclo de la Biotina. La holocarboxilasa sintasa, une covalentemente a la biotina con las diferentes apocarboxilasas para formar las holocarboxilasas activas. La biotinidasa es una hidrolasa que libera a la biotina de la biocitina y de los péptidos biotinilados pequeños que se formaron por la degradación proteolítica de las holocarboxilasas: piruvato carboxilasa (PC), propionil coenzima A carboxilasa (PCC), β -metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC), acetil CoA carboxilasa 1 (ACC1) y acetil CoA carboxilasa 2 (ACC2) (3).

en estas células varios residuos de lisina en las histonas H2A, H3 y H4 son sitios de biotilación. Algunos de estos residuos de lisina también son sitios de acetilación y metilación. Las especies K8 y K9 de la histona H4 parecen estar participando en la formación de heterocromatina y en el apagado de algunos genes, proceso que puede revertirse al retirar la biotina. En núcleos tanto de tejidos normales como de células tumorales se detecta biotina proponiendo que puede ser la que se encuentra unida covalentemente a las histonas (7).

La suplementación con biotina produce, en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de humanos un aumento en la abundancia de los RNA mensajeros (mRNAs) que codifican para Interleucina- β (IL- β), Interferón- γ (IFN- γ) y para la cadena α de la enzima MCC; mientras que el mRNA que codifica para Interleucina-4 (IL-4) disminuye (10). En las PBMC humanas estimuladas con mitogénos, se incrementa la biotina intracelular desde la fase G₁ y permanece elevada durante las fases S (síntesis de DNA), G₂ y M (mitosis). Además, las actividades específicas y la expresión de los mRNA de las carboxilasas MCC y PCC aumentan durante la proliferación celular (11).

La biotina también regula la expresión de genes críticos en el metabolismo intermedio de los carbohidratos. Estimula la actividad y la transcripción del mRNA de la glucocinasa hepática, siendo esta enzima la que regula la captación de glucosa en el hígado (12, 13). En las células β del páncreas de rata, la biotina estimula la expresión tanto de insulina como de la glucocinasa, la enzima que regula la secreción de insulina en respuesta a cambios en las concentraciones de glucosa en la sangre (17). En ratas diabéticas, la biotina reduce la actividad y expresión del mRNA de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas en

el hígado (14); mientras que la administración de biotina a ratas deficientes de esta vitamina, estimula un incremento en la actividad de la 6-fosfofructocinasa (15 y 16).

1.3 Deficiencia de biotina en animales de experimentación

En 1916 se describió una patología característica en las ratas que recibían dietas con una alta concentración de clara de huevo seca como única fuente de proteínas, a la que se llamó “el daño de la clara de huevo”. Estos animales desarrollaron un síndrome caracterizado por trastornos neuromusculares, dermatitis severa y pérdida de pelo. Posteriormente se demostró que esta condición es prevenida cuando la clara de huevo se desnaturaliza con calor o por la administración de alimentos adicionales como levadura, hígado o un compuesto de la yema de huevo que promueve el crecimiento de la levadura. Este último compuesto fue identificado posteriormente como biotina y la glicoproteína avidina como la causante del “daño de la clara de huevo” (1, 3).

Además de la rata, los trastornos producidos por la deficiencia de biotina se han estudiado en varios animales de experimentación. Por ejemplo, en pollos alimentados con una dieta purificada deficiente de biotina ocurre una reducción en el crecimiento y en el peso corporal, dermatitis, deformaciones en las patas (19, 20) y maduración anormal en los huesos (18). En nuestro laboratorio desarrollamos un modelo experimental murino para estudiar la participación de la biotina en el crecimiento corporal. Con este modelo reportamos que durante las primeras 6 semanas de estudio, los ratones alimentados con la dieta deficiente de biotina tuvieron una ganancia de peso corporal menor a la de los controles; y entre las semanas 7 a 20 del estudio hubo una pérdida progresiva de peso corporal (21). Las concentraciones séricas de biotina libre, disminuyeron significativamente en los ratones con dieta deficiente y la actividad específica de las carboxilasas en el hígado bajó 85% después de 4 semanas (21). Adicionalmente, los ratones deficientes de la

vitamina, en comparación con los ratones control y suficientes de biotina, tuvieron reducciones estadísticamente significativas en la talla corporal (22) y menor largo y peso del fémur (23), lo que demuestra que la biotina participa en la homeostasis del desarrollo y el crecimiento corporal.

1.4 Contenido de Biotina en muestras biológicas

Las concentraciones de biotina en alimentos, tejidos y fluidos biológicos se han medido por ensayos de crecimiento microbiológico y por ensayos de unión competitiva que usan biotina marcada radiactivamente (3). Más recientemente, se han determinado por métodos competitivos de unión a ligandos (Enzyme linked immunoabsorbent assay o ELISA) (24-27, 28) y por cromatografía líquida de alta eficiencia (High-Performance Liquid Chromatography o HPLC) seguida de un sistema de unión con avidina conjugada (29-31). Aunque la biotina se encuentra ampliamente distribuida en fuentes naturales de alimento, aún en las fuentes más ricas su concentración absoluta es muy baja en comparación con el contenido de las otras vitaminas. El hígado, riñón, yema de huevo y algunos vegetales son buenas fuentes de biotina pues contienen de 20 a 120 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, mientras que la carne, leche, fruta, cereales y productos de panadería la contienen de 1 a 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (1-3).

1.5 Deficiencia de biotina y consumo de alimento en animales de laboratorio

Tomando en cuenta que en el ratón adulto, el peso corporal es de 20-40g; el consumo de alimento es de 12-18g/100g peso corporal/día y el consumo de agua de 15 ml/100g peso corporal/día (32), es posible demostrar que la deficiencia de biotina produce pérdida de peso en modelos de experimentación animal (18-20) y que este efecto se encuentra relacionado a un menor consumo de alimento (18). Así, en ratas alimentadas *ad*

libitum con dieta deficiente de biotina, se observa una disminución en el consumo de alimento por día. En cambio, cuando a este mismo grupo de ratas se le administra biotina, se observa un aumento en el consumo de alimento por día, lo que se refleja en el peso corporal y en la desaparición progresiva de los síntomas característicos de la deficiencia de biotina (33-35).

1.6 Hormona del crecimiento (GH) y Factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-I)

La hormona del crecimiento (GH) controla el crecimiento corporal de los animales y modula la glucosa sérica. La secreción de la GH está bajo el control de dos neurohormonas liberadas por el hipotálamo, la hormona liberadora de la GH (GHRH) y por la somatostatina (SRIF). Las concentraciones de GHRH y SRIF son reguladas en parte por los niveles de glucosa en la sangre (36). La GH estimula la síntesis de proteínas y el crecimiento de tejidos, como cartílago, hueso y músculo esquelético, por proliferación celular (36-39). En la rata macho, la GH es secretada en pulsos discretos con bajos niveles entre picos. En contraste, en la rata hembra la secreción de GH exhibe un patrón menos pulsátil y tiene niveles entre picos relativamente altos. De igual manera en los humanos existe un dimorfismo sexual similar al patrón de secreción de esta hormona en la rata (40). El órgano más importante donde la GH ejerce sus funciones de regulación metabólica es el hígado (40).

Los efectos de la GH en el crecimiento del esqueleto y los tejidos blandos, son mediados primordialmente por los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) (36). El factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-I), es miembro de una familia de factores de crecimiento y moléculas relacionadas, que está compuesta de ligandos (IGF-I, IGF-II e insulina), 6 proteínas de unión a los IGFs (IGFBPs), y receptores en la superficie

celular que median la acción de los ligandos (receptor de IGF-I, receptor de insulina, y receptor de IGF-II manosa-6-fosfato) (40). El hígado produce el 75% del IGF-I sérico (36-40). Las acciones biológicas del IGF-I son moduladas por las IGFBPs, que son producidas por muchos tejidos y se encuentran en el suero y en los compartimentos extracelulares. Más del 90% del IGF-I presente en la sangre y en otros fluidos biológicos está unido a IGFBPs. Esta interacción sirve para propósitos específicos como mantener las reservas de estos factores de crecimiento (41-44); inhibir o potenciar sus efectos, e incluso pueden tener efectos independientes (45). La IGFBP-3 en conjunto con otra proteína, la subunidad inestable en medio ácido (ALS), forma un trímero de 150 kDa con el IGF-I el cual es el responsable de mantener los niveles de IGF-I en la sangre además de prolongar la vida media del IGF-I sérico de 10 minutos a 15 horas, previniendo los efectos hipoglucémicos de los IGFs libres. Todas las IGFBPs inhiben el crecimiento porque impiden la unión del IGF a su receptor; sin embargo, el secuestro de IGF por estas proteínas de unión puede mejorar sus efectos presentándolo y liberándolo lentamente a su receptor y a su vez, este mecanismo protege al receptor de la regulación negativa por la alta exposición al IGF-I (41 y 44).

1.7 Modificaciones Génicas del sistema GH/IGF-I

Los ratones transgénicos para el antagonista de la GH (GHa), además de sufrir reducciones significativas en el peso corporal y en las concentraciones séricas de IGF-I, también tienen menor concentración de glucosa e insulina en el suero y desarrollan incremento en la sensibilidad a la insulina periférica (46). La administración subcutánea de GH recombinante humana (rhGH) (3 mg/kg dos veces al día), tanto a los ratones nulos ("knockout") para el gen de IGF-I (46) como a los ratones nulos en la producción de IGF-I hepático (LID) (47-48), restablece la ganancia de peso corporal. De la misma manera,

cuando se les administra IGF-I (1 mg/kg dos veces al día) a los ratones knockout para la proteína ALS (ALSKO), así como a los dobles mutantes nulos en la producción de IGF-I hepático (LID) + knockout para la proteína ALSKO (LID+ALSKO) se observa un incremento en la longitud corporal y el largo del fémur (49).

1.8 Nutrición y sistema GH/IGF-I

Uno de los principales reguladores del contenido plasmático de IGF-I, es la nutrición. Las concentraciones plasmáticas de IGF-I se reducen por deficiencia en la ingestión de proteínas y calorías (50-51), aun cuando las concentraciones plasmáticas de GH sean elevadas (42). Usualmente, el grado de disminución en las concentraciones de IGF-I es proporcional al grado de la deficiencia nutricional y los niveles de este factor de crecimiento se incrementan significativamente con la restauración adecuada de la ingesta de calorías. En particular, la normalización del IGF-I después de un periodo de restricción calórica, requiere un contenido de proteínas suficiente en la dieta (52).

Los procesos biológicos que subyacen a los efectos de la deficiencia de biotina sobre el crecimiento corporal indican, que el sistema GH/IGF-I está involucrado en este mecanismo. Empleando nuestro modelo experimental murino, en un trabajo previo encontramos que los ratones alimentados con una dieta sin esta vitamina, tienen menor concentración sérica de glucosa e IGF-I total, mientras que la de GH circulante es igual o mayor que en los controles (23). Debido a que la concentración de IGF-I disminuye con la reducción en la ingesta de proteínas y/o calorías (51) y a su vez la deficiencia de biotina disminuye el consumo de alimento (35), se vuelve imprescindible estudiar tanto el consumo de alimento como los efectos de la administración de IGF-I en los ratones de nuestras series experimentales.

1.9 Métodos de administración de IGF-I

Debido a que el IGF-I tiene una vida media muy corta, es necesario administrarlo repetidamente para observar sus efectos, por lo que uno de los esquemas utilizados consiste en la inyección subcutánea de 1 mg/kg de rhIGF-I dos veces al día (49). Otra forma de administrar el IGF-I es por medio de los liposomas vesiculares (DepoFoam) que consisten en múltiples cámaras acuosas no concéntricas unidas por una red de membranas lipídicas. Las partículas DepoFoam contienen un lípido neutro que es un componente integral, que le da su estructura multivesicular única y contiene 95% agua, lo que la hace ideal para encapsular moléculas y fármacos solubles en agua, que en este caso mantienen estable al IGF-I encapsulado y lo liberan lentamente durante 4-7 días (53). Otra forma de administración crónica de IGF-I, es mediante la implantación de microbombas osmóticas (50).

2 HIPÓTESIS

Hipótesis nula: La disminución en el crecimiento y desarrollo corporal, así como en la concentración sérica de IGF-I causadas por la deficiencia de biotina, son consecuencia de desnutrición y prevalecen durante la administración de IGF-I.

Hipótesis alterna: La disminución en el crecimiento y desarrollo corporal; así como, la concentración sérica de IGF-I causadas por la deficiencia de biotina, no son consecuencia de desnutrición y se corrigen con la administración de IGF-I.

3 OBJETIVOS

General: Determinar si la reducción en el crecimiento corporal y las bajas concentraciones séricas de IGF-I en el estado deficiente de biotina, son consecuencia de la menor ingesta de alimento y por consiguiente desnutrición.

Específicos: 1) Determinar el consumo de alimento por ratones alimentados con dietas que tienen diferentes cantidades de biotina. 2) Comparar el crecimiento de los ratones con la clase y la cantidad del alimento consumido. 3) Determinar el efecto de la administración de IGF-I sobre el consumo de alimento, el peso corporal y la longitud y el peso del fémur, en los ratones alimentados con dietas que tienen diferentes cantidades de biotina.

4 METODOLOGÍA

Ratones. Se utilizaron 3 lotes de ratones macho de 3 semanas de edad de la cepa BALB/cAnN con un total de 68 animales. Cada lote se dividió en tres grupos experimentales definidos por el tipo de dieta: **a) control, b) suficiente de biotina y c) deficiente de biotina.** Todos los animales estuvieron en un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas cada uno, a una temperatura de 25 °C y fueron colocados 6 ratones por caja. El grupo **control (C)** fue alimentado con la dieta comercial que reciben los ratones de

experimentación en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (S2018S, Harlan Teklad); el grupo **suficiente de biotina** (SB) fue alimentado con una dieta que contiene 30% de clara de huevo seca como única fuente de proteína y adicionada con 0.004 g (16.4 μ mol) de biotina/kg; y los ratones del grupo **deficiente de biotina** (DB) recibieron la misma dieta que el grupo suficiente, pero sin el suplemento de biotina (TD.06682, Harlan Teklad). Todos los grupos de ratones fueron alimentados y se les proporcionó agua *ad libitum*. Como se mencionó anteriormente, la ingesta de clara de huevo cruda produce deficiencia de biotina porque forma un complejo que impide la absorción de la vitamina por el intestino (1, 3).

En dos lotes con un total de 50 ratones y durante 20 semanas, se determinó el peso corporal semanalmente los miércoles, y el consumo de alimento tres veces por semana los lunes, miércoles y viernes, generalmente entre las 9 a.m. hasta las 12 p.m. El lote restante (n=18), fue utilizado para estudiar el efecto de la administración de IGF-I. Se asignaron al azar seis animales de cada grupo y en la semana 4 de experimentación, a cuatro ratones se les implantó subcutáneamente en el dorso, una microbomba osmótica (ALZET Modelo 1007D) conteniendo IGF-I en concentración de 1 mg IGF-I/ 2 mL. Como control, dos ratones de cada dieta fueron implantados con microbombas osmóticas con placebo (ALZET Modelo 2004). En la semana 8 del estudio, los ratones fueron sacrificados para medir la longitud y el peso del fémur.

5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Utilizando el software STATISTICA 5.0 (StatSoft), se compararon las medias de cada una de las variables dependientes por medio de un ANOVA de 2 vías, excepto en el largo y peso del fémur donde se utilizó ANOVA de una vía. *Se consideró $P < 0.05$ como valor significativo. La prueba *Post Hoc* fue la prueba de Tukey HSD.

6 RESULTADOS

El consumo de alimento no disminuye en los ratones con deficiencia de biotina.

La cantidad de alimento ingerido diariamente por cada ratón se mantuvo, durante 20 semanas, oscilando alrededor de 2.9 g en los individuos de los grupos control y SB, mientras que para los del grupo DB fue próximo a 1.9 g [ANOVA $F(59, 2) = 1.033$, $P = 0.406$, **Figura 3**]. Si bien, la ingesta de alimento fue menor por los ratones del grupo DB, cuando se calculó el consumo diario de alimento por gramo de peso corporal, no hubo diferencias entre los tres grupos que recibieron las dietas con distintas cantidades de biotina [ANOVA $F(19, 2) = 1.485$, $P = 0.059$, NS: **Figura 4**]. Por lo tanto, la deficiencia de biotina no produce menor apetito, ni menor consumo de alimento.

No obstante a que los ratones DB consumen diariamente casi 2 g de alimento, esta ingesta no se ve reflejada en el peso corporal, ya que la curva temporal de crecimiento es igual a la que ya está reportada con este modelo de deficiencia de biotina (21). El peso de los ratones al destete ($t = 0$) fue de 11.3 ± 1.3 g. Los ratones con dietas control y SB alcanzaron un peso corporal de 22.9 ± 1.4 g en la octava semana de estudio; mientras que, los ratones alimentados con dieta DB alcanzaron su peso máximo en la cuarta semana (17.7 ± 1.5 g), sin cambios adicionales hasta la novena semana y pérdida de peso desde la semana 10 hasta la 20 [ANOVA $*F(20, 2) = 30.929$, $P = 0.001$; **Figura 5**].

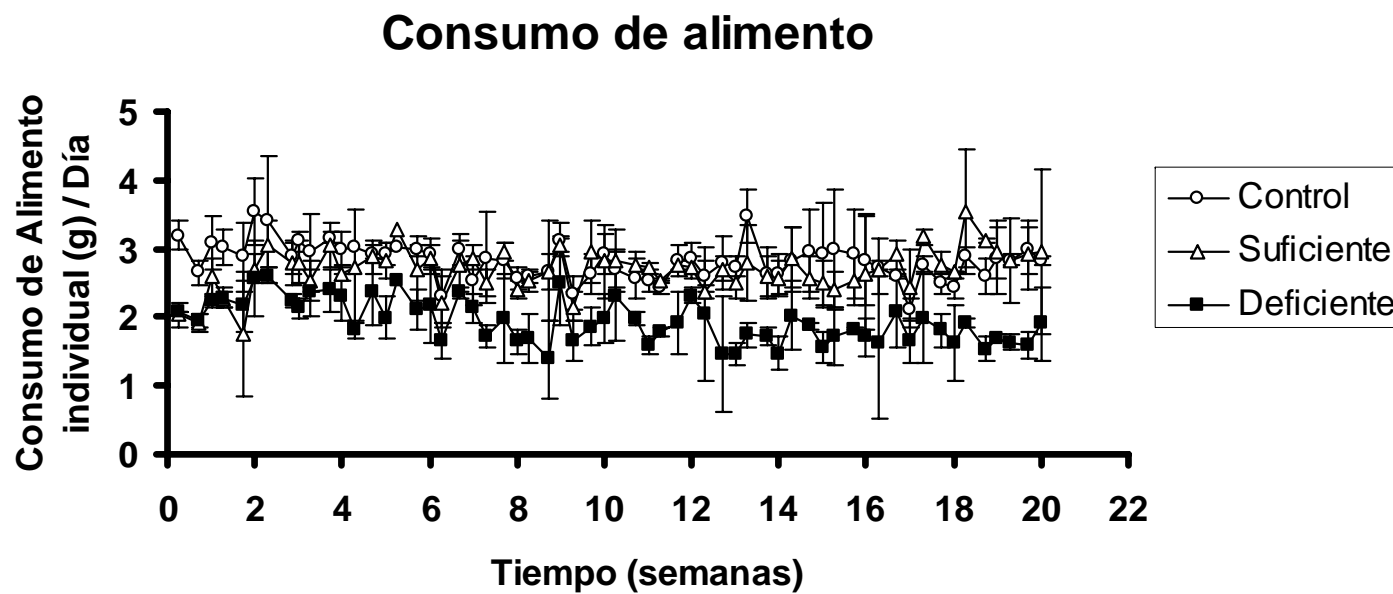


Figura 3. Promedio \pm DE del consumo de alimento de $n=50$ ratones machos BALB/cAnN con dietas Control (○), Suficiente de biotina (△), y Deficiente de biotina (■). $P = 0.406$ (NS).

Consumo de alimento relativo al peso corporal

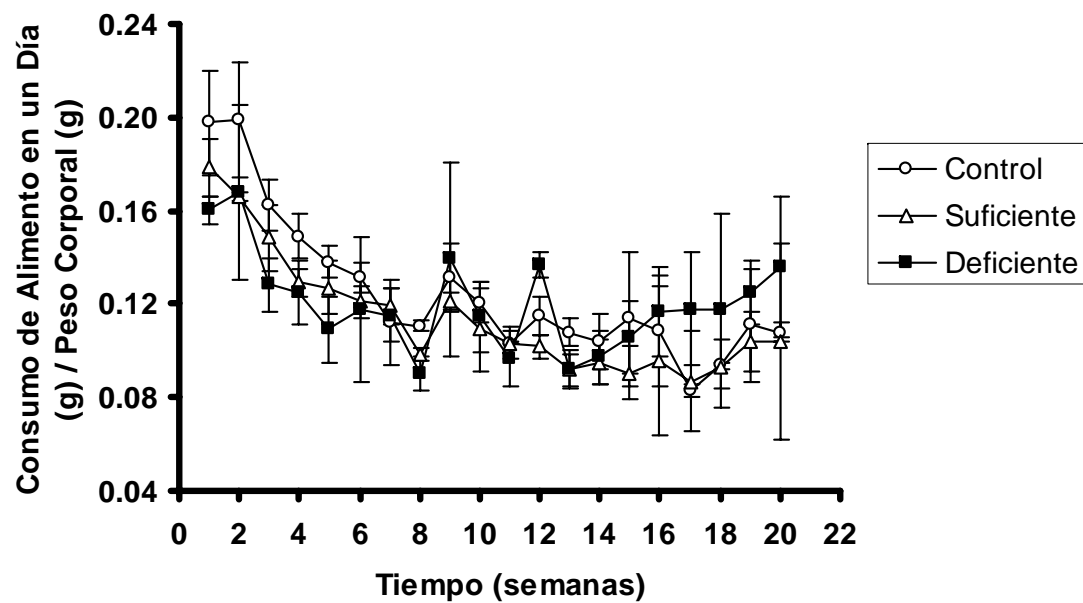


Figura 4. Promedio \pm DE del consumo de alimento relativo al peso corporal de $n=50$ ratones machos BALB/cAnN con dietas Control (○), Suficiente de biotina (Δ), y Deficiente de biotina (■). $P = 0.059$ (NS).

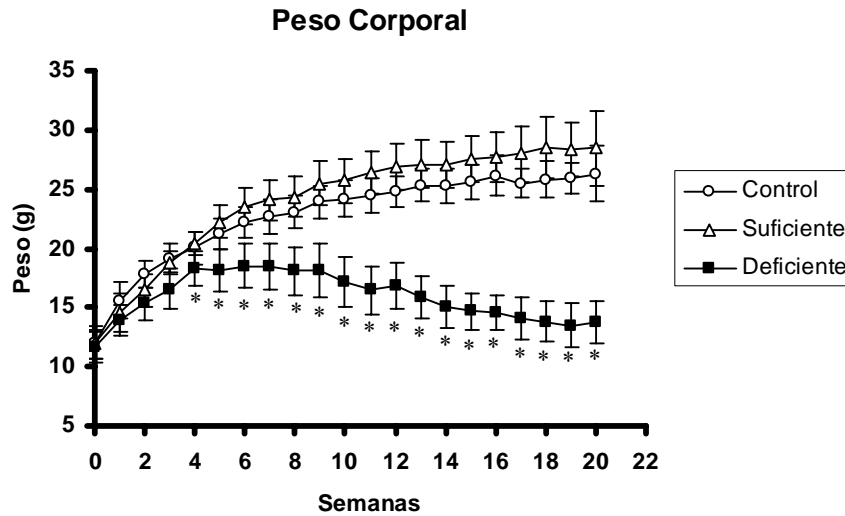


Figura 5. Ratones macho BALB/cAnN alimentados con dietas Control (O), Suficiente de biotina (Δ), y Deficiente de biotina (■). (Promedio ± DE; n= 50; * $P = 0.001$).

Efectos en el peso corporal por la administración de IGF-I

La administración de IGF-I, no modificó el patrón de crecimiento corporal en los ratones de los grupos control y SB. Estos dos grupos pesaron 20.65 ± 1.21 g y 23.01 ± 0.82 g a las 4 y 8 semanas de estudio, valores que son los característicos en este modelo murino experimental (ANOVA $F(4, 5) = 2.12$, * $P = 0.013$; **Figura 6**). De manera interesante, la administración de IGF-I a los ratones DB, desde la cuarta hasta la octava semana, sí provocó un aumento de peso de 1.33 g (18.24 ± 2.17 g a 19.57 ± 2.31 g), cantidad que representa el 6.9%. Si bien, este aumento es discreto, hay que tener en cuenta que durante el mismo intervalo, no se observa ganancia de peso en este grupo experimental y no resultó significativo porque el número de ratones es muy pequeño (ANOVA $F(4, 1) = 0.285$, $P = 0.883$; NS, **Figura 7**).

El procedimiento quirúrgico para implantar la microbomba no afectó el desarrollo característico de los ratones en los tres grupos experimentales. Aunque el análisis se hizo en tan sólo dos ratones con cada dieta, los pesos coinciden con los que se presentan en la Figura 5 y que a su vez, como se menciona en el párrafo anterior, concuerdan con los que recibieron tratamiento con IGF-I (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Se presentan los pesos corporales determinados en los ratones con dietas Control, Suficiente de biotina y Deficiente de biotina e implantados con microbombas ALZET.

TIEMPO (Semanas)	PESO CORPORAL (g)		
	Promedio \pm D.E.		
	CONTROL	SUFICIENTE	DEFICIENTE
0 (n=18)	12.00 \pm 1.32		
2 (n=6)	19.90 \pm 1.14	17.34 \pm 0.98	16.58 \pm 1.99
4 (n=6)	21.20 \pm 1.23	19.58 \pm 0.79	18.24 \pm 2.17
6			
IGF-I (n=4)	22.47 \pm 1.13	21.49 \pm 0.57	18.93 \pm 2.22
Placebo (n=2)	22.91	21.96	15.51
8			
IGF-I (n=4)	23.62 \pm 0.73	22.39 \pm 0.18	19.57 \pm 2.31
Placebo (n=2)	24.61	24.10	16.75

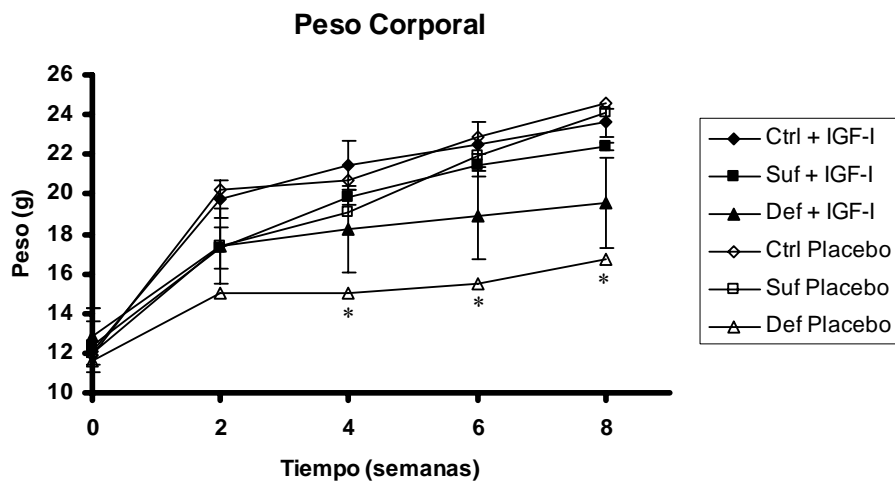


Figura 6. Peso corporal promedio \pm DE de $n = 18$ ratones BALB/cAnN, con dietas Control (\diamond), Suficiente de biotina (\square), y Deficiente de biotina (Δ) y placebo en microbombas y, con dietas Control (\blacklozenge), Suficiente de biotina (\blacksquare), y Deficiente de biotina (\blacktriangle) con IGF-I en microbombas a partir de la semana 4 de estudio. $*P = 0.013$

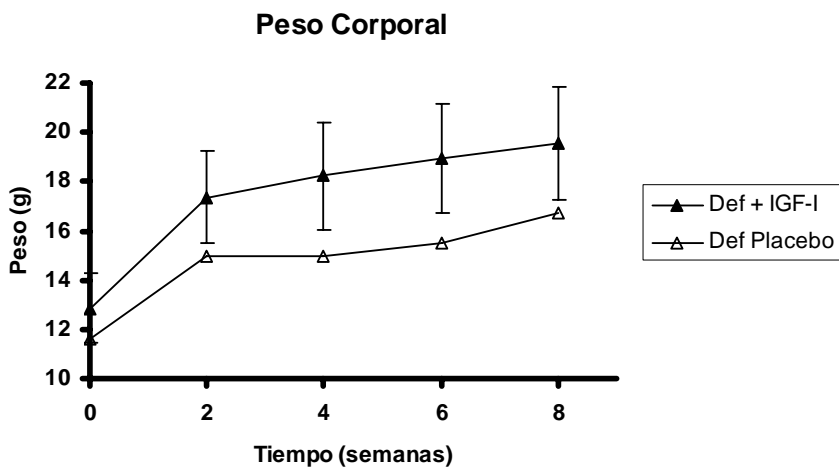


Figura 7. Peso corporal promedio \pm DE de $n = 18$ ratones BALB/cAnN, con dieta Deficiente de biotina (Δ) y placebo en microbombas y, con dieta Deficiente de biotina (\blacktriangle) con IGF-I en microbombas a partir de la semana 4 de estudio. $P = 0.883$ (NS).

La longitud y el peso del fémur no cambian al administrar IGF-I. En el lote de ratones con microbombas, se observó que los ratones de todas las dietas que fueron administrados con IGF-I durante 4 semanas no incrementaron el largo del fémur significativamente en comparación con los ratones de los grupos placebo (ANOVA $F(5, 5) = 0.587, P = 0.710$; NS, **Figura 8**).

En el peso del fémur, tampoco hubo diferencias significativas entre los ratones que fueron administrados con IGF-I y los ratones de los mismos grupos que no lo recibieron (ANOVA $F(5, 5) = 1.586, P = 0.242$; NS, **Figura 9**).

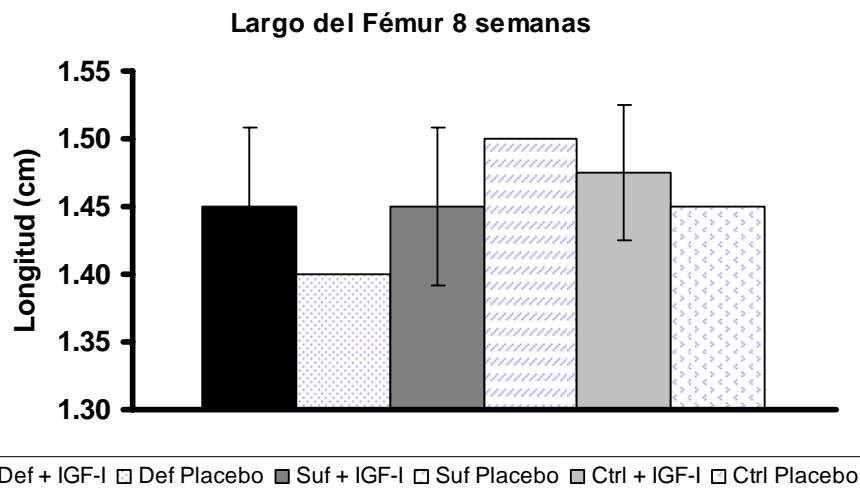


Figura 8. Longitud del fémur a las 8 semanas de experimentación en ratones BALB/cAnN machos (promedio \pm DE, $n = 18$) con dietas Control, Suficiente de biotina, y Deficiente de biotina (con placebo $n = 2$, y con IGF-I $n = 4$ en cada tipo de dieta). $P = 0.710$ (NS).

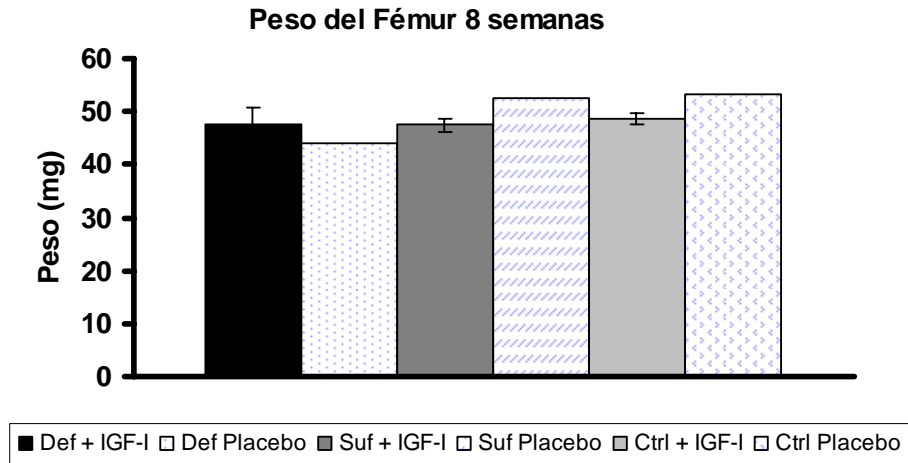


Figura 9. Peso corporal del fémur a las 8 semanas de experimentación en ratones BALB/cAnN machos (promedio \pm DE, $n = 18$) con dietas Control, Suficiente de biotina, y Deficiente de biotina (con placebo $n = 2$, y con IGF-I $n = 4$ en cada tipo de dieta). ($P = 0.242$, NS).

7 DISCUSIÓN

El IGF-I incrementa la síntesis de proteínas e inhibe la proteólisis y la apoptosis en muchos tejidos, como el hueso y el músculo esquelético (40-42). Cuando los IGFs fueron descubiertos, les denominaron *Factores de Sulfatación* debido a que estimulan la incorporación de sulfato en el cartílago de rata (43). Así mismo, la producción de IGF-I en los osteoblastos humanos, es estimulada por la vitamina $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ y la calcitonina (42). Sin embargo, en el presente estudio el IGF-I parece no sustituir a la biotina, dado que las ganancias de peso no se restablecen por el IGF-I, en los ratones sometidos a la dieta deficiente de biotina y las curvas de ganancia de peso son semejantes al placebo.

En este estudio encontramos que la deficiencia de biotina, produce los signos indicados anteriormente, como reducción del peso corporal, y de la longitud y el peso de un hueso largo como es el fémur (23); sin embargo, cuando el IGF-I es administrado mediante microbombas subcutáneas, se restaura ligeramente la ganancia de peso corporal (6.9%), sin alcanzar el criterio de significancia estadística.

Así mismo, en el grupo de ratones alimentados solamente con las diferentes dietas, el peso corporal es menor en los ratones con dieta deficiente de biotina, resultados similares a observaciones previas (23) y de manera similar en el caso de los ratones dobles mutantes (“knockout”) IGF-KO y ALSKO (47) y en los dobles mutantes LID+GHa (46), debido a la falta de factores de crecimiento. Nosotros, no observamos aumento de la longitud del fémur con la administración de IGF-I, a diferencia de los ratones IGF-IKO y ALSKO tratados con IGF-I en inyecciones diarias por 4 semanas (47), lo que podría sugerir una sensibilidad diferente entre estas cepas y la utilizada en el presente trabajo.

Thissen y colaboradores (51), Zofková (42) y Scacchi y colaboradores (52) demostraron que las concentraciones séricas de IGF-I disminuyen con la deficiencia de calorías y proteínas, lo mismo sucede con la deficiencia de biotina, de tal manera que en un estudio experimental podría determinarse que la administración de biotina reestablece este factor de crecimiento y no la administración de IGF-I. Además es importante señalar que así como el IGF-I es estimulado por la biotina, también la vitamina $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ (42) produce este efecto, sin embargo, la deficiencia de la biotina produce los efectos mencionados sobre el crecimiento, independientemente de que esté presente o no la vitamina D_3 en la dieta.

Se puede presentar resistencia al IGF-I en la transducción de señales, debido a interrupciones en los segundos mensajeros intracelulares o por mutaciones en el receptor para IGF-I. Otra posibilidad de esta resistencia, es una hormona que compite por segundos mensajeros compartidos, lo que puede ocasionar resistencia secundaria al IGF-I (54).

La vida media del ratón es de 2.5 años. Desde el nacimiento, un ratón con la nutrición adecuada crecerá en su peso corporal siguiendo una curva sigmoide, mostrando aceleración en la pubertad y desacelerando cuando alcanza la madurez (33-34). Los factores que afectan el crecimiento postnatal después del destete de los mamíferos son: el genotipo, el control hormonal, el genotipo de la madre, la nutrición, el sexo, el peso al destete, y otros factores ambientales como la temperatura, la humedad, la luz y la higiene (33). La madre influye en las características de su prole en al menos tres formas: a), contribuye en cada cría con la mitad de sus genes; b), condiciona la expresión del fenotipo en su prole; y, c), la influencia ambiental sobre la madre puede causar variaciones del crecimiento de sus crías (34). Estas variables genéticas y ambientales pueden ser la causa por la cual a pesar de trabajar con ratones

singénicos y seleccionados para comenzar las dietas con peso corporal homogéneo, no siempre se obtiene la curva de crecimiento esperada.

En el consumo de alimento, al igual que en el trabajo de Patel y Mistry (35), nuestros ratones alimentados *ad libitum* con la dieta deficiente de biotina tienen reducciones en el consumo de alimento / día (Figura 3), sin embargo, esta diferencia es de un gramo en comparación con los grupos con dieta control y suficiente. Por el contrario, en el consumo de alimento relativo al peso corporal, no hay diferencia en los grupos con dieta control y suficiente, en cambio en el grupo con dieta deficiente de biotina se presenta un incremento en el consumo de alimento relativo al peso corporal a partir de la semana 16 de estudio (Figura 4). En modelos animales de experimentación como los ratones; las altas temperaturas, estímulos molestos, conflictos sociales u otros factores ambientales suelen reducir el consumo de alimento y pueden hacer necesario dar dietas con mayores concentraciones de nutrientes. Los procesos experimentales que producen estrés, como las cirugías, también pueden alterar el consumo de alimento (55). En este trabajo, a pesar de las diferencias en la composición de las dietas control y suficiente, ambas proporcionaron los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo del organismo. Si consideramos que la actividad de las carboxilasas que participan en el ciclo de la biotina, es un indicador del estado funcional de la misma, sería conveniente determinar la actividad específica de estas enzimas hepáticas para confirmar que efectivamente se debe a la deficiencia de biotina como se ha reportado anteriormente (21) y no a las variables ambientales y sociales mencionadas (55).

En lo correspondiente al consumo de alimento, los resultados obtenidos en nuestro trabajo, coinciden con los presentados por el grupo de Furukawa (56), quienes en un estudio en ratas alimentadas con dieta deficiente de biotina que presentan los signos físicos típicos de la falta de esta vitamina como la reducción en el peso corporal,

proponen que este efecto puede ser inducido por la deficiencia de biotina y no es resultado de una menor ingesta de alimento. De tal forma que, podemos reiterar que, todos los efectos que produce la carencia de biotina se deben a la ausencia de la misma.

Las cepas de ratones pueden diferir en sus requerimientos de vitaminas y otros nutrientes. La deficiencia de algunas vitaminas produce reducciones en el crecimiento corporal de los ratones así como otros signos. En este estudio, los signos físicos que han mostrado los ratones alimentados con dieta deficiente de biotina, afectan el crecimiento y el desarrollo corporal de forma similar a los que producen las deficiencias de otras vitaminas (55 y 57). Así por ejemplo, el crecimiento corporal es reducido pre y postnatalmente en ratones con deficiencia de **ácido fólico**, otros signos de esta deficiencia incluyen reducciones en el crecimiento del hígado y el cerebro. La deficiencia de **ácido pantoténico** en ratones en crecimiento, se caracteriza por pérdida de peso, alopecia, dermatosis, parálisis parcial de las extremidades posteriores y otras anomalías neurológicas, y acromotriquia. Los signos de la deficiencia de **riboflavina**; además, del desarrollo de epidermis hiperqueratósica o atrófica, degeneración de la mielina en la columna vertebral y vascularización corneal con ulceración, incluyen también, pérdida de peso en ratones adultos y crecimiento reducido en ratones jóvenes. Los signos de la deficiencia de **tiamina** son convulsiones violentas, hemorragias cerebrales, reducción en el consumo de alimento y el crecimiento corporal, mortalidad temprana y degeneración testicular. La deficiencia de **vitamina B₆** (**piridoxina, piridoxal o piridoxamina**), además de reducir el crecimiento corporal produce hiperirritabilidad, parálisis posterior, degeneración necrótica de la cola y alopecia. Los ratones jóvenes con deficiencia de **vitamina B₁₂** muestran retraso en el crecimiento y atrofia renal. Esta deficiencia causa mortalidad antes y después del nacimiento. El principal signo observado en la deficiencia temprana de **vitamina A** es

una reducción en la ganancia de peso corporal, conforme la deficiencia progresa, muchos tejidos epiteliales son queratinizados. Ocurre xeroftalmia, si el ratón está en condiciones no sanitarias o sujeto a estrés. Otros signos son; temblores musculares, diarrea, pelo erizado, abscesos, hemorragias rectales y vaginales, abortos y esterilidad permanente en machos (55 y 57). Debido a lo mencionado anteriormente, puede concluirse la importancia de la biotina obtenida en la dieta ya que produce efectos similares a los que ocurren con la deficiencia de otras vitaminas.

8 CONCLUSIONES

De este trabajo, podemos concluir las siguientes observaciones:

Una dieta deficiente de biotina se asocia a:

- a) Baja ganancia de peso corporal.
- b) Disminución en el desarrollo de un hueso largo como el fémur.

El suplemento de IGF-I por medio de microbombas osmóticas:

- a) Restablece ligeramente la ganancia de peso corporal.
- b) No tiene efecto sobre la ingesta de alimento.
- c) No tiene efecto sobre el desarrollo del fémur.

9 REFERENCIAS

1. Friedrich W., Biotin. In: Vitamins. Berlin: Walter de Gruyter, 1988:753-805
2. McMahon R.J., Biotin in metabolism and molecular biology. *Annu Rev Nutr* 2002; 22:221-239
3. Wolf B., Disorders of Biotin Metabolism. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th ed. New York: McGraw- Hill Inc, 1995:3151-77
4. Pacheco-Alvarez D., Solórzano-Vargas S., León Del Río A., Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Arch Med Res* 2002; 33: 439-447
5. Dakshinamurti K., Litvak S., Biotin and protein synthesis in rat liver. *J Biol Chem* 1970; 245: 5600-5605
6. Boeckx R.L., Dakshinamurti K., Biotin-mediated protein biosynthesis. *Biochem J* 1974; 140: 549-556
7. Gravel R.A., Narang M.A., Molecular genetics of biotin metabolism: old vitamin, new science. *J Nutr Biochem* 2005;16:428-431
8. Stanley J.S., Griffin J.B., Zempleni J., Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation. *Eur J Biochem* 2001;268:5424-5429
9. Hassan Y.I., Zempleni J., Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin. *J Nutr* 2006;136:1763-1765
10. Wiedmann S., Eudy J.D., Zempleni J., Biotin supplementation increases expression of genes encoding interferon- γ , interleukin-1 β , and 3-methylcrotonil-CoA carboxylase, and decreases expression of the gene encoding interleukin-4 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr* 2003; 133: 716-719
11. Stanley J.S., Mock D.M., Griffin J.B., Zempleni J., Biotin uptake into human peripheral blood mononuclear cells increases early in the cell cycle, increasing carboxylase activities. *J Nutr* 2002; 132: 1854-1859
12. Dakshinamurti K., Cheah-Tan C., Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Arch Biochem Biophys* 1968; 127:17-21
13. Chauhan J., Dakshinamurti K., Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* 1991;266:10035-8
14. Dakshinamurti K., Li W., Transcriptional regulation of the liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1994;132:127-32
15. Deodhar A.D., Mistry S.P., Regulation of glycolysis in biotin-deficient rat liver. *Life Sci* 1970;9:581-588
16. Dakshinamurti K., Terrago-Litvak L., Hong H.C., Biotin and glucose metabolism. *Can J Biochem* 1970; 48: 493-500
17. Romero-Navarro G., Cabrera-Valladares G., German M.S., Matschinsky F.M., Velazquez A., Wang J., Fernández-Mejía C., Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocr* 1999;140:4595-4600
18. Balnave, D., Clinical symptoms of biotin deficiency in animals. *Am J Clin Nutr.* 1977; 30: 1408-1413
19. Bain, S.D., Newbrey, J.W., Watkins, B.A., Biotin deficiency may alter tibiotarsal bone growth and modeling in broiler chicks. *Poult Sci* 1988; 67: 590-595
20. Watkins, B.A., Bain, S.D., Newbrey, J.W., Eicosanoic fatty acid reduction in the tibiotarsus of biotin-deficient chicks. *Calcif Tissue Int.* 1989; 45: 41-46
21. Báez-Saldaña A., Diaz G., Espinoza B., Ortega E., Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice. *Am J Clin Nutr* 1998; 67:431-7

- 22 Báez-Saldaña A., Ortega-Soto E., Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. *J Nutr* 2004; 179 (8): 1970-77
- 23 Georgina Del Vecchyo Tenorio. Enero de 2006. Determinación de somatotropina (GH) y del factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-I) en ratones deficientes de biotina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM
- 24 ELISA Biotina ALPCO
- 25 ELISA Biotina Immunodiagnostik
- 26 ELISA Biotina MD Biosciences
- 27 Procedimiento general para ELISA Tipo Sándwich CytoSets™ (biosource.com)
- 28 Shiuan D., Wu C.H., Chang Y.S., Chang R.J., Competitive enzyme-linked immunoabsorbent assay for biotin. *Methods Enzymol* 1997; 279: 321-326
- 29 Mock D.M., Lankford G.L., Mock N.I., Biotin accounts for only half of the total avidin-binding substances in human serum. *J Nutr* 1995; 125: 941-946
- 30 Mock D.M., Determinations of biotin in biological fluids. *Methods Enzymol* 1997; 279: 265-275
- 31 Staggs C.G., Sealey W.M., McCabe B.J., Teague A.M., Mock D.M., Determination of the biotin content of select foods using accurate and sensitive HPLC/avidin binding. *J Food Compost Anal* 2004; 17(6): 767-776
- 32 Suckow M.A., Danneman P., Brayton C., *The Laboratory Mouse*, CRC Press, Boca Raton FLA, USA, 2001, p. 8
- 33 Eisen E.J., Results of growth curve analyses in mice and rats. *J An Sci* 1976; 42:1008-1023
- 34 Malik R.C., Genetic and physiological aspects of growth, body composition and feed efficiency in mice: a review. *J An Sci* 1984;58:577-590
- 35 Patel M.S., Mistry S.P., Effect of biotin deficiency on food intake and body and organ weights of male albino rats., *Growth*, 1968; 32: 175-187
- 36 Fanjul M.L., Hiriart M., Fernández de Miguel F., 1998, *Biología Funcional de los Animales*, Facultad de Ciencias U.N.A.M./Siglo Veintiuno Editores, México, 581 pp.
- 37 Jones J.I., Clemmons D.R., Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16: 3-34
- 38 Salvatori R., Growth Hormone and IGF-I. *Revin Endocr & Metabol Disord* 2004;5:15-23
- 39 Randall D., Burggren W., French K., Eckert *Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. W.H. Freeman and Company, N.Y., 2001, pp. 341-342
- 40 LeRoith D., Bondy C., Yakar S., Liu J., Butler A., *The Somatomedin Hypothesis*: 2001. *Endocr Rev* 2001; 22:53-74
- 41 Stewart C.E.H., Rotwein P., Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 1996; 76: 1005-1026
- 42 Zofková I., Pathophysiological and clinical importance of insulin-like growth factor-I with respect to bone metabolism. *Physiol Res* 2003; 52: 657-679
- 43 Laron Z., Insulin-like growth factor I (IGF-I): a growth hormone. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2001; 54: 311-316
- 44 Grimberg A., Cohen P., Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol* 2000;183:1-9
- 45 LeRoith D., Werner H., Beitner-Johnson D., Roberts C.T., *Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor*. *Endocr Rev* 1995; 16:2:143-163

- 46 Yakar S., Setser J., Zhao H., Stannard B., Haluzik M., Glatt V., Boussein M.L., Kopchick J.J., LeRoith D., Inhibition of growth hormone action improves insulin sensitivity in liver IGF-I deficient mice. *J Clin Invest* 2004; 113: 96-105
- 47 Liu J.L., LeRoith D., Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocr* 1999; 140: 5178-5184
- 48 Liu J.L., Yakar S., LeRoith D., Mice deficient in liver production of insulin-like growth factor I display sexual dimorphism in growth hormone-stimulated postnatal growth. *Endocr* 2000; 141: 4436-4441
- 49 Yakar S., Rosen C.J., Beamer W.G., Ackert-Bicknell C.L., Wu Y., Liu J.L., Ooi G.T., Setser J., Frystyk J., Boisclair Y.R., LeRoith D., Circulating levels of IGF-I directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 2002; 110: 771-781
- 50 Azain M.J., Roberts T.J., Martin R.J., Kasser T.R., Comparison of daily versus continuous administration of somatotropin on growth rate, feed intake, and body composition in intact female rats. *J Anim Sci* 1995;73:1019-1029
- 51 Thissen J.P., Ketelslegers J.M., Underwood L.E., Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 1994; 15: 80-101
- 52 Scacchi M., Pincelli A.I., Cavagnini F., Nutritional status in the neuroendocrine control of growth hormone secretion: the model of anorexia nerviosa. *Front Neuroendocr* 2003; 24:200-224
- 53 Katre N.V., Asherman J., Schaefer H., Hora M., Multivesicular Liposome (DepoFoam) technology for the sustained delivery of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I). *J Pharm Sci* 1998;87:1341-1346
- 54 Jain S., Golde D.W., Bailey R., Geffner M.E., Insulin-like growth factor-I resistance. *Endocr Rev* 1998;19:625-646
- 55 Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council, Nutrient Requirements of Laboratory Animals, Fourth Revised Edition, National Academy Press, Washington, D.C., 1995, pp.3-10, 92-97
- 56 Furukawa Y., Numazawa T., Fukazawa H., Ikai M., Ohinata K., Maebashi M., Kim D.O., Ito M., Komai M., Kimura S., Biochemical consequences of biotin deficiency in osteogenic disorder Shionogi rats. *Internat J Vit Nutr Res* 1993;63:129-134
- 57 Knapka J.J., Chapter 4 Nutrition; in *The Mouse in Biomedical Research*, Vol. III Normative Biology, Immunology, and Husbandry; Eds. Foster H.L., Small J.D., Fox J.G., Academic Press, Inc, San Diego, CA, 1983, pp. 52-67