



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“INTERACCIÓN DE LA BIOTINA CON EL SISTEMA
ENDOCRINO HORMONA DEL CRECIMIENTO/FACTOR DE
CRECIMIENTO I SIMILAR A LA INSULINA (GH/IGF-I)”**

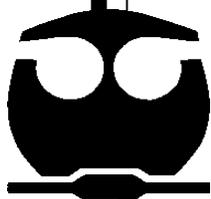
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:
OSCAR ANTONIO VELÁSQUEZ**

MÉXICO, D.F

2011





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: Profesor: DRA. MARINA GAVILANES RUIZ _____

VOCAL: Profesor: M. en C. LUCIA CORNEJO BARRERA _____

SECRETARIO: Profesor: DRA. ARMIDA BÁEZ SALDAÑA _____

1er. SUPLENTE: Profesor: QFB. JUAN DIEGO ORTÍZ PALMA PÉREZ _____

2° SUPLENTE: Profesor: DRA. VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA _____

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS. UNAM Tercer Circuito Escolar S/N Ciudad Universitaria, UNAM Código postal 04510 Del. Coyoacán México D.F. Laboratorio B-220. Departamento Biología Celular y Fisiología.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ARMIDA BÁEZ SALDAÑA.

SUSTENTANTE:

OSCAR ANTONIO VELÁSQUEZ

El presente trabajo se desarrolló con apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT IN224308, IN215208) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (82879).

AGRADECIMIENTOS

A la directora de tesis:

Dra. Armida Baéz Saldaña

Por su instrucción y guía durante el desarrollo de este trabajo de Tesis.

A los responsables del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas:

MVZ. Georgina Díaz Herrera

MVZ. Jorge Omar García Rebollar

Por los cuidados y enseñanza en el manejo de los ratones en el bioterio, así como por la implantación de las microbombas de administración osmótica.

A los distinguidos miembros del jurado:

Dra. Marina Gavilanes Ruiz

M. en C. Lucía Cornejo Barrera

QFB. Juan Diego Ortiz Palma Pérez

Dra. Vanessa Rebeca Maya Ampudia

Por sus comentarios y correcciones a esta Tesis.

DEDICATORIA

Agradezco primeramente a Dios por brindarme los momentos más maravillosos de mi vida, por permitirme estar al lado de mis seres amados y por haber llegado a esta etapa de mi formación como ser humano.

A mi abuela Irene Luna Hernández que fue otra madre para mí. Gracias por tu infinito amor, por tus invaluable consejos, pero sobre todo te agradezco por nutrir mi espíritu con tu ejemplo de vida. Te llevaré por siempre en mi corazón.

A mi madre Rosario. Te doy gracias por absolutamente todo en mi vida, sobre todo por el amor incondicional que me brindas día con día. Te amo y te agradezco por estar siempre a mi lado. Recuerda siempre que mi logro es el tuyo también.

A mi hermana Yoselin por tu risa y tu manera de enfrentar la vida. Te amo y siempre me mantendré a tu lado.

A mi padre Angel. Gracias por mostrarme que la vida está llena de matices y que debo enfrentar los momentos de tribulación con valor y sin dudar.

A mi familia porque gracias a ellos entendí lo que es unidad y apoyo mutuo.

A los amigos cosechados a lo largo de mi vida, los cuales son la familia que escogí y por la cual fui elegido. Gracias Ixchel, Víctor, Lizeth, Anne, Octavio, Diana y Sandra; porque sin importar la distancia o el tiempo nuestros lazos son más fuertes cada día.

A mis colegas y amigos que conocí en la Universidad: Ana Luisa, Vakero, Edgar, Selene, Marie, Alejandra, Claus, Chiva, a toda la "pipol" y al TTKE team; por todas las fiestas, sesiones de estudio y pláticas que me permitieron no solo crecer como químico, sino también como persona. Les deseo el mayor de los éxitos y recuerden que siempre tendrán un amigo en mí.

A mis compañeros y amigos del laboratorio B220, en especial a Martha Cecy, Tania y Ana Ingrid. Por todas las sesiones de "risoterapia" que hacían del trabajo en el laboratorio un momento muy ameno. Y que me toquen La Martha Cecy.

A todos mis maestros. En especial a Federico Galdeano Bienzobas por su gran interés en el éxito y desarrollo de sus alumnos. Deseo que sus ideas trasciendan y sean desarrolladas en un futuro cercano.

A la Dra. Armida Báez por su paciencia, dedicación y sobre todo por ayudarme a desarrollar mis competencias como profesional.

Por último y no menos importante, a mi *Alma Mater* la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por todo el conocimiento que me brindaron y por inculcar en mí la responsabilidad moral para con mi pueblo.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

ÍNDICE

	Página
Introducción	
Antecedentes.....	7
1. Biotina	7
1.1 Descubrimiento de la biotina	7
1.2 Requerimientos de consumo y fuentes alimentarias.....	8
1.3 Aprovechamiento de la biotina	11
1.4 Funciones de la biotina	13
1.5 Deficiencia y suplementación de biotina	15
2. Sistema hormona del crecimiento/factor de crecimiento I similar a la insulina (GH/IGF-I).....	17
3. Justificación del proyecto	20
4. Hipótesis	20
5. Objetivo general	21
6. Materiales y métodos	22
7. Resultados	27
8. Discusión	36
9. Conclusiones.....	39
Anexos	40
Bibliografía.....	44

Abreviaturas

IA.- Ingesta adecuada.

HCS.- Holocarboxilasa sintasa.

ACC.- Acetil-CoA carboxilasa.

ACC1.- Isoforma 1 de la ACC.

ACC2.- Isoforma 2 de la ACC.

PCC.- Propionil-CoA carboxilasa.

MCC.- 3-metil-crotonil-CoA carboxilasa.

PC.- Piruvato carboxilasa.

GH.- Hormona de crecimiento.

GHR.- Receptor celular de la hormona de crecimiento.

IGF-I.- Factor de crecimiento I similar a la insulina.

GHRH.- Hormona liberadora de la hormona del crecimiento.

IGFBP's.- Proteínas de unión al factor de crecimiento I similar a la insulina.

ALS.- Subunidad proteica sensible al ácido.

KO IGF-I.- Denominación otorgada a ratones "knockout" para el gen del IGF-I.

LID.- Denominación otorgada a ratones "knockout" para el gen del IGF-I hepático.

HRP.- Enzima peroxidasa del rábano.

Introducción

La deficiencia de biotina causa reducción en el desarrollo corporal postnatal y pérdida de peso. El sistema GH/IGF-I es el regulador del crecimiento corporal mejor conocido. Estudios previos revelan menor disponibilidad de IGF-I sérico en estado deficiente de biotina.

1. Biotina

La biotina es una vitamina hidrosoluble que forma parte del complejo B, en ocasiones es llamada vitamina H. La estructura química de la biotina (Figura 1), es un biciclo formado por un anillo con un grupo ureido (-N-CO-N) unido a otro anillo de tetrahidrotiofeno al que está unida una cadena lateral de ácido valérico (Alternative Medicine Review, 2007). Esta molécula podría presentarse en ocho estereoisómeros aunque sólo uno de éstos existe naturalmente y es la d-biotina.

Los mamíferos no son capaces de sintetizar la biotina que requieren para llevar a cabo las funciones fisiológicas en las que participa así que dependen de la biotina contenida en su dieta (Zempleni et al., 2009).

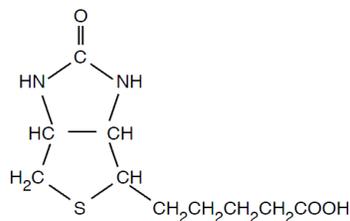


Figura 1. Estructura química de la biotina (Alternative Medicine Review, 2007).

1.1. Descubrimiento de la biotina

En 1916 Bateman describió los efectos tóxicos en ratas alimentadas con una dieta que contiene clara de huevo crudo. Las alteraciones características de estas ratas son pérdida de pelo, dermatitis y menor crecimiento corporal. A esta alteración se le llamó “síndrome de la clara de huevo”, el cual se revierte con el consumo de algunos alimentos tales como hígado y riñón por lo que se pensó que existía un “factor protector” en estas fuentes alimenticias.

La clara de huevo cruda contiene una glicoproteína tetramérica conocida como avidina, que tiene un peso molecular de 66 a 69 kD y representa el 0.05% de las

proteínas del huevo (Vaghefi, 2002). Esta proteína se une a la biotina formando un complejo que no puede ser digerido para liberar la vitamina y posteriormente ser absorbida en el intestino, dando lugar a la deficiencia (Wilson et al., 1978).

En 1936, Kögl y Tönis lograron aislar 1.1 mg de una sustancia (que actualmente conocemos como biotina) a partir de 227 kg de yema de huevo, la cual es un factor de crecimiento necesario para un gran número de levaduras por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente, se descubrió que esta nueva sustancia era idéntica a un factor de crecimiento que requerían las bacterias que se encontraban en los nódulos de plantas leguminosas y que se llama “coenzima R”.

En 1937 Szent-György y colaboradores nombraron como “vitamina H” al factor protector del síndrome de la clara de huevo y en 1940 describieron que se trataba de la coenzima R. La estructura y las propiedades de la biotina fueron establecidas por investigadores europeos y norteamericanos entre los años 1940 y 1943 y la primera síntesis química de la biotina fue realizada en 1945 por Harris, investigador de la compañía farmacéutica Merck (McDowell et al., 1989).

1.2. Requerimientos de consumo y fuentes alimentarias

En infantes de 0 a 12 meses de edad, la ingesta adecuada establecida es de 5 microgramos de biotina por día, calculada en función del promedio del consumo de biotina vía leche materna. Para adolescentes y adultos, los requerimientos de biotina se consideran mínimos y son calculados por la extrapolación de la ingesta determinada para infantes (Tabla 1). La ecuación utilizada para individuos mayores a un año es:

$$AI = (AI_{INF}) \left(\frac{P_{AD}}{P_{INF}} \right)^{0.75}$$

Donde: AI. Ingesta adecuada para adolescente o adulto.

AI_{INF} . Ingesta adecuada del infante

P_{AD} . Peso del adolescente o adulto

P_{INF} . Peso del infante

Figura 2. Ecuación utilizada para calcular la ingesta adecuada (IA) de biotina de adolescentes y adultos (Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, 1998).

El resultado de la extrapolación es de 30 µg de biotina por día, siendo este valor suficiente para mantener de manera adecuada las funciones fisiológicas del individuo. Debido a que no hay una vasta evidencia de los requerimientos totales de la biotina influenciados por el sexo y/o la edad, estos parámetros no cambian las cantidades establecidas.

Ingesta adecuada (IA) de biotina.					
Individuo	IA Biotina µg/Día	µg de Biotina / kg peso corporal*		Peso de referencia (kg)	
Infantes					
0-6 meses	5	0.7		7	
7-11 meses	6	0.7		9	
Niños	Hombres y Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
1-3 años	8	0.6		13	
4-8 años	12	0.5		22	
9-13 años	20	0.5		40	
14-18 años	25	0.4	0.4	64	57
Adultos 19 a >70 años	Hombres y Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
	30	0.4	0.5	76	61
Mujeres embarazadas	30	0.4		-	
Mujeres lactantes	35	0.4		-	

Tabla 1. IA reportada en µg de biotina por día y por kilogramo de peso corporal para la población norteamericana y canadiense. Datos válidos para la población mexicana. *Dato calculado en el presente estudio con base en los pesos promedio reportados por el IOM 1988-1994 (Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, 1998).

Varios estudios muestran que algunas mujeres en el primer trimestre de gestación tienen una disminución marginal de los niveles de biotina en el suero y la excreción de la vitamina en la orina se reduce (Mock et al., 1997a; 1997b). Sin embargo, estos datos no son suficientes para justificar un incremento en la ingesta de biotina durante el embarazo, quedando en 30 µg de biotina por día. Durante la lactancia se recomienda aumentar el consumo a 35 µg por día para reponer la cantidad de la vitamina que se secreta en la leche. El aporte de biotina proveniente de la leche materna es mucho menor al mínimo requerido por los infantes alimentados exclusivamente de ésta, por lo que se recomienda que las mujeres en lactación consuman un suplemento de biotina para aumentar la

cantidad de la vitamina secretada en la leche. Existen casos clínicos en los que se produce una deficiencia de biotina, como en los pacientes que reciben hemodiálisis, también en aquellos individuos alimentados exclusivamente con una dieta parenteral sin biotina y en pacientes con tratamientos prolongados de anticonvulsivantes como carbamazepina y primidona, ya que estas sustancias impiden la absorción intestinal y aceleran el catabolismo de la biotina (Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, 1998; Zempleni, 1999).

La biotina ha sido cuantificada por medio de estudios microbiológicos en una gran variedad de alimentos (Tabla 2) y se observó que se encuentra ampliamente distribuida (Said, 2008). Como su concentración en los alimentos naturales es inferior en comparación con el de otras vitaminas (por ej., vitaminas C o D), en alimentos industrializados no se reporta en las tablas de información nutrimental. Algunas fuentes importantes de biotina para la nutrición humana son por ejemplo: leche, hígado, riñón, yema de huevo y algunos vegetales. La biodisponibilidad de la biotina varía del 5% al 100% y depende del tipo de alimento y la especie consumidora (Said, 2009).

Alimento	Biotina (µg/100 g de alimento)	Alimento	Biotina (µg/100 g de alimento)
Frutas y jugos		Pepinos	1
Pasa	5	Papa	0.1
Plátano	4	Semillas y harinas	
Melón	3	Harina de soya	70
Uva	2	Nueces	37
Manzana	1	Cacahuates tostado	34
Naranja	1	Harina de maíz	6
Jugo de manzana	0.5	Huevo y lácteos	
Moras	0.4	Huevo (desecado)	20
Jugo de uva	0.3	Mantequilla	3
Jugo de naranja	0.3	Queso	3.0-5.0
Vegetales		Leche (vaca)	2
Soya	60	Leche (humana)	1
Coliflor	17	Carne	
Lentejas	13	Carne (Hígado, res)	100
Chicharos (frescos)	9	Carne (Termera)	2.0-75.0
Jitomate	4	Carne (Pollo)	11
Maíz	6	Carne (Puerco)	5
Zanahoria	3	Carne (Pierna, res)	3
Chicharos (enlatados)	2	Otros	
Lechuga	2	Levadura de cerveza	6

Tabla 2. Contenido de biotina en alimentos (µg/100 g de alimento) (En Geigy, 1975).

1.3. Aprovechamiento de la biotina

Como ya se mencionó, a diferencia de las bacterias, los organismos más complejos son incapaces de sintetizar biotina y es por ésto que dependen totalmente de la ingesta de esta vitamina a través de la dieta. Si la biotina se encuentra en cantidades muy bajas en la célula, su homeostasis se ve comprometida. Para hacer frente a este problema, se ha propuesto que los mamíferos han desarrollado un sistema para su reciclamiento que asegure un suministro adecuado de esta vitamina (Figura 2).

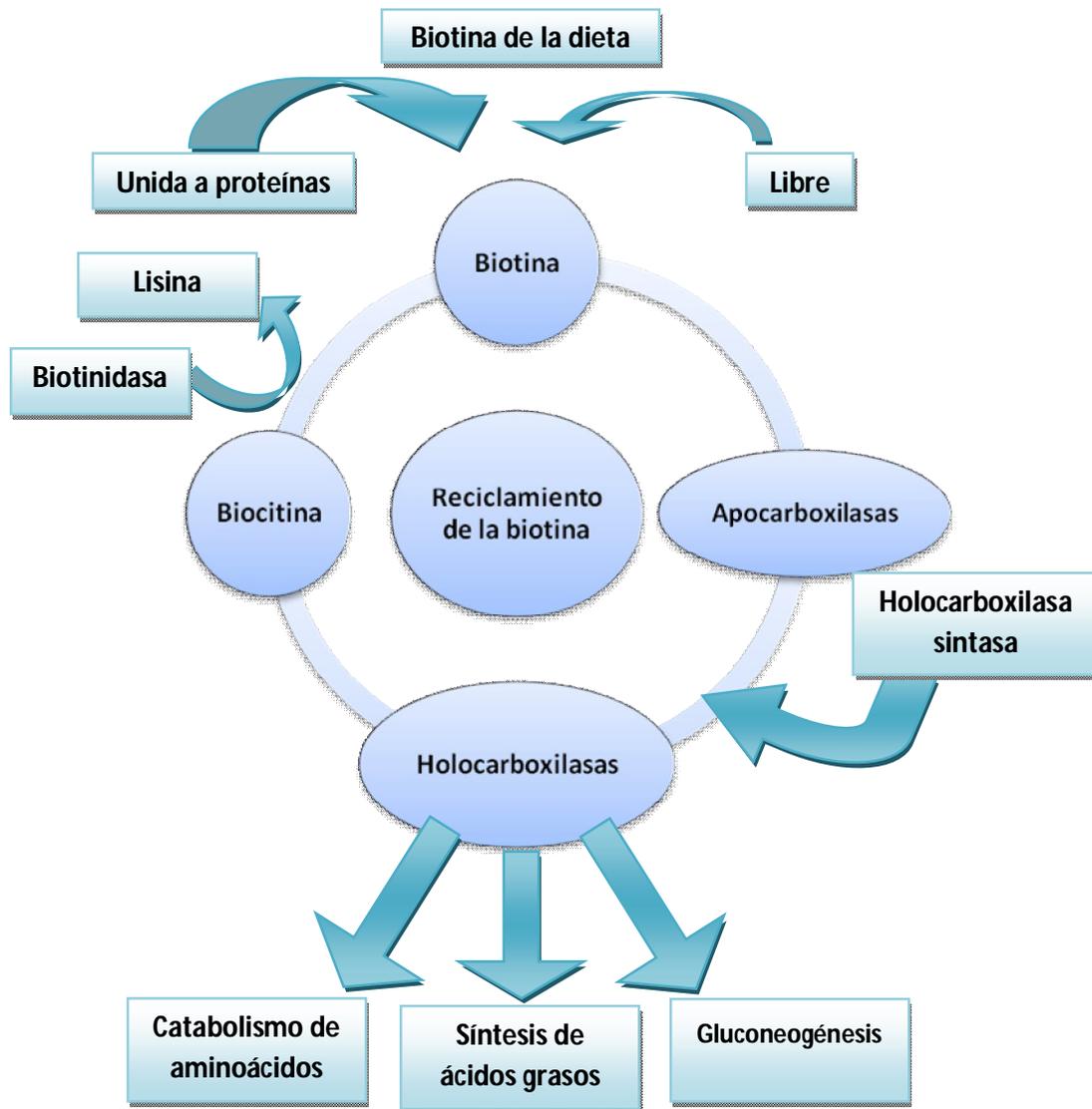


Figura 2. Ciclo de la biotina en mamíferos (Wolf, 1995).

La mayor parte de la biotina presente en los alimentos se encuentra unida a proteínas, que por la digestión van a formar pequeños péptidos biotinilados y biocitina (dímero biotina-lisina). Para que la vitamina sea absorbida requiere estar en forma libre. La separación de la biotina de los péptidos biotinilados y de la biocitina es llevada a cabo por la enzima biotinidasa presente en los jugos pancreáticos y que se encarga de romper el enlace entre el grupo carboxilo de la cadena de ácido valérico de la biotina y el grupo amino terminal del residuo específico de lisina en el sitio activo de la proteína (Wolf et al., 1990).

En la célula, la biotina sirve como cofactor para las enzimas encargadas de fijar CO_2 (carboxilasas), durante procesos metabólicos. La enzima encargada de unir a la biotina con los precursores no activos de las carboxilasas (apocarboxilasas) es la holocarboxilasa sintasa (HCS), formando un enlace biotina-lisina en el sitio activo. Al terminar la vida útil de las carboxilasas, éstas son degradadas proteolíticamente y de este proceso resultan péptidos unidos a la biotina o simplemente biocitina. Como se mencionó anteriormente, sólo la biotina libre puede ser utilizada en la formación de nuevas carboxilasas, por lo que, como se mencionó para la digestión, también aquí se requiere la acción de la biotinidasa para disponer de biotina libre. Dentro de la célula, la biotinidasa se ubica en el retículo endoplásmico rugoso y en el aparato de Golgi (Wolf et al., 1990) y debido a que es la única enzima que puede liberar a la biotina, se establece junto con la HCS, como elemento obligado para su aprovechamiento y reutilización. Después de cumplir su vida útil como coenzima, la biotina se cataboliza en dos sitios específicos de la molécula que son: la cadena de ácido valérico y el grupo sulfuro en el anillo heterocíclico. El proceso catabólico que afecta la cadena de ácido valérico es la β -oxidación (Brady, 1965), que rompe sucesivamente la cadena de 5 carbonos del ácido formando los metabolitos: bisnorbiotina, tetranorbiotina y otros compuestos intermediarios (α,β -dehidro-, β -hidroxi- y β -ceto-). Después de la degradación de la cadena de ácido valérico, el grupo sulfuro se oxida produciendo biotin-*l*-sulfóxido, biotin-*d*-sulfóxido y biotinsulfona. En las células de los mamíferos, estos procesos se llevan a cabo en el retículo endoplásmico liso, y en comparación con los microorganismos, la degradación es cuantitativamente menor (Zempleni, 1999).

1.4. Funciones de la biotina

La función clásica de la biotina es servir como coenzima esencial de cinco carboxilasas involucradas en la homeostasis de los ácidos grasos, el catabolismo de la leucina y la gluconeogénesis (Hassan, 2006).

Las carboxilasas que necesitan biotina como coenzima son: la acetil-CoA carboxilasa (ACC, en sus isoformas 1 y 2), la propionil-CoA carboxilasa (PCC), la 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) y la piruvato carboxilasa (PC). Las ACC 1 y 2 se encuentran en el citoplasma, aunque la isoforma 2 está asociada a la membrana mitocondrial externa; y las otras tres carboxilasas se encuentran en la matriz mitocondrial. Las dos isoformas de la ACC están codificadas en diferentes genes y su estructura está compuesta por un polipéptido sencillo (Abu-Elheiga, 1995). La ACC1, se encarga de catalizar la unión de CO₂ a la molécula de acetil-CoA y así generar malonil-CoA que es el precursor en la síntesis de ácidos grasos. La ACC2 participa en la regulación de la oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria (Kim, 1997) catalizando la misma reacción que la ACC1. La ACC1 se expresa en mayor cantidad en tejidos lipogénicos como hígado y riñón, mientras que la ACC2 es expresada preferentemente en músculo esquelético y en corazón. La regulación transcripcional de estas dos enzimas también es diferente, la ACC1 es regulada por sustancias como la glucosa y la insulina y la ACC2 por factores celulares músculo-específicos (Lee et al., 2001).

La estructura de la PC comprende cuatro subunidades idénticas unidas, con un peso molecular de 139 kD y su arreglo es parecido al de un tetraedro. Cataliza la transformación de piruvato a oxaloacetato que es un producto intermediario de la síntesis de fosfoenolpiruvato, por esto la PC es una enzima esencial en la gluconeogénesis. En humanos se han detectado deficiencias genéticas de esta enzima en 1 de cada 250,000 individuos, siendo algunas de las manifestaciones clínicas de esta anomalía, la acidemia láctica, hiperamonemia, citrulinemia y retrasos tanto mental como del crecimiento.

La propionil-CoA carboxilasa participa en el catabolismo de aminoácidos ramificados y de ácidos grasos de cadena larga, su función es transformar la propionil-CoA a metilmalonil-CoA. La PCC está conformada por dos polipéptidos

(α y β), en donde la biotina se une a la subunidad alfa (Browner, 1989). La deficiencia de esta enzima es potencialmente letal y los síntomas de este desorden metabólico son acidemia propiónica, vómito, letargo, hipotonía, acidosis láctica y cetoacidosis.

La enzima β -metilcrotonil-CoA (MCC) está involucrada en el catabolismo del aminoácido leucina catalizando la reacción de carboxilación de 3-metilcrotonil-CoA a 3-metilglutaconil-CoA. Esta enzima se compone de dos diferentes subunidades llamadas alfa y beta de 85 y 60 kDa respectivamente. Las manifestaciones clínicas y bioquímicas de la deficiencia de MCC son convulsiones, hipotonía y la orina de los individuos con esta deficiencia contiene altas cantidades de ácido 3-hidroxi-isovalérico (metabolito de la biotina) y 3-metil-crotonilglicina (Baumgartner, 2001). Esta deficiencia tiene una incidencia de 1 en 50,000 nacimientos.

Por otra parte, diferentes grupos han realizado estudios que arrojan evidencia de que la biotina afecta la expresión de genes. Estos estudios revelan que la deficiencia de biotina en ratas causa una reducción en la actividad de la glucocinasa hepática del 40% al 45% y este déficit se restaura al administrar biotina (Dakshinamurti et al., 1968). Opuestamente, la administración de biotina después de un periodo de ayuno de 24 horas incrementa cuatro veces la concentración normal de mRNA que codifica para la glucocinasa en hígado de rata y en cultivos de células beta pancreáticas (Chaujan et al., 1991). Estudios en células mononucleares de sangre periférica y en líneas celulares de hepatocarcinoma (HepG2), usando técnicas de microarreglos de DNA, han revelado que poco más de 2000 genes modifican su expresión en función a la cantidad de biotina del medio (Zempleni, 2005; Rodríguez-Meléndez et al., 2005). Se ha reportado también que la biotina podría afectar la transcripción del DNA por medio de la biotilación de las histonas (Hymes, 1995), ya que *in vitro* la holocarboxilasa sintasa puede fijar covalentemente la biotina en las histonas (Narang, 2004).

1.5. Deficiencia y suplementación de biotina

Humanos.- Se han descrito casos de deficiencia de biotina en humanos en individuos que reciben exclusivamente alimentación parenteral sin suplementación de biotina; en sujetos con deficiencia de biotinidasa o HCS y en personas que consumen frecuentemente clara de huevo crudo; en este último caso, como se mencionó, por la presencia de la proteína avidina (Mock, 2004). Los síntomas clínicos de la deficiencia de biotina provocada por una alimentación intravenosa libre de biotina son: dermatitis periorificial, conjuntivitis, alopecia, ataxia, hipotonía, aciduria, convulsiones, infecciones cutáneas y retraso en el desarrollo de niños e infantes. Adicionalmente, los síntomas que presentan adolescentes y adultos que consumen cantidades importantes de clara de huevo crudo son: adelgazamiento del cabello a menudo acompañado con pérdida del color, letargia, alucinaciones, parestesia de las extremidades, depresión y erupciones cutáneas tipo eccema que en casos graves se encuentran alrededor de la boca, los ojos y la nariz (Zempleni, 1999).

Se ha encontrado que la biotina estimula la expresión de insulina y de glucocinasa pancreática, siendo ambas moléculas muy importantes en el control de la homeostasis de la glucosa (Romero-Navarro et al., 1999). La suplementación de biotina parece mejorar el estado diabético, disminuyendo la concentración postprandial de glucosa y mejorando la tolerancia a la glucosa. El tratamiento con dosis farmacológicas de biotina (16 mg/día) durante una semana, redujo la hiperglicemia en pacientes diabéticos de tipo 1. Esta mejoría también ha sido observada en estudios realizados en pacientes japoneses con diabetes tipo 2 en los cuales la hiperglicemia disminuyó cerca del 45%, observándose este fenómeno después de un mes de tratamiento con biotina oral (9 mg/día) (Fernández-Mejía, 2005).

Animales.- La dermatitis es el síntoma clínico mayormente observado en aves de corral y ganado con deficiencia de biotina. En el ganado porcino deficiente de biotina hay una clara disminución en su crecimiento corporal antes de que las alteraciones clínicas como alopecia, ulceraciones en la piel e inflamación de la mucosa bucal aparezcan. En los cerdos sometidos a periodos prolongados de

deficiencia (5 a 7 semanas) se presenta la ruptura de pezuña que da origen a lesiones necróticas y severas infecciones. Para remediar la carencia de biotina en la integridad de las pezuñas se ha utilizado la suplementación con 2 a 3 mg de biotina por kilogramo de alimento para disminuir el daño en éstas. En el caso de deficiencia en las aves de corral, los principales síntomas son: reducción en el crecimiento, pérdida de plumas, dermatitis, poca producción de huevos y deformidades en pico y patas (perosis). Los síntomas clínicos tienen un desarrollo característico en los pollos, presentándose primero sequedad y descamación en las patas a los 14 días de edad. A los 18 días de edad se encuentran pequeñas fisuras en las plantas y a los 25 días estas lesiones se vuelven hemorrágicas. Entre las semanas 3 y 4 se observan lesiones por dermatitis en los párpados ocasionando dificultad para moverlos y en periodos de deficiencia más largos terminan por cerrar los ojos. Otro síntoma marcado en las aves de corral con deficiencia de biotina es la condrodistrofia, condición que consiste en la mineralización ósea normal pero con crecimiento lineal alterado de los huesos largos, causando en esta población deformaciones principalmente en las patas. Los piensos con que son alimentadas las aves para consumo humano tienen niveles bajos y poca biodisponibilidad de biotina, lo que es contrarrestado utilizando suplementos que permiten a las aves tener un aporte adecuado de la vitamina, por ejemplo, en la producción de pavos se utilizan suplementos solubles que aportan 0.25 mg de biotina por galón para pavos jóvenes y 0.5 mg para pavos adultos (Russel, 1989).

Como se ha mencionado, la deficiencia severa de biotina en humanos y animales en desarrollo origina alteraciones en el crecimiento corporal. Estudios anteriores muestran un desorden en el eje endocrino Hormona del crecimiento/Factor de crecimiento I (GH/IGF-I, principal responsable del crecimiento) en ratones con carencia de biotina (Báez-Saldaña et al., 2009), lo cual puede explicar una menor talla en individuos sin aporte de la vitamina.

2. Sistema hormona del crecimiento/factor de crecimiento I similar a la insulina (GH/IGF-I)

La hormona de crecimiento (GH) regula diversos procesos fisiológicos incluyendo el crecimiento corporal y el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono. La regulación puede ser directa por medio de la activación de los receptores celulares de la hormona del crecimiento (GHR) o de manera indirecta por medio del factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-I) (Le Roith et al., 2001).

La estructura de la GH es un polipéptido lineal constituido por 191 aminoácidos, es producida y liberada por los somatotrofos, células ubicadas en la parte anterior de la glándula pituitaria. La secreción de esta hormona ocurre de manera pulsátil con un auge importante en el inicio del proceso de sueño, y teniendo episodios secretores menos visibles unas horas después de comer (Ho K.Y. et al., 1988). Esta hormona es controlada por la acción de dos factores hipotalámicos, la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) y la somatostatina, la cual inhibe la secreción de la GH. Algunos de los factores que modifican la frecuencia y magnitud de los pulsos de liberación de la GH son la edad, la dieta y el ejercicio (Perrini et al., 2010)

La mayor parte de los efectos somatogénicos de la GH se ejecutan a través del IGF-I. La mayoría del IGF-I que se encuentra en la sangre es sintetizado por el hígado en respuesta a la GH. También es producido por múltiples tejidos extrahepáticos, en donde el IGF-I actúa localmente como un factor de crecimiento. La estructura de este factor de crecimiento consta de una cadena polipeptídica sencilla, con un arreglo secundario de α -hélice y tres puentes disulfuro. La regulación de la vida media del IGF-I en circulación y la unión a sus receptores específicos en la célula es mediada (positiva o negativamente) por las proteínas de unión al IGF I (IGFBP's; IGFBP1 a IGFBP6). Casi la totalidad del IGF-I circulante forma parte de un complejo ternario de 150 kD, constituido por una molécula de IGF-I, una de IGFBP3 y una subunidad proteínica sensible al ácido (ALS), menos del 1% del IGF-I en circulación se encuentra en forma libre. Este complejo ternario tiene un papel importante en las funciones endocrinas del IGF-I (Perrini et al., 2010).

Con ayuda de estudios realizados con modelos animales y observaciones en humanos se ha demostrado que el sistema GH/IGF-I es esencial para el desarrollo fetal y posnatal, así como para el mantenimiento del tamaño somático en los humanos, ya que los defectos de este sistema frecuentemente resultan en alteraciones en el crecimiento corporal. Los mecanismos involucrados en el funcionamiento de este sistema son muy complejos y algunos son vulnerables a la influencia de anormalidades del desarrollo, neoplasias, traumatismos, agresiones ambientales y defectos genéticos (Wit et al. 2008).

Los trastornos del sistema GH/IGF-I pueden ocurrir en diferentes niveles de la cascada de señalización de este eje hormonal, desde la liberación de la GH por la adenohipófisis hasta problemas con la acción del IGF-I en el tejido blanco. Un solo error en la regulación de genes que codifican para la ALS, los receptores de la GH y/o del IGF-I, causan una disfunción endocrina que resulta en un fenotipo anormal (Savage, 2009).

En ratones knockout para IGF-I (KO IGF-I) se observa un tamaño del 60% con respecto a ratones control al momento del nacimiento, si es que llegan a sobrevivir. Estos ratones tienen una tasa de crecimiento menor a lo normal y como consecuencia su tamaño a la edad de 8 semanas llegar a ser hasta de un 30% con respecto a animales no alterados genéticamente. Otras características importantes de estos animales son: infertilidad, muerte en etapas postnatales tempranas (1 o 2 semanas) y tienen niveles séricos de GH elevados (Liu et al., 1993). Contrastando con el caso anterior, los ratones knockout para IGF-I hepático (LID) aunque tienen una disminución del 75% de esta hormona en la sangre, nacen con un peso normal y su desarrollo corporal no presenta diferencias significativas con respecto a ratones control (Le Roith et al., 2001).

Los ratones con doble KO para el receptor de la GH y para el IGF-I presentan un patrón de crecimiento postnatal disminuido y su crecimiento llega a ser de sólo el 17% con respecto a lo normal, presentándose este porcentaje después de la semana postnatal 5 y manteniéndose hasta la semana 14 (Lupu et al., 2001). La doble delección del gen que codifica el IGF-I hepático y de la ALS provoca una reducción del 85-90% del IGF-I circulante además de una disminución en el peso corporal del 20% con respecto a lo normal, esto hace evidente que si bien la

acción endocrina del IGF-I dependiente de GH es el principal determinante para el crecimiento corporal posnatal, el IGF-I producido en tejidos extrahepáticos también participa de manera significativa (Walenkamp, 2007).

También la ingesta de alimento altera componentes importantes para el correcto funcionamiento del eje GH/IGF-I. Se ha observado que en infantes con desnutrición crónica y en ratas hembras sometidas a ayunos prolongados, la actividad de la GH está reducida, debido a una importante reducción de los receptores para GH en el hígado (Postel-Vinay et al., 1982). Este defecto impide la correcta cascada de señalizaciones que culmina en la síntesis y liberación del IGF-I (Villares, 1994). La reducción en el número de receptores de GH se revierte al restablecer la ingesta de alimento. Este tipo de afectaciones se han estudiado en individuos con desnutrición de tercer grado, en los cuales se alteran las rutas metabólicas, la homeostasis del organismo y la producción de hormonas reguladoras de factores de crecimiento como la GH y el IGF-I. En este último caso, se encontró que en cerdos y otros animales en estado de ayuno prolongado hay menor cantidad de IGF-I sérico. El mecanismo de este efecto consiste en una mayor cantidad de leptina en el suero que actúa como un inhibidor para la secreción de la GH (Cederholm, 1997; Eckert, 1998; Soliman, 2000).

3. Justificación del proyecto

Las investigaciones realizadas en modelos animales con supresión de biotina sugieren que esta vitamina está involucrada en la regulación del crecimiento. Los estudios en ratones realizados por nuestro grupo de trabajo prueban que los efectos adversos en la homeostasis del crecimiento corporal están asociados a bajas concentraciones de IGF-I en el suero.

4. Hipótesis

La administración sistémica de IGF-I revertirá las alteraciones en el crecimiento corporal que causa la deficiencia de biotina.

5. Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración de IGF-I en el crecimiento de ratones BALB/c.

Objetivos particulares.-

- Generar grupos de ratones suficientes, deficientes y suplementados de biotina por medio del suministro de dietas experimentales con contenidos diferentes de la vitamina (4, 0 y 100 mg de biotina/kg, respectivamente).
- Evaluar los cambios en el peso corporal a lo largo de 12 semanas de experimentación.
- Determinar el consumo específico de alimento en los tres grupos experimentales a lo largo del estudio.
- Medir la concentración de GH e IGF-I en el suero de los ratones a las 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 semanas.
- Administrar IGF-I a los ratones de los tres grupos.
- Evaluar el estado funcional de la biotina por medio de la cuantificación de su concentración en el suero.

6. Materiales y Métodos

Modelo murino.- Se utilizó un lote de 18 ratones macho de tres semanas de edad de la cepa BALB/cAnN obtenidos del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los ratones se mantuvieron en ciclos de 12 horas de luz-oscuridad y con barreras microbiológicas, con agua y alimento ofrecidos *ad libitum*. Todos los ratones tuvieron un manejo acorde con los lineamientos del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IIB (Hudson, 2007).

De acuerdo con el modelo murino de experimentación establecido en el laboratorio (Báez-Saldaña et al., 1998), al momento de su recepción (semana 0), los ratones se pesaron y se dividieron en tres grupos de tal forma que el promedio y la dispersión del peso corporal fuera equivalente entre ellos. A cada conjunto se le proporcionó una de tres dietas con formulación idéntica, excepto en el aporte de biotina (Harlan Teklad. Ver anexo A). La dieta deficiente (TD.06682) no tiene biotina, mientras que la suficiente (TD.06681) y la suplementada (TD.96075) fueron preparadas con 0.004 y 0.1g de biotina / kg, respectivamente. Cabe resaltar que la única fuente de proteína en las tres dietas es clara de huevo desecada (30%) que como se mencionó anteriormente contiene avidina, una proteína antagónica de la biotina que no permite su aprovechamiento (Wilson et al., 1978). La cantidad de la vitamina presente en la dieta suficiente, fue calculada de tal forma que asegure la neutralización de la avidina y además el aporte necesario para que los ratones lleven a cabo las funciones metabólicas dependientes de la biotina (Báez-Saldaña et al. 1998).

Peso corporal y consumo específico de alimento.- El registro del crecimiento de los ratones y del consumo de alimento se hicieron dos veces por semana a lo largo de todo el estudio. El consumo de alimento se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$C_e = \frac{\left[\frac{Al_i - Al_f}{d * n} \right]}{PP_g}$$

Donde:

C_e = Consumo específico

Al_i = Peso del alimento ofrecido

Al_f = Peso del alimento no consumido

d = Número de días transcurridos entre mediciones

n = Número de animales por caja

PP_g = Peso promedio del grupo en el día de la medición

Toma de muestras de sangre e inserción de microbombas.- Las muestras de suero para las determinaciones bioquímicas se colectaron a intervalos de 2 semanas empezando en la semana 0. Durante toda la experimentación, los ratones se sangraron sin ayuno a través del plexo ocular bajo anestesia con Sevorane® (sevoflurano). Al cumplir 8 semanas con las dietas experimentales, a cada ratón se le implantó subcutáneamente una microbomba de funcionamiento osmótico (Modelo 1004. ALZET® OSMOTIC PUMPS. Cupertino, CA.). Estos dispositivos se llenaron con una solución estéril de IGF-I (1.25 mg IGF-I / mL de ácido acético 0.1 M) siguiendo las instrucciones del proveedor, mismas que de acuerdo con las especificaciones técnicas de este modelo y lote, deben administrar 4.46 µg de IGF-I por día y durante 4 semanas. La implantación de las microbombas fue hecha por el personal del bioterio del IIB. Solamente a las 12 semanas (4 semanas después de la instalación de las microbombas Alzet), los ratones fueron sometidos a un ayuno de 18 h, para posteriormente sangrarlos a blanco por el plexo axilar bajo anestesia profunda con éter etílico y sacrificarlos por dislocación cervical. Las muestras sanguíneas colectadas a lo largo de la experimentación se centrifugaron a 2300 xg durante 10 min a 21°C para después separar y almacenar el suero a -20°C hasta el momento de su análisis.

Cuantificación de IGF-I, GH y biotina por ELISA y EIA.- El IGF-I sérico se determinó con un estuche comercial ACTIVE® Mouse/Rat IGF-I ELISA (Cat. DSL-10-29200), que consiste en un inmunoensayo enzimático tipo “sandwich”. Para llevar a cabo la determinación, es necesario liberar al IGF-I del trímero formado

con la IGFBP-3 y la ALS, por lo que los sueros se sometieron a un proceso de extracción ácida previamente al ensayo siguiendo las instrucciones técnicas del estuche. A 5 μ L de cada suero se agregaron 20 μ L de la solución ácida para extracción (DSL-5630) y se agitaron en Vórtex; se incubaron por 50 min a temperatura ambiente para posteriormente centrifugarlos a 9300 \times g durante 3 min a 21°C. 10 μ L del sobrenadante se neutralizaron con 50 μ L de solución neutralizante (DSL-10-29270) y estas muestras se mantuvieron a -20°C hasta su análisis. El ensayo para determinar la concentración de IGF-I en las muestras se inició depositándolas en paralelo con los estándares y controles en sus respectivos pozos. A continuación se les agregó el anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa del rábano (HRP). Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se vació el contenido de los pozos y se lavaron con la solución correspondiente (DSL-10-4030). El proceso de revelado se hizo agregando una solución de tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno (DSL-10-9755). Después de 15 min, se detuvo la reacción de revelado al agregar una solución ácida (DSL-10-9780) y finalmente se midió la absorbancia de cada pozo a 450 nm. Esta medición es directamente proporcional a la concentración de IGF-I en la muestra, la cual se calculó interpolando el valor obtenido en la curva estándar de la determinación. La curva estándar de este ensayo se presenta en el Anexo C.

La biotina se midió con el estuche ALPCO DIAGNOSTICS™ Biotin (Vitamin H) EIA (K8140-1081), que es un ensayo enzimático de unión. Las muestras, los controles y las soluciones estándar fueron incubados con estreptavidina- HRP (K 8140K) en tubos eppendorf de 0.6 mL, posteriormente se depositaron 100 μ L de cada mezcla en su respectivo pozo de microtitulación. Después de 30 min de incubación y 3 lavados, se agregaron 100 μ L de solución de revelado (K 8140TMB), que se incubó 10 min a temperatura ambiente y a continuación la reacción se detuvo con la solución ácida (K 6750AC). La intensidad del color leída a 450nm es inversamente proporcional a la concentración de biotina en las muestras, misma que se calculó a partir de la curva estándar del ensayo. La curva estándar utilizada para este ensayo se ilustra en el Anexo B.

Para la medición de la GH se utilizó el estuche LINCO Rat/Mouse growth hormona ELISA kit (EZRMGH-45K), con el que se efectuó un ensayo de ELISA tipo “sándwich”. En todas las etapas del ensayo las incubaciones fueron a temperatura ambiente y con agitación, efectuando 3 lavados entre cada una de ellas. El proceso inició agregando a los pozos de microtitulación correspondientes, previamente cubiertos con anticuerpo policlonal anti-GH (EP45), 10 μ L de las muestras, estándares y controles; en seguida se adicionaron 90 μ L de solución de ensayo (AB-P) y esta mezcla se incubó por 90 min. Transcurrida la incubación, se agregaron 100 μ L del anticuerpo de detección (E1045) a cada pozo, dejando incubar por 1 h. Después de este tiempo se agregaron 100 μ L de estreptavidina conjugada con HRP (EHRP), dejándola reaccionar por 30 min. Al terminar este periodo, la reacción se reveló agregando 100 μ L de solución con sustrato (ESS-TMB) y se paró la reacción después de 10 min con 100 μ L de una solución ácida (ET-TMB). Finalmente la absorbancia en cada pozo se leyó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm. La intensidad de esta medida es directamente proporcional a la concentración de hormona de crecimiento en los sueros. La curva utilizada para el cálculo de las concentraciones de GH en el suero de los ratones se presenta en el Anexo D.

Análisis estadístico.- Para las mediciones de crecimiento, consumo específico de alimento, determinación de las concentraciones de IGF-I y biotina en el suero, se compararon las medias por medio de un ANOVA de 2 vías utilizando el software SigmaStat 3.10 (Systat Software, Inc.). La prueba *Post Hoc* fue Tuckey. Las mediciones hechas para cada parámetro analizado se explican a continuación: para el crecimiento corporal se realizaron 26 mediciones del promedio del peso de cada condición de biotina utilizada y se usó por lo menos una *n* de 5 ratones para obtener cada promedio calculado.

En el consumo específico de alimento se hicieron 12 mediciones para cada concentración de biotina estudiada y que resultan del promedio de 2 mediciones individuales para cada grupo con diferente concentración de biotina en periodos semanales.

Para la determinación de la concentración de IGF-I sérico y de la concentración de biotina en la sangre, se realizaron 7 mediciones para cada tratamiento de biotina. Se usaron como mínimo 4 sueros sanguíneos independientes en cada medición. Para el análisis estadístico de la concentración de GH en el suero se utilizó la prueba Chi cuadrada, tomando como valor significativo 0.05 y un corte a 20 ng/mL de GH. Se hicieron 7 mediciones de la concentración de GH en el suero de los tres grupos experimentales usando al menos 2 sueros para cada concentración medida.

7. Resultados

En este capítulo se describen los datos obtenidos al estudiar por primera vez diversos parámetros relacionados con el eje endocrino GH/IGF-I en ratones que recibieron una dieta con una dosis farmacológica de biotina y dichos efectos se compararon con los obtenidos con las dietas con un aporte deficiente y suficiente de biotina. Las cantidades de biotina en cada dieta, así como la conformación de los grupos experimentales se detallan en la sección de Materiales y Métodos. Adicionalmente, se estudió también por primera vez el efecto de la administración sistémica de IGF-I desde la 8^a hasta la 12^a semana de estudio, sobre los propios componentes del sistema endocrino GH/IGF-I en los ratones en experimentación.

Crecimiento corporal.- Debido a que la deficiencia de biotina provoca pérdida de peso corporal, este parámetro se registró en los ratones de este estudio. En el Gráfico 1 se presentan las curvas de crecimiento de los tres grupos estudiados. El peso promedio del lote de 18 ratones a la tercera semana de edad (tiempo 0 de experimentación) fue homologado en 12.5 ± 0.9 g. Posteriormente, el lote se dividió en tres grupos de seis animales cada uno, quedando de la siguiente manera: el primer grupo tuvo un peso promedio de 12.70 ± 1.0 g, el segundo grupo tuvo un peso de 12.48 ± 0.9 g y finalmente el tercer grupo quedó con un peso de 12.43 ± 0.8 g (promedio \pm error estándar). Una vez formados los grupos, a cada uno se le otorgó una dieta diferente de biotina, al primer grupo se le dio la dieta deficiente de biotina, al segundo grupo se le administró la dieta suficiente de biotina y al tercer grupo se le alimentó con la dieta suplementada de biotina.

Durante el experimento, el peso de los tres grupos fue igual hasta la semana 3 y a partir de la semana 6 fueron diferentes entre sí. Después de la tercera semana y hasta el final del estudio, el grupo deficiente de biotina mostró un menor peso. Opuestamente, el grupo suplementado fue el de mayor peso desde la semana 6. El peso máximo del grupo deficiente fue de 18.7 ± 0.4 g (n=6) a las 4 semanas; así se mantuvo hasta la semana 7 del estudio (17.93 ± 0.2 g; n= 5), disminuyendo a continuación hasta 15.78 ± 0.1 g (n= 5) en la semana 12. En cambio, el peso de

los ratones en los grupos suficiente y suplementado tuvo un aumento consistente durante todo el tiempo de experimentación terminando a las 12 semanas con 23.8 ± 0.6 g (n=5) y 26.6 ± 1.2 g (n=6) respectivamente. Vale la pena resaltar que las dosis farmacológicas de biotina produjeron un aumento significativo en la ganancia de peso en el grupo suplementado (Figura 3).mientras que la administración de IGF-I no modificó las tendencias de crecimiento para alguno de los tres grupos (Figura 3).

Consumo específico de alimento.- Este parámetro permite identificar si existen diferencias en la ingesta calórica de los ratones y si los cambios en la ganancia de peso (sobre todo la pérdida de peso) se correlacionan con problemas en el estado nutricional de los animales. Los datos en el Figura 4 representan el promedio de dos mediciones individuales para cada grupo en periodos semanales. Los tres grupos tuvieron patrones de consumo iguales durante toda la experimentación con un periodo de adaptación al cambio de dieta en las primeras dos semanas y estabilización de la ingesta después de la semana 4 (Figura 4). Durante la administración de IGF-I, solamente el grupo deficiente duplicó el consumo específico de alimento en la semana 9, siendo este aumento significativo y únicamente observado en la semana 9.

CURVAS DE CRECIMIENTO

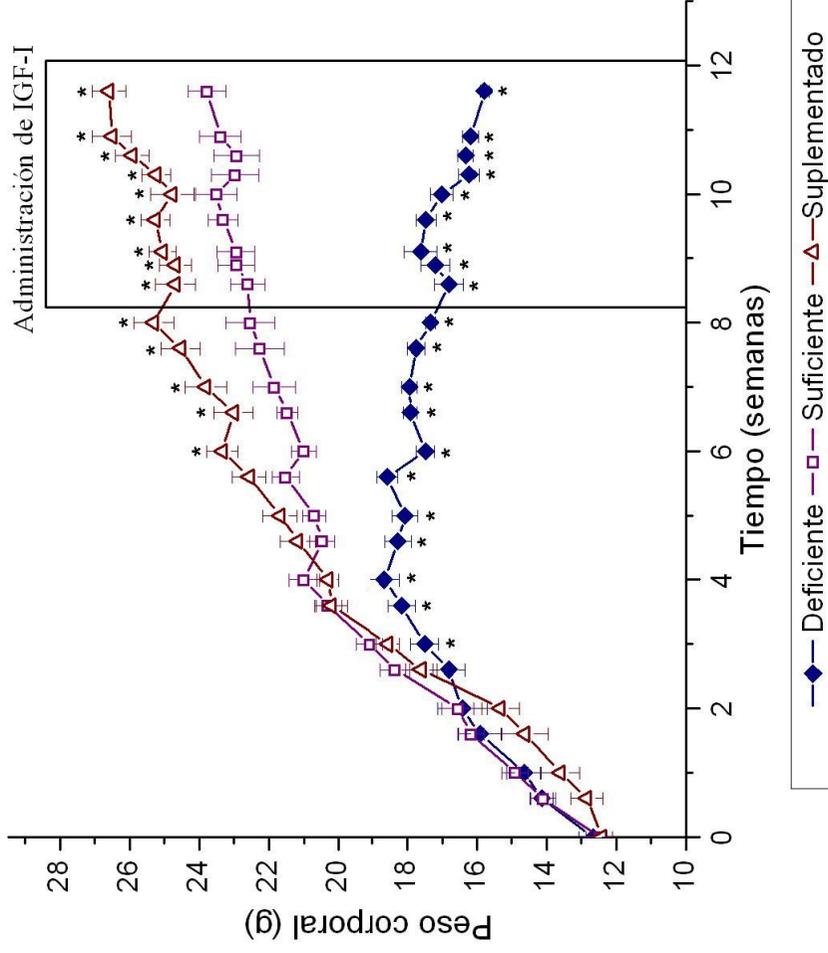


Figura 3. Seguimiento del peso corporal de los tres grupos experimentales sometidos a una alimentación con cantidades diferentes de biotina (deficiente, suficiente y suplementado) a lo largo de 12 semanas de experimentación, indicando el recuadro el lapso de experimentación con IGF-I. Se registró el peso de los ratones de cada grupo por lo menos dos veces por semana, con un intervalo temporal mínimo de 3 días entre cada medición. La figura muestra los valores promedios calculados con el peso de por lo menos 4 ratones de cada grupo experimental, expresados en gramos (promedio \pm E.E.). * $P < 0.001$.

CONSUMO ESPECÍFICO

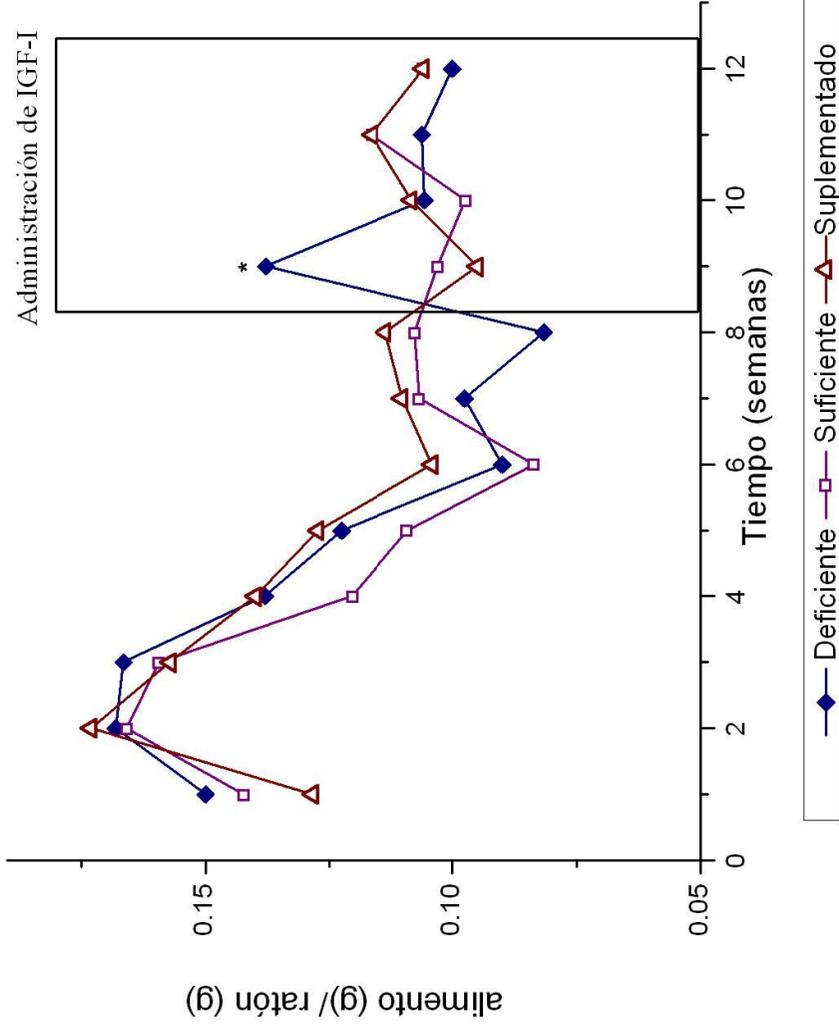


Figura 4. Cantidad de alimento consumido con referencia al promedio de la masa corporal de los ratones expuestos a las diferentes dietas de biotina indicando en el recuadro el lapso de experimentación con IGF-I. Se registró el peso del alimento consumido por los ratones de cada grupo al menos dos veces por semana, con un intervalo temporal mínimo de 3 días entre cada medición. La figura muestra los valores promediados del peso del alimento consumido con referencia al peso corporal promedio de los ratones de cada uno de los grupos con diferentes tratamientos de biotina, expresados en gramos de alimento entre gramos de ratón (promedio \pm E.E.). Se utilizaron al menos 2 mediciones del peso del alimento consumido para el cálculo de promedio semanal. * $P < 0.05$

Concentración de biotina sérica.- Este análisis indica el estado funcional de la biotina en función de la dieta proporcionada a los ratones. En la semana 0 se midió una muestra representativa del lote, para determinar el nivel inicial de biotina, observándose una concentración sérica de 44 ± 8 nM (promedio \pm E.E., $n=3$). Los resultados del grupo deficiente desde las 2 hasta las 12 semanas representan un solo valor porque se midió la mezcla de volúmenes iguales del suero de cada ratón en el grupo. La biotina circulante fue concordante con lo esperado de acuerdo al tipo de dieta. Desde la segunda semana del experimento hay diferencias entre los tres grupos (Figura 5) con concentraciones de 2.4 nM de biotina en sangre para el grupo deficiente, de 49 nM para el grupo suficiente de biotina y de 2700 nM de biotina para el grupo suplementado. En la Tabla 3 se presentan los valores mínimos y máximos determinados para cada grupo desde la segunda hasta la décima semana de estudio; y por separado se muestran los valores mínimos y máximos al inicio de la experimentación (el valor mínimo fue de 28 nM de biotina para los tres grupos y el valor máximo de 78 nM de biotina también para los tres grupos), así como en el día del sacrificio (los valores mínimos y máximos de los tres grupos durante la semana 12 de experimentación fueron: en el grupo deficiente fue de 1.3 nM de biotina, tanto para el valor mínimo como para el máximo; en el grupo suficiente de biotina el valor mínimo fue de 27 nM y el valor máximo fue de 44 nM de biotina; por último el grupo suplementado tuvo un mínimo de 257 nM y una concentración máxima de 1440 nM) porque las condiciones en los dos casos fueron diferentes (Dieta comercial y ayuno por 18 horas, respectivamente).

Concentración de GH sérica.- Esta hormona se cuantificó para determinar si la deficiencia o la suplementación de biotina alteran los niveles séricos o el comportamiento pulsátil de la GH. Los niveles séricos de esta hormona no fueron diferentes entre las tres condiciones estudiadas (Figura 6). Se observaron valores con una gran dispersión en los tres tratamientos, lo cual puede corresponder al perfil pulsátil de su liberación (Le Roith et al., 2001).

Tabla 3. Concentraciones mínimas y máximas de biotina (nM) en el suero de los ratones expuestos a diferentes cantidades de biotina. Los datos se dividen en las tres condiciones diferentes de insumo de alimento siendo estos: dieta comercial (semana 0), dieta experimental (semanas 2 -10) y ayuno previo a la obtención de muestras (semana 12).

Biotina (nM)						
Tiempo (semanas)	Mínimo			Máximo		
0	28			78		
2-10	Grupos					
	Deficiente		Suficiente		Suplementado	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
	0.6	4.2	11	83	640	4457
12	Ayuno previo de 18 horas					
	1.3	27	44	257	1440	

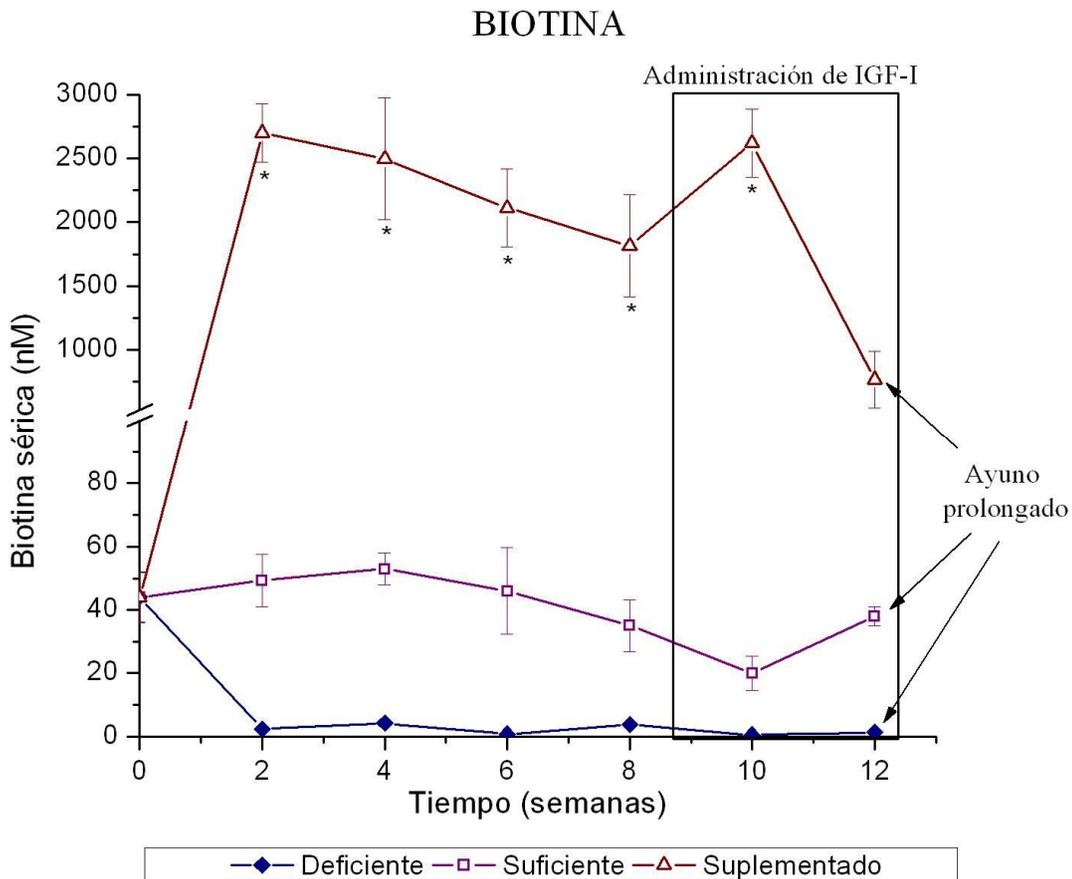


Figura 5. Concentración de biotina en el suero de los grupos alimentados con 3 dietas diferentes en biotina, indicando en el recuadro el lapso de experimentación con IGF-I. Los sueros sanguíneos utilizados se obtuvieron vía plexo ocular cada dos semanas y la cantidad de biotina en éstos se midió por método ELISA. La figura muestra los valores promedio de la concentración de biotina en sangre de al menos 4 ratones de cada grupo, expresados en concentración nM (promedio \pm E.E.). * $P < 0.001$.

Estos datos corroboran reportes previos de el laboratorio, en los que la alimentación con dietas que carecen de biotina o que la contienen en dosis fisiológicas no alteran la liberación de GH (Báez-Saldaña et al., 2009). En este estudio además encontramos que ni la alimentación con cantidades farmacológicas de biotina, ni la administración de IGF-I modificaron el comportamiento de la liberación de esta hormona en el suero.

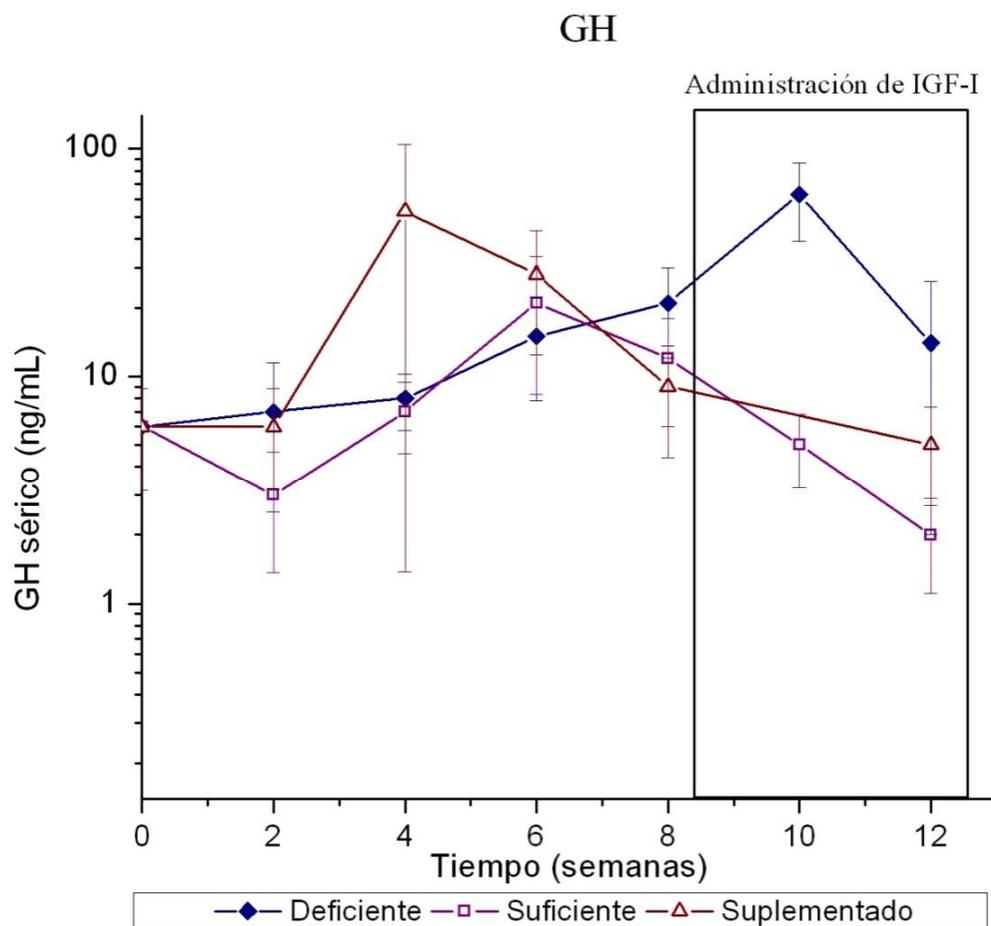


Figura 6. Concentración de GH en el suero de ratones alimentados con 3 diferentes dietas de biotina, indicando en el recuadro el lapso de experimentación con IGF-I. Los sueros sanguíneos utilizados se obtuvieron vía plexo ocular cada dos semanas y la concentración de GH en éstos se midió por método ELISA. La figura muestra los valores promedio de la concentración de la GH en sangre de al menos 4 ratones de cada grupo, expresados en ng/mL (promedio \pm E.E.).

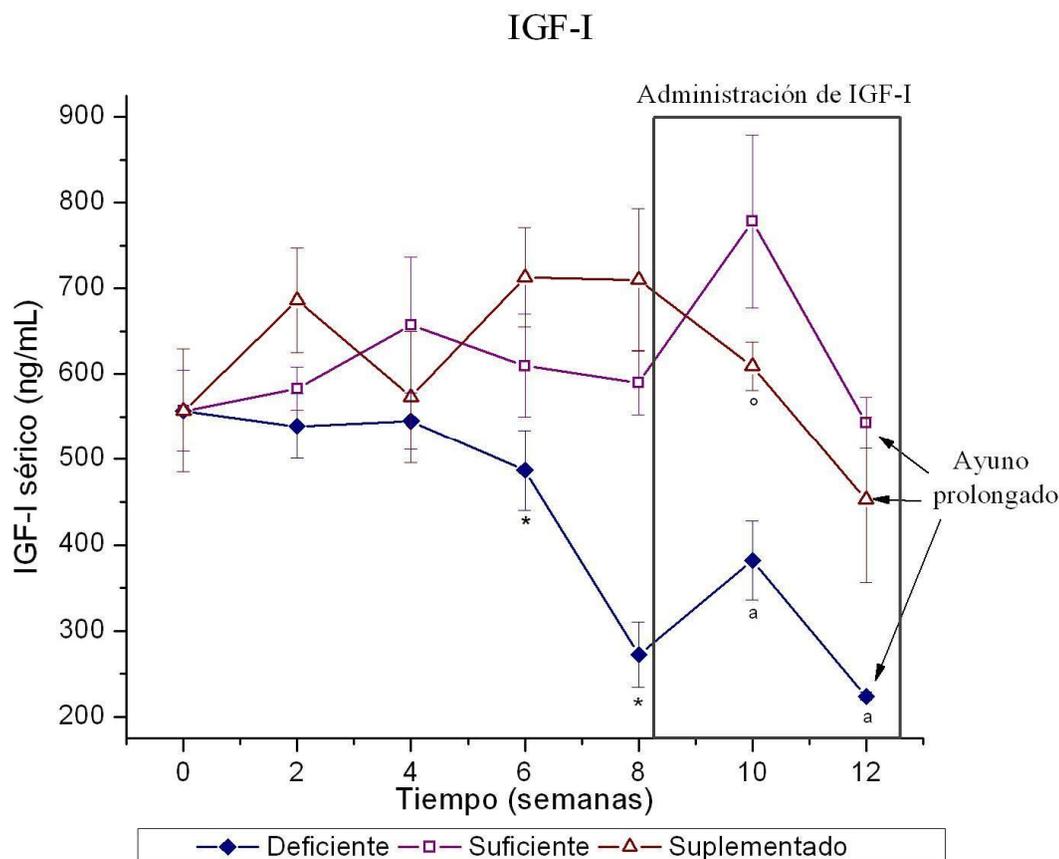


Figura 7. Concentración de IGF-I en el suero de ratones alimentados con 3 diferentes dietas de biotina, indicando en el recuadro el lapso de experimentación con IGF-I. Los sueros sanguíneos utilizados se obtuvieron vía plexo ocular cada dos semanas y la concentración de IGF-I en éstos se midió por método ELISA. La figura muestra los valores promedio de la concentración de la GH en sangre de al menos 4 ratones de cada grupo, expresados en ng/mL (promedio \pm E.E.). * $P < 0.001$ Deficiente vs. Suficiente y Suplementado; ^o $P < 0.050$ Suplementado vs. Suficiente; ^a $P < 0.050$ Deficiente vs. Suficiente.

Concentración de IGF-I sérico.- Esta hormona fue cuantificada por una parte para determinar si la suplementación de biotina modifica su concentración sanguínea y su efectividad durante su administración a través de las microbombas osmóticas. Las cantidades de IGF-I en el suero no tuvieron diferencias significativas entre grupos antes de la semana 4. Sólo en la semana 6 el grupo deficiente de biotina mostró un valor inferior al de los grupos suficiente y suplementado, con valores de 382 ± 46 ng/mL (n= 5); 610 ± 47 ng/mL (n=6) y 713 ± 58 ng/mL (n=6) respectivamente. La inserción subcutánea de microbombas osmóticas cargadas con IGF-I provocó el incremento de esta hormona solamente en los individuos de los grupos deficiente y suficiente y únicamente a las 10 semanas. En el grupo deficiente el aumento fue del 40%, mientras que en el grupo

con aporte suficiente de biotina fue del 32% (de 272 ± 38 ng/mL (n=5) a 382 ± 46 ng/mL (n=5); y 590 ± 38 ng/mL (n=4) a 778 ± 101 ng/mL (n=5), respectivamente). Por el contrario el grupo suplementado con biotina, en lugar de que su concentración de IGF-I en el suero aumentara, mostró una disminución en la cantidad de IGF-I dos semanas después de la inserción de las microbombas, descendiendo de 710 ± 83 ng/mL (n=6) hasta 609 ± 28 ng/mL (n=4). Los tres grupos presentaron la concentración más baja a las 12 semanas debido al ayuno prolongado; efecto que coincide con otros reportes (Postel-Vinay et al., 1982; Le Roith, 2001).

8. Discusión

El crecimiento corporal de un individuo es un proceso complejo que está determinado por diversos factores, los cuales se pueden clasificar en dos tipos, a saber: genéticos y epigenéticos. Los factores genéticos están definidos por la estructura del genoma, mientras que los factores epigenéticos modulan la transcripción y traducción del genoma sin modificar la estructura del ADN. Estos últimos pueden ser internos (hormonas) o externos como los nutrimentos. El sistema endocrino GH/IGF-I, crucial para el desarrollo de los mamíferos, está comprendido por moléculas que sirven como factores epigenéticos endógenos. Dentro de los factores epigenéticos externos se encuentra la alimentación. En este trabajo se enfocó particularmente en la vitamina biotina dentro de la alimentación y su relación con el eje endocrino GH/IGF-I.

La administración de IGF-I tuvo un efecto nulo sobre el crecimiento corporal de los grupos deficiente, suficiente y suplementado de biotina. Lo anterior podría deberse a diferentes factores, entre los que se puede mencionar que las concentraciones de ALS y/o de IGFBP-3 fueran insuficientes para unirse al total de la cantidad de IGF-I dispensado por las microbombas y/o que dichas concentraciones estuvieran disminuidas en paralelo a las del IGF-I, lo cual explicaría también sus bajos niveles séricos en los ratones deficientes. Otra explicación podría ser que la concentración de moléculas que modulan la acción del IGF-I negativamente, tales como la IGFBP-5, una de las proteínas que degrada esta hormona, estuvieran aumentadas (Le Roith et al., 2001).

Se ha descrito que el fenotipo de ratones KO para el receptor de IGF-I [*Igf1r* (-/-)] y el fenotipo de ratones dobles mutantes para el IGF-I y su receptor [*Igf1* (-/-) / *Igf1r* (-/-)] no son diferente entre sí; y el peso de estos animales está disminuido hasta en un 45% con respecto a los ratones del grupo control (Liu et al., 1993). Esto pone en evidencia la importancia del requerimiento del correcto funcionamiento del receptor de IGF-I para el crecimiento corporal y permite sugerir que el bajo peso de los ratones deficientes de biotina en el experimento puede se podría atribuir a la disminución en la cantidad de receptores de IGF-I.

Algunos estudios reportan que el tratamiento con IGF-I en trastornos del crecimiento en humanos, no es tan eficaz para revertir la disminución del crecimiento corporal de los pacientes comparándolo con otros tipos de tratamiento. El resultado se atribuyó a que en esos reportes no se utilizaron las dosis correctas de la hormona (Rosenfeld, 2007). En el presente trabajo, la dosis diaria de IGF-I administrada a los ratones (154.5 μg de IGF-I/kg) es equivalente a 6 veces más, el valor máximo del IGF-I sérico observado en la gráfica de concentración de esta hormona en el suero de los ratones del grupo suficiente de biotina a la semana 10. Por lo que se descarta que la falla de la acción del IGF-I en el crecimiento corporal se deba a la administración de una cantidad insuficiente de la hormona.

La administración del IGF-I no tuvo efecto en el consumo específico de alimento de los tres grupos estudiados, aunque en el grupo deficiente, solamente en la semana 9 hubo un aumento del 50% en el consumo (una semana después de la administración del IGF-I), normalizándose en las siguientes 3 y últimas semanas del experimento. Tampoco se observaron cambios en el estado funcional de la biotina, ni en los niveles de GH a causa de la aplicación sistémica de IGF-I, sugiriendo que la interacción entre esta hormona y la biotina podrían ser más bien autocrinos / paracrinos en tejidos como el hígado y el músculo esquelético, y/o que las acciones sistémicas no fueran efectivas por las alteraciones en otros de los componentes del sistema endocrino GH/IGF-I. La menor concentración de IGF-I sérico en la semana 12 observada en los 3 grupos, se puede atribuir al ayuno prolongado, que como se mencionó anteriormente, es una situación metabólica en la que está descrito que en diferentes especies animales hay bajos niveles de IGF-I en sangre a causa de periodos largos sin ingesta de alimento (Cederholm, 1997; Eckert, 1998; Soliman, 2000).

El efecto causado por la suplementación de biotina en el crecimiento corporal se observó a partir de la semana 6 del experimento, cuando el peso promedio del grupo suplementado fue mayor significativamente en un 7% con respecto al peso del grupo suficiente. Este resultado difiere de lo observado en un estudio realizado en ratas suplementadas con biotina, en el que se observó que estos animales tenían una baja de peso dependiente de la dosis con respecto al grupo control

(Sawamura et al., 2007). Las discrepancias pueden deberse a las diferencias entre especies animales, y/o a los diferentes diseños experimentales. Las dietas utilizadas en el experimento con ratas fueron de composición distinta a las nuestras, principalmente en la fuente de proteína (caseína), así como en la cantidad de biotina utilizada para la suplementación. En el experimento de Sawamura y cols. (2007) las dietas contenían de 40 a 1000 veces mayores a las utilizadas en el presente trabajo de tesis con el grupo suplementado.

En este trabajo de tesis se encontró un efecto dosis dependiente de la biotina en el peso corporal. Aunque no hay diferencias significativas en el consumo específico de alimento entre los tres grupos (Báez-Saldaña et al., 2009a y el presente trabajo) y los ratones deficientes de biotina crecieron menos, las dosis farmacológicas de biotina causaron un aumento significativo en el peso corporal. Este resultado es muy interesante, ya que al no haber mayores ingestas calóricas, ni en cantidad ni en calidad, el peso corporal sí se puede asociar directamente con la dosis de biotina presente en el alimento, pues fué la única diferencia entre las tres dietas; sugiriendo un efecto específico de esta vitamina en el aprovechamiento del alimento. No obstante, los mecanismos detrás de este efecto requieren de más estudios.

La concentración de biotina en el suero es un parámetro que puede servir como indicador del estado funcional de la biotina, cuando la dieta que se consume es de composición constante. Los niveles de biotina en el suero de los ratones del grupo con una dieta suficiente en biotina fueron iguales a los determinados al inicio de estudio, cuando los ratones recibieron desde la gestación y durante la lactancia la biotina en el alimento comercial para roedores (Harlan Teklad 2018SX). Lo anterior se suma a evidencias previas (Báez-Saldaña et al., 2009a, 2009b) que permiten afirmar que la dieta suficiente sirve como control para comparar con las dietas que carecen o tienen dosis farmacológicas de la vitamina. En este estudio se observó una asociación positiva entre la concentración sérica de biotina y su contenido en el alimento, siendo en el grupo suplementado de 2 órdenes de magnitud con respecto a la del grupo suficiente y 20 veces menor en el suero de los ratones deficientes. Es interesante mencionar que el ayuno prolongado redujo a la mitad los niveles de biotina solamente en el grupo suplementado, sin afectar

los de los grupos suficiente y deficiente. Estos resultados podrían deberse a una mayor eliminación de biotina en los ratones suplementados, ya que se sabe que en individuos alimentados con dosis farmacológicas de vitaminas hidrosolubles (incluida la biotina), la excreción de éstas en la orina es mayor con respecto a los sujetos que consumen cantidades normales o insuficientes (Fukuwatari et al. 2010).

Aunque con el diseño de la administración de IGF-I en este estudio no fue posible revertir las acciones deletéreas de la carencia de biotina en el crecimiento corporal, se considera que se requieren más experimentos, tanto sistémicos como moleculares, para descartar definitivamente esta hipótesis. Como perspectivas, se sugiere medir los niveles séricos de ALS, IGFBP3 e IGFBP-5; analizar el estado del receptor de IGF-I en el músculo esquelético de los animales deficientes y evaluar el efecto del restablecimiento de biotina sobre el metabolismo del IGF-I y de su receptor, así como en el crecimiento.

9. Conclusiones

La administración sistémica de IGF-I en ratones con 8 semanas en restricción de biotina no revierte las alteraciones producidas en el crecimiento ni restablece los niveles séricos normales de esta hormona.

Se observó un efecto positivo dependiente de la dosis en el crecimiento corporal de los ratones, asociado a la concentración de biotina en el alimento.

Anexos

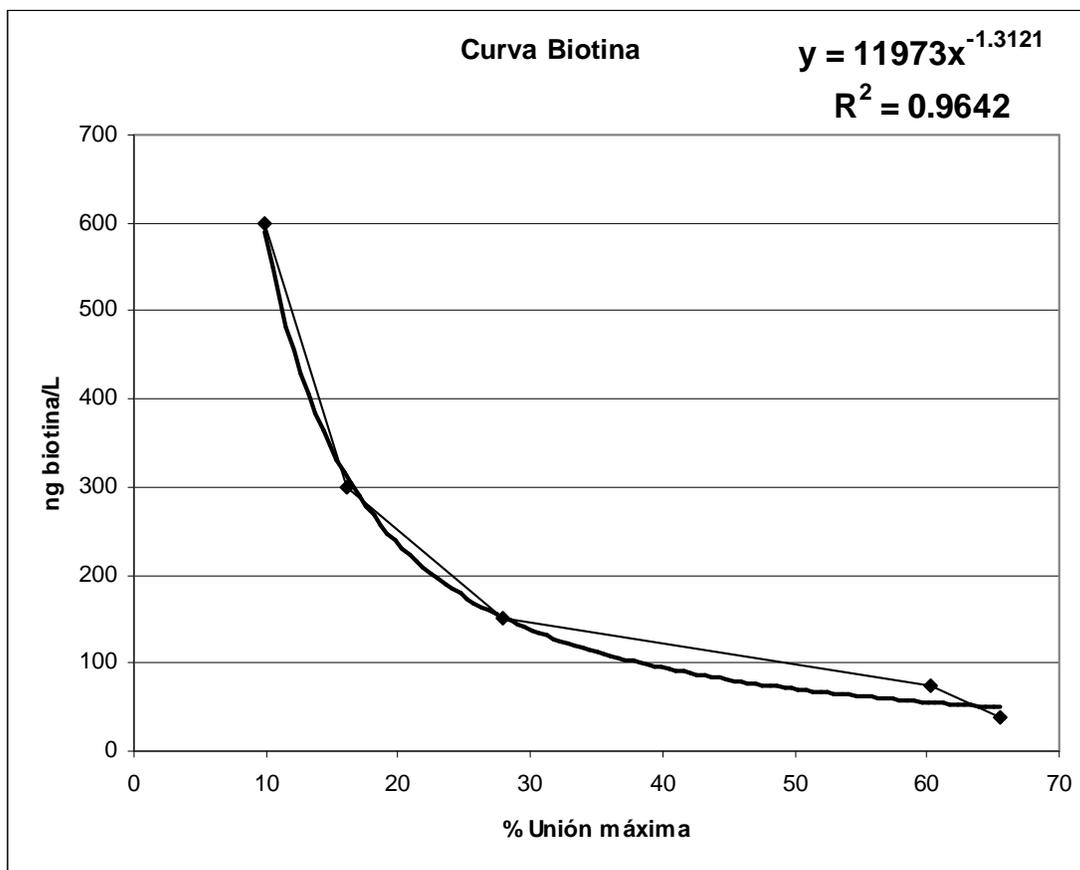
Anexo A.- Formulación de las dietas utilizadas

Dieta deficiente de biotina (TD. 06682)	g/Kg
Clara de huevo desecada, sólidos	300
Dextrosa monohidratada ¹	517.344
Aceite de maíz	100
Celulosa	40
Mezcla de minerales (AIN-76, 170915)	35
Fosfato de calcio dibásico	3.41
Vitamina B12 (0.1% en manitol)	0.03
Pantotenato de calcio	0.066
Citrato de colina dihidrogenado	3.497
Ácido fólico	0.002
Vitamina K3, Menadiona	0.05
Niacina	0.099
Piridoxina HCl	0.022
Riboflavina	0.022
Tiamina HCl	0.022
Vitamina A, Palmitato (500000 IU/g)	0.04
Vitamina D3, Colecalciferol (500000IU/g)	0.004
Vitamina E, Acetato de 2-ambo- α -tocoferol	0.242
Colorante para alimentos azul	0.15

1. En las dietas suficiente y suplementada se sustituyeron 0.004 (16.4 μ mol) y 0.1g (410 μ mol) de dextrosa por biotina respectivamente.

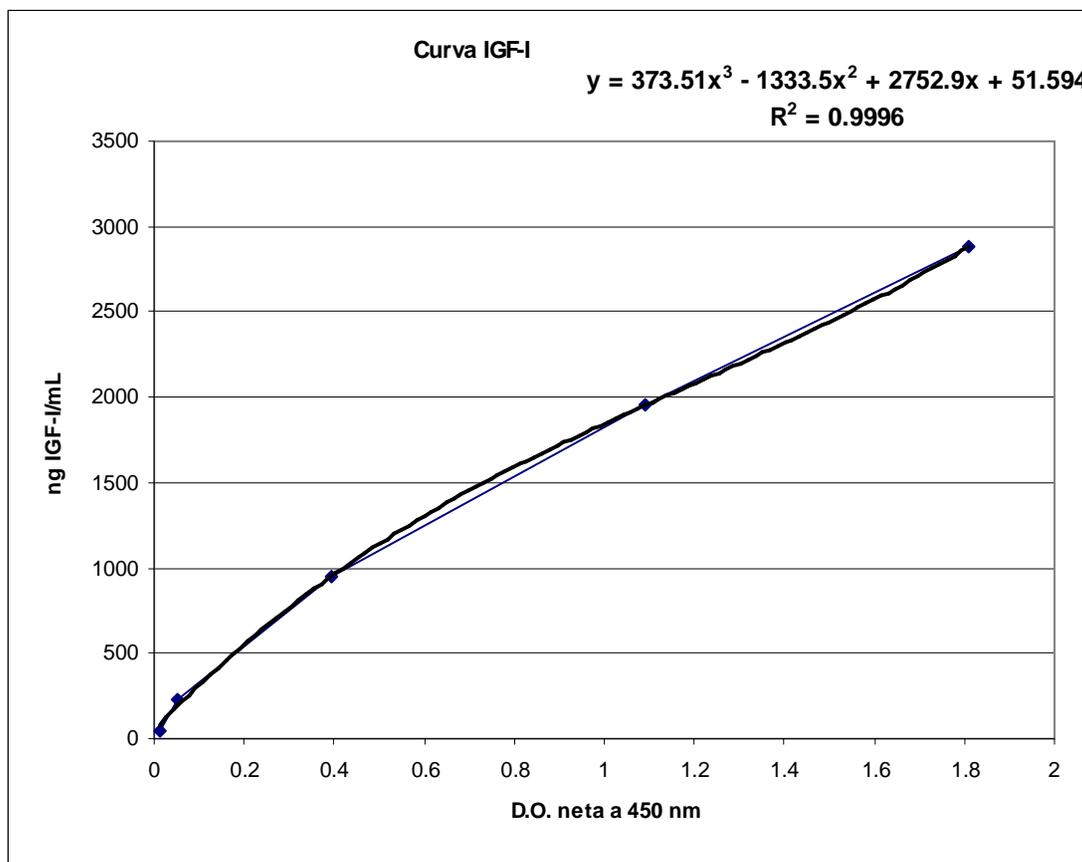
Anexo B.- Curva estándar del ensayo de biotina

Estándar	D.O.	%Unión máxima	ng Biotina/L
A	2.117	100.0	0
B	1.388	65.6	37.5
C	1.276	60.3	75
D	0.592	28.0	150
E	0.342	16.2	300
F	0.21	9.9	600



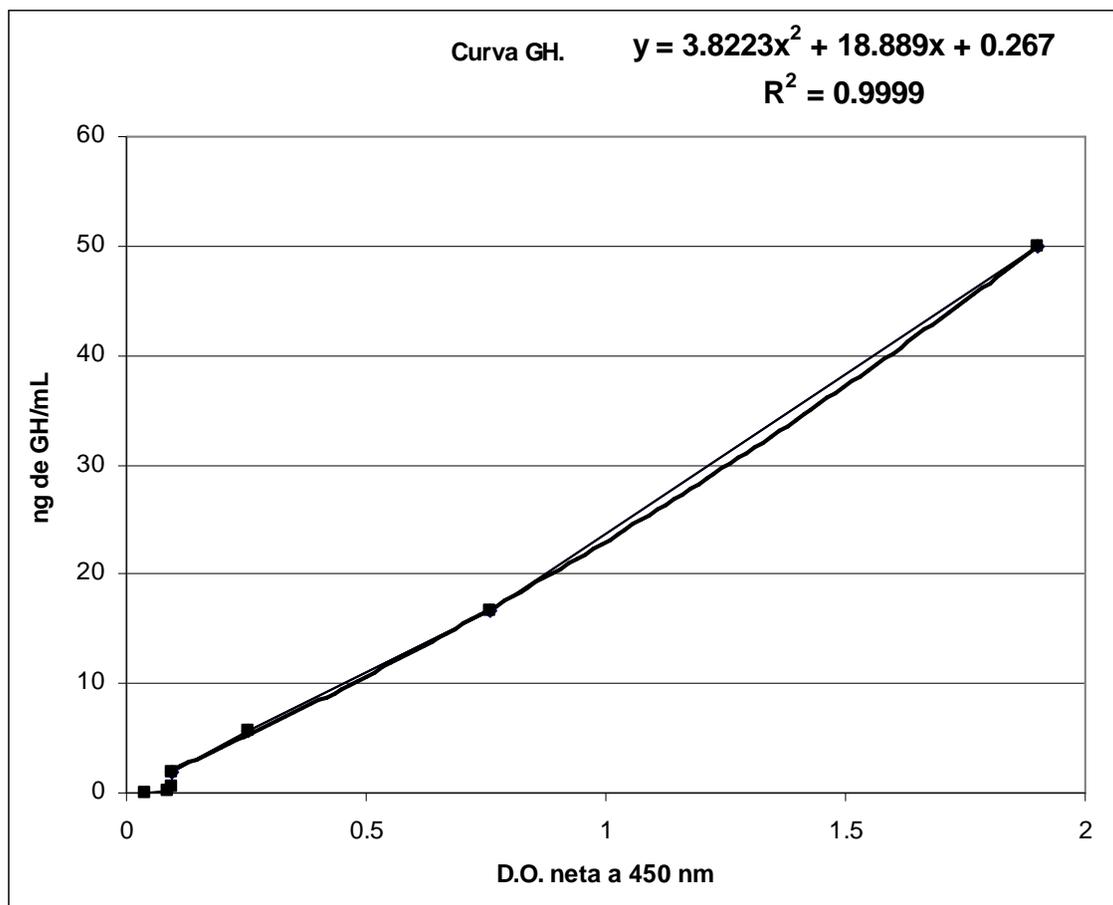
Anexo C.- Curva estándar del ensayo de IGF-I

Estándar	D.O.	D.O. neta	ng IGF-I /ml
A	0.098	0.011	51
B	0.138	0.051	225
C	0.481	0.394	945
D	1.176	1.089	1952
E	1.897	1.81	2880



Anexo D.- Curva estándar del ensayo de GH

Estándar	D.O.	D.O. neta	ng GH/mL
A	0.055	0	0
B	0.092	0.037	0.07
C	0.141	0.086	0.21
D	0.149	0.094	0.62
E	0.151	0.096	1.9
F	0.308	0.253	5.6
G	0.814	0.759	16.7
H	1.956	1.901	50



Bibliografía

1. Abu-Elheiga L., Jayakumar A., Baldini A., Chirala S.S., Wakil S.J. Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92:4011– 4015.
2. Alternative Medicine Review. Biotin Monograph. *Thorne Research, Inc.*, Vol. 12, No. 1. 2007 ; pp. 73 – 78.
3. 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 – 437.
4. Báez-Saldaña A., Ortega E. Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004 ; 179 : 1970 – 1977.
5. Báez-Saldaña A., Gutiérrez-Ospina G., Chimal-Monroy J., Fernández-Mejía C., Saavedra R. Biotin deficiency in mice is associated with decreased serum availability of insulin-like growth factor-I. *Eur. J. Nutr.* 2009a; 48 : 137 – 144.
6. Báez-Saldaña A. Camacho-Arroyo I., Espinosa-Aguirre J.J., Neri-Gómez T., Rojas-Ochoa a., Guerra-Araiza C., Larrieta E., Vital P., Díaz G., Chavira R., Fernandez-Mejía C. Biotin deficiency and biotin excess: Effects on the female reproductive system. *Steroids.* 2009b ; 11 : 863 – 869.
7. Baumgartner M.R., Almashanu S., Suormala T., Obie C., Cole R.N., Packman S., Baumgartner E.R., Valle D. The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J. Clin. Invest.* 2001; 107 : 495–504.
8. Brady R.N., Li L.-F., McCormick D.B., and Wright L.D. Bacterial and enzymatic degradation of biotin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1965;19, 777–782.
9. Browner M.F., Taroni F., Sztul E., Rosenberg L.E. Sequence analysis, biogenesis, and mitochondrial import of the alpha-subunit of rat liver propionyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* 1989; 264 : 12680–12685.
10. Burren C.P., Woods K.A., Rose S.J. Clinical and endocrine characteristics in atypical and classical growth hormone insensitivity syndrome. *Hormone Res.* 2001; 55 : 125 – 130.

11. Cederholm T., Arner P., Palmblad J. Low circulating leptin levels in protein-energy malnourished chronically ill elderly patients. *J. Intern. Med.* 1997 ; 242 : 377 – 382.
12. Chaunan J., Dakshinamurti K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J. Biol. Chem.* 1991; 266 : 10035 – 10038.
13. Dakshinamurti K., Cheah-Tan C. Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Can. J. Biochem.* 1968 ; 127 : 17 – 21.
14. Eckert E.D., Pomeroy C., Raymond N. Leptin in anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998 ; 83 : 791 – 795.
15. Fernández-Mejía C. Pharmacological effects of biotin. *J. Nutr. Bio.* 2005; 16 : 424 – 427.
16. Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine (IOM). Dietary Reference Intakes for thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Panthotenic Acid, Biotin, and Choline. *National Academy Press.* USA 1998; p. 378-383.
17. Fukuwatari T., Yoshida E., Takahashi K., Shibata K. Effect of fasting on the urinary excretion of wáter-soluble vitamins in humans and rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2010 ; 56 : 19 – 26.
18. Hassan Y.I., Zempleni J. Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin. *J. Nutr.* 2006; 136: 1763-1765.
19. Ho K.Y., Veldhuis J.D., Johnson M.L., Furlanetto R., Evans W.S., Alberti K.G., Thorner M.O. Fasting enhances growth hormone secretion and amplifies the complex rhythms of growth hormone secretion in man. *J. Clin. Invest.* 1988; 81: 968 – 975.
20. Hudson R., Lacleste J.P., et. al. Código Ético para el Personal Académico del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. 2007; Pags. 26-39.
21. 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.* 1995; 56: 76–83.
22. Kim K.H., McCormick D.B., Bier D.M., Goodridge A.G. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu. Rev. Nutr.* 1997 ;17 : 77–99.

23. Lee J.J., Moon Y.A., Ha J.H., Yoon D.J., Ahn Y.H., Kim K.S. Cloning of human acetyl-CoA carboxylase beta promoter and its regulation by muscle regulatory factors. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 : 2576 – 2585.
24. Le Roith D., Scavo L., Butler A. What is the role of circulating IGF-I?. *Trends. Endocrinol. Metabol.* 2001; 12 : 48 – 52.
25. Liu, J.P., Baker J., Perkins A.S., Robertson E. J., Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (*Igf-1*) and type 1 IGF receptor (*Igf1r*). *Cell.* 1993; 75 : 59–72.
26. Lupu F., Terwilliger J.D., Lee K., Segre G.V., Efstratiadis A. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev. Biol.* 2001; 229 : 141 – 162.
27. McDowell L.R. Vitamins in animal nutrition comparative aspects to human nutrition. *Academic Press.* USA 1989; p. 275-276.
28. Mock D.M., Stadler D.D. Conflicting indicators of biotin status from a cross-sectional study of normal pregnancy. *J. Am. Coll. Nutr.* 1997a; 16 : 252 – 257.
29. Mock D.M., Stadler D.D., Stratton S.L., Mock N.I. Biotin status assessed longitudinally in pregnant women. *J. Nutr.* 1997b; 127 : 710 – 716.
30. Mock D.M., Henrich-Shell C.L., Carnell N., Stumbo P., Mock N.I. 3-hydroxypropionic acid and methylcitric acid are not reliable indicators of marginal biotin deficiency in humans. *J. Nutr.* 2004; 134 : 317–320.
31. Narang M.A., Dumas R., Ayer L.M., Gravel R.A. Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase. *Hum. Mol. Genet.* 2004; 13 : 15–23.
32. Perrini S., Laviola L., Carreira M.C., Cinarelli A., Natalicchio A., Giorgino F. The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanism underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J. Endocrinol.* 2010; 205 : 201-210.
33. Postel-Vinay M.C., Cohen-Tanugi E., Charrier J. Growth Hormone receptors in rat liver membranes: effects of fasting and refeeding, and correlation with plasma somatomedin activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1982; 28 : 657 - 669.
34. Rodriguez-Melendez R., Griffin J.B., Sarath G., Zemleni J. High-throughput immunoblotting identifies biotin-dependent signaling proteins in HepG2 hepatocarcinoma cells. *J. Nutr.* 2005; 135 : 1659 – 1666.

35. 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* 1999; 140: 4595– 600.
36. Rosenfeld R.G., IGF-I therapy in growth disorders. *Eur. J. of Endocrinol.* 2007; 157 : S57 – S60.
37. Russel L. Biotin. En: Vitamins in animal nutrition comparative aspects to human nutrition. Cap. 11. *Academic Press, Inc.* USA 1989 pp. 275 – 297.
38. Said H.M. Biotin: the forgotten vitamin. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002; 75: 179-180.
39. Said H.M. Cell and molecular aspects of human intestinal biotin absorption. *J. Nutr.* 2009; 139 : 158 – 162.
40. Savage M.O., Burren C.P., Rosenfeld R.G. The continuum of growth hormone – IGF-I axis defects causing short stature: diagnostic and therapeutic challenges. *Clin. Endocrinol.* 2009.
41. Sawamura H., Fukuwatari T., Shibata K. Effects of excess biotin administration on the growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in young rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007 ; 71 : 2977 – 2984.
42. Soliman A.T., ElZalabany M.M., Salama M., Ansari B.M. Serum leptin concentrations during severe protein-energy malnutrition: correlation with growth parameters and endocrine function. *Metab.* 2000 ; 49 : 819 – 825.
43. Todd B.J., Fraley G.S., Peck A.C., Schwartz G.J., Etgen A.M. Central insulin-like growth factor 1 receptors play distinct roles in the control of reproduction, food intake, and body weight in female rats. *Biol. Reprod.* 2007 ; 77 : 492 – 503.
44. Vaghefi S.B. Editado por: Watson R.R. Eggs and Health: Myths and Misconceptions. En: Eggs and health promotion. Sección 2 Cap. 9. *Iowa State Press.* USA 2002 p. 86.
45. Villares S.M.F., Laure G., Maniar S., Delehay-Zervas M.C., Martini J.F., Kleincknecht C., Postel-Vinay M.C. Reduced food intake is the main cause of low growth hormone receptor expression in uremic rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1994; 106 : 51 – 56.

46. Walenkamp M.J.E., Wit J.M. Genetics disorders in the GH-IGF-I axis in mouse and man. *Eur. J. Endocrinol.* 2007; 157 : S15 – S26.
47. Wallace J.C., Jitrapakdee S., Chapman-Smith A. Pyruvate carboxylase. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1998; 30 : 1–5.
48. Wilson J., Lorenz K. Biotin and choline in foods – Nutritional importance and methods of analysis: a review. *Food. Chem.* 1979; 4 : 115 – 129.
49. Wit, J.M., Clayton, P.E., Rogol, A.D. Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Hormone & IGF Research.* 2008;18 :89–110.
50. Wolf B., Hymes J., Heard G. S. Biotinidase. Técnica en: Methods in Enzymology. Vol. 184. *Academic Press, Inc.* USA 1990 pp. 103 – 111.
51. Wolf B. Disorders of biotin metabolism. En: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 7° ed. New York: McGraw hill Inc, 1995 : 3151 – 3177.
52. Zempleni J., Mock D.M. Biotin biochemistry and human requirements. *J. Nutr. Biochem.* 1999; 10 : 128-138).
53. Zempleni J. Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu. Rev. Nutr.* 2005; 25 : 175-196.
54. Zempleni J., Wijerante S.S. Hassan Y.I. Biotin. *BioFactors.* 2009; Vol. 32 : 36-46.