



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ABSORCIÓN INTESTINAL DE GLUCOSA Y ACTIVIDAD  
ENZIMÁTICA DE AMILASA EN ESTADO DE DEFICIENCIA  
DE BIOTINA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**TANIA GÓMEZ SIERRA**



**MÉXICO, D.F**

**2011**



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.

## **JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE: Profra. Marina Gavilanes Ruiz

VOCAL: Profra. Lucía Cornejo Barrera

SECRETARIO: Profra. Armida Báez Saldaña

1er. SUPLENTE: Prof. Juan Diego Ortiz Palma

2do. SUPLENTE: Profra. Iliana Elvira González Hernández

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio B-220, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Ciudad Universitaria.

---

Asesora, Dra. Armida Báez Saldaña

---

Sustentante, Tania Gómez Sierra

## **Dedicatorias**

*A mi madre por acompañarme, motivarme y levantarme más de una vez para continuar. Si logré subir esta escalera en gran parte fue gracias a ti.*

*A mi padre por su apoyo incondicional y por exigirme día a día más y más. Gracias a eso he tenido éxito en todo lo que me he propuesto.*

*A Fabiola por apoyarme en mi formación académica y tenerme tanta paciencia. Gracias hermanita.*

*A mis compañeros de laboratorio en especial Oscar, Cecy y Ana Ingrid por la convivencia en el laboratorio y por las inolvidables sesiones de risoterapia. De anetmano gracias.*

*A Argelia por cada uno de los instantes en que estuviste conmigo, por ser mi maestra no sólo en lo profesional, sino también en lo personal, por escucharme, apoyarme en todo momento y guiarme. Pero sobre todo por darme la oportunidad de conocer a ese excelente ser humano que eres.*

*Esta tesis se realizo con el apoyo de los proyectos PAPIIT IN215208 e IN224308 de Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), así como el proyecto 82879 Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).*

### ***Agradecimientos***

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente.*

*A la Dra. Armida Báez Saldaña por sus enseñanzas, dedicación y apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio.*

*Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por sus comentarios y sugerencias en este trabajo, así como por compartir el laboratorio bajo su cargo.*

*A la Dra. Marina Gavilanes Ruiz por sus comentarios y sugerencias realizadas en la revisión de este trabajo.*

*A la Mtra. Lucía Cornejo Barrera por sus consejos, ayuda y las aportaciones realizadas en la revisión de este trabajo.*

*A la M.V.Z. Georgina Díaz Herrera, por las atenciones brindadas y la enseñanza en el manejo de los ratones.*

*Al M.V.Z. Jorge Omar García Rebollar por el tiempo, la paciencia y las atenciones brindadas durante en el manejo de los ratones.*

*A la Mtra. Argelia Sánchez Chinchillas por las sugerencias y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.*

## Lista de abreviaturas

<b>ACC-1</b>	<b>Acetil CoA Carboxilasa 1</b>
<b>ACC-2</b>	<b>Acetil CoA Carboxilasa 2</b>
<b>Bt</b>	<b>Biotina</b>
<b>DEP</b>	<b>Desnutrición Energética-Proteínica</b>
<b>Glc</b>	<b>Glucosa</b>
<b>HC</b>	<b>Hidratos de Carbono</b>
<b>MCC</b>	<b><math>\beta</math>-Metilcrotonil CoA Carboxilasa</b>
<b>PC</b>	<b>Piruvato Carboxilasa</b>
<b>PCC</b>	<b>Propionil CoA Carboxilasa</b>



---

---

## ÍNDICE.

	<b>Página</b>
<b>Capítulo 1. Generalidades</b>	
1.1 Biotina	1
1.1.1 Deficiencia de biotina	5
1.2 Digestión y absorción intestinal de Hidratos de Carbono	6
1.3 Desnutrición Energético-Proteínica (DEP)	8
1.3.1 Estado Nutricional	10
<b>Capítulo 2. Justificación</b>	11
<b>Hipótesis</b>	11
<b>Objetivos</b>	12
<b>Capítulo 3. Modelo Animal</b>	13
<b>Capítulo 4. Diseño Experimental</b>	
4.1 Diagrama General de Trabajo	14
4.2 Consumo de alimento	16
4.3 Análisis en suero sanguíneo	16
4.3.1 Proteínas totales por el método de Bradford	17
4.3.2 Albúmina por el método colorimétrico	18
4.3.3 Glucosa por el método de $\sigma$ -Toluidina	19
4.3.4 Actividad enzimática de $\alpha$ -amilasa	20
4.4 Análisis estadístico	24



---

<b>Capítulo 5. Resultados</b>	25
<b>Capítulo 6. Discusión</b>	35
<b>Capítulo 7. Conclusiones</b>	39
<b>Capítulo 8. Referencias</b>	40
<b>Anexo 1. Composición de las dietas</b>	45
<b>Anexo 2. Normalización de datos</b>	46

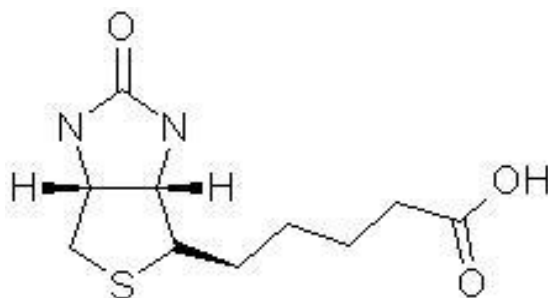




## 1. Generalidades

### 1.1 Biotina

La biotina, ácido D(+)  $\beta$ -hexahidro-2-oxo-1-H-tieno-3,4-imidazol-4-valérico, es una vitamina hidrosoluble del complejo B ( $B_7$ ), también conocida como vitamina H. Químicamente es un heterociclo formado por un anillo ureido y un anillo tetrahidrotiofeno y un sustituyente de ácido valérico que está unido a uno de los átomos de carbono del anillo tetrahidrotiofeno (Figura 1). Debido a que la molécula de biotina tiene tres carbonos asimétricos, se pueden formar ocho estereoisómeros; sin embargo únicamente la D(+)biotina se encuentra en la Naturaleza (Friedrich, 1988; Berdainer, et al., 2009).

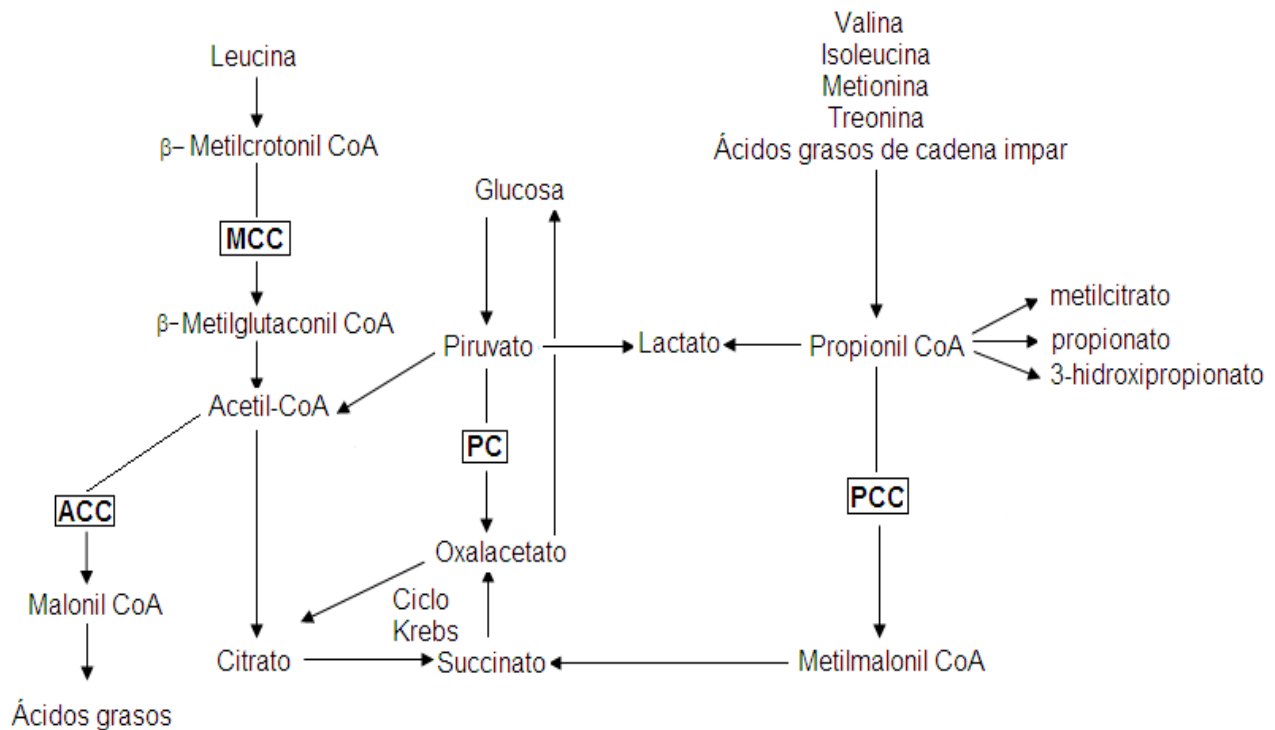


**Figura 1.** Estructura química de la D(+) biotina

Desde 1936 la biotina fue reconocida como un factor indispensable para los seres vivos, siendo en los mamíferos un cofactor de cinco enzimas conocidas como carboxilasas, las cuales catalizan reacciones metabólicas esenciales para la célula (Figura 2). Tres de las cinco carboxilasas son mitocondriales: Piruvato Carboxilasa (PC), Propionil CoA Carboxilasa (PCC),  $\beta$ -Metilcrotonil CoA Carboxilasa (MCC). Mientras que la Acetil CoA Carboxilasa 1 (ACC-1) es citosólica y la Acetil CoA Carboxilasa 2 (ACC-2) está asociada a la membrana mitocondrial externa (Friedrich, 1988; Abu-Elheiga, et al., 2003).



La PC cataliza la conversión de piruvato a oxalacetato, intermediario del Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos. La PCC está involucrada en el catabolismo de aminoácidos (valina, isoleucina, metionina, treonina) y de ácidos grasos de cadena impar y la MCC cataliza uno de los pasos de la degradación de leucina. La ACC-1 y la ACC-2 catalizan la conversión de acetil-CoA a malonil-CoA que, en el caso de la ACC-1, sirve como sustrato para la síntesis de ácidos grasos (Zempleni y Mock, 1999; Pacheco-Álvarez, et. al., 2002), mientras que en el caso de la ACC-2 actúa como regulador de la carnitina palmitoil transferasa 1, inhibiendo el transporte de ácidos grasos a la mitocondria para la  $\beta$ -oxidación (Abu-Elheiga, et al., 2003).



**Figura 2.** Vías metabólicas en las que participan las carboxilasas

(Fuente: Wolf, 1995).



A diferencia de las bacterias, los mamíferos no pueden sintetizar a la biotina, por lo que ésta debe proveerse en la dieta para satisfacer los requerimientos, los que se han estimado desde 5  $\mu\text{g}$  hasta 30  $\mu\text{g}$  por día durante la vida postnatal (Tabla 1). Estas cantidades son de 10-1000 órdenes de magnitud menores a los requerimientos de otras vitaminas hidrosolubles descritas (Berdainer, et al., 2009). En la dieta, la biotina está en concentraciones de 1.3-31.6  $\mu\text{g}/100\text{g}$  alimento y se puede encontrar en su forma libre (vegetales, frutas, leche y cereales) o unida a proteínas (tejidos animales, semillas de plantas y levaduras) (Friedrich W., 1988).

**Tabla 1.** Requerimientos de Biotina (Bt)

<b>Población</b>	<b><math>\mu\text{g}</math> Bt/día*</b>	<b><math>\mu\text{g}</math> Bt/kg de p.c al día**</b>
Lactantes		
0-6 meses	5	1.5-0.64
6-12 meses	6	0.64-0.59
Niños		
1-3 años	12	0.59-0.54
4-8 años	20	0.71-0.46
9-13 años	20	0.69-0.45
14-18 años	25	0.48-0.38
Hombres $\geq 19$ años	30	0.46
Mujeres $\geq 19$ años	30	0.54
Lactancia	35	

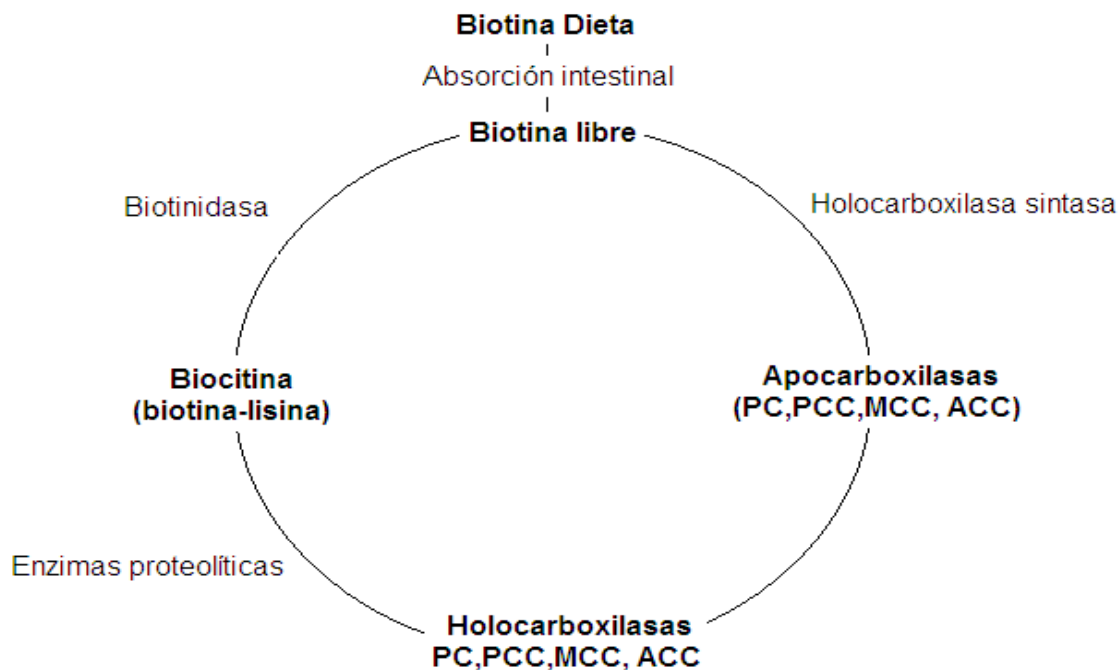
Fuente: \* Instituto de Medicina (IOM), 1998.

\*\* Valor calculado de acuerdo a las tablas de peso para la edad de la NOM-031-SSA2-1999 y de la Academia Mexicana de Pediatría. El peso considerado para los hombres y mujeres  $\geq 19$  años fue de 65 kg y 55 kg respectivamente.



En los alimentos, la biotina se encuentra principalmente unida a proteínas. Para su absorción es necesario primero digerir a las proteínas hasta pequeños péptidos biotinilados o biocitina (dímero biotina-lisina) a través de enzimas proteolíticas y subsecuentemente romper los enlaces con biotina por la biotinidasa pancreática. La biotina libre se absorbe por las porciones distal del duodeno y proximal del yeyuno de donde pasa al torrente sanguíneo.

En las células de los vertebrados se ha propuesto un proceso de reciclamiento de la biotina que garantice su suministro y la homeostasis energética de la célula (Figura 3). La biotina de la sangre entra a la célula por la acción del transportador múltiple de vitaminas dependientes de sodio (SMVT) en donde se incorpora al ciclo para ser unida covalentemente a un residuo específico de lisina en las apocarboxilasas. Esta reacción está catalizada por la holocarboxilasa sintasa, con la cual se activan las carboxilasas. Las holocarboxilasas a través de enzimas proteolíticas se degradan para producir péptidos biotinilados y el dímero biocitina, la cual a su vez es hidrolizada por la biotinidasa para liberar a la biotina y entre nuevamente al ciclo (Wolf, 1995).



**Figura 3.** Ciclo de la biotina  
(Fuente: Wolf, 1995).



### 1.1.1 Deficiencia de biotina

La deficiencia de biotina se produce por un consumo prolongado de clara de huevo cruda, la cual contiene avidina, una proteína que posee gran afinidad por la biotina y que una vez unidas, no permiten ser degradadas por las enzimas digestivas impidiendo en consecuencia su absorción. La nutrición parenteral sin complementación de biotina, la Desnutrición Energético-Proteínica (DEP) de tercer grado, la administración crónica del anticonvulsivante carbamazepina, la hemodiálisis y la Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC) son otras situaciones que causan la deficiencia de esta vitamina (Berdainer, et al., 2009; Shils, et al., 2002).

Independientemente de la etiología de la deficiencia de biotina, los síntomas clínicos son esencialmente los mismos, aunque el orden de aparición y su magnitud pueden ser diferentes. Los síntomas observados son: retraso en el desarrollo corporal postnatal, pérdida de peso, alopecia, dermatitis periorificial, conjuntivitis y acidosis metabólica (Friedrich, 1988; Berdainer, et al., 2009).

Además se han observado efectos de la deficiencia de biotina desde niveles moleculares hasta sistémicos, como la regulación de expresión de genes, proliferación celular, en órganos del sistema inmune, en el aparato reproductor femenino del ratón y durante la gestación (Báez-Saldaña, et al., 1998, 2009; Shils, et al., 2002; Mock, 2005).

El estado funcional de la biotina se ha relacionado de manera importante con el metabolismo de hidratos de carbono (HC) (Wagle, 1963). Las primeras evidencias fueron reportadas por Dakshinamurti y colaboradores quienes encontraron que las ratas con deficiencia de biotina presentaban curvas glucémicas posteriores a una carga de glucosa significativamente superiores a las de las ratas sin deficiencia y que la fosforilación de glucosa y la incorporación de glucógeno en el hígado eran menores.

La deficiencia de biotina afecta negativamente la expresión del gen de enzimas involucradas en el metabolismo de HC como la glucocinasa hepática, enzima clave en la captación posprandial de glucosa, glucocinasa pancreática, enzima involucrada en la



homeostasis de glucosa y del gen de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática, enzima que estimula la producción de glucosa (Citado por Báez-Saldaña, et al., 2004). Adicionalmente, la estimulación del glucagón hacia la gluconeogénesis a partir de lactato en los hepatocitos es negativa en este estado (Daskshinamurti, 2005).

Estudios realizados en ratas deficientes de biotina mostraron una alteración en el metabolismo del islote pancreático, produciendo una disminución en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (Vilches-Flores y Fernández-Mejía, 2005). De la Vega y Stockert en la línea celular HuH7 derivada de hepatocitos humanos cultivados en ausencia de biotina encontraron que esta vitamina regula la expresión del receptor de insulina (Citado por Vilches-Flores y Fernández-Mejía, 2005).

## **1.2. Digestión y absorción intestinal de hidratos de carbono**

Las fuentes principales de HC en la dieta humana normal son sacarosa, lactosa y almidones, los cuales se encuentran particularmente en los granos de cereales y en la leche. Otros HC presentes en la dieta son el glucógeno, ácido láctico, ácido pirúvico, pectinas y dextrinas.

La digestión de HC comienza en la boca al masticarse el alimento y mezclarse con la saliva, la cual contiene a la enzima ptialina también conocida como  $\alpha$ -amilasa salival, secretada principalmente por las glándulas parótidas. Esta enzima hidroliza parcialmente el almidón en una mezcla de dextrinas, glucosa y maltosa. Los alimentos no permanecen mucho tiempo en la boca y al pasar la mezcla al estómago, el jugo gástrico inhibe la actividad de la  $\alpha$ -amilasa salival debido al pH que desciende hasta menos de 4.0. Al vaciarse el quimo del estómago hacia el duodeno, se mezcla inmediatamente con las secreciones pancreáticas, en donde la  $\alpha$ -amilasa pancreática hidroliza las dextrinas en maltosa e isomaltosa. En las células epiteliales del intestino delgado existen cuatro disacaridasas: lactasa, sacarasa, maltasa y  $\alpha$ -dextrinasa,



capaces de desdoblar los disacáridos correspondientes en sus monosacáridos constituyentes y ser absorbidos hacia la sangre portal.

La mayoría de los HC se absorben del intestino principalmente en forma de glucosa, galactosa y fructosa; algunos de estos monosacáridos entran a los eritrocitos, mientras que los otros entran a las células de la mucosa intestinal (Frayn, 1998). La absorción de monosacáridos hacia el interior de la célula depende de la presencia de transportadores en la membrana celular; los cuales se han descrito de dos tipos, unos dependientes de sodio (SGLT) localizados en el intestino y riñón y los otros denominados GLUT localizados en diferentes órganos y tejidos, ver Tabla 2 (Guyton, 1989; Montgomery, et al., 1980).

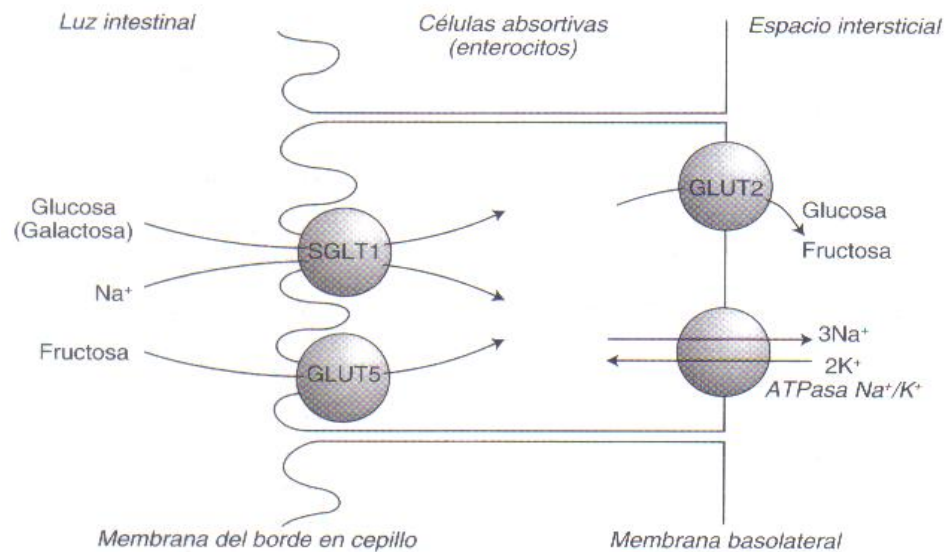
**Tabla 2.** Transportadores de glucosa

<b>Transportador</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Distribución tisular</b>
GLUT1	Glucosa, galactosa, manosa	Eritrocitos, cerebro
GLUT2	Glucosa, fructosa	Hígado, célula $\beta$ -pancreática, intestino, riñón
GLUT3	Glucosa	Cerebro
*GLUT4	Glucosa	Músculo esquelético y cardiaco, tejido adiposo
GLUT5	Fructosa	Intestino (yeyuno)
SGLT1	Glucosa, galactosa	Intestino (duodeno y yeyuno), túbulos renales
SGLT2	Glucosa	Riñón

\*Transportador de glucosa sensible a insulina.

Fuente: Baynes, et al., 2005; Frayn, 1998.

La glucosa es bombeada al interior de las células epiteliales del intestino a través del transportador dependiente de sodio (SGLT-1) y sale a la circulación de la vena portal hepática por difusión facilitada por GLUT2 (Figura 4). La galactosa es absorbida por un proceso similar, compite junto con la glucosa por los transportadores, mientras que la fructosa es absorbida por difusión facilitada en el epitelio intestinal (Guyton, 1989).



**Figura 4.** Transporte de glucosa desde la luz intestinal hacia la sangre (Fuente: Frayn, 1998).

No todos los hidratos de carbono son absorbidos y liberados a la circulación portal, algunos se metabolizan por las células de la mucosa intestinal hasta lactato para generar ATP; aún no se conoce la cantidad de hidratos de carbono que son absorbidos y transformados en lactato (Frayn, 1998).

### 1.3 Desnutrición Energético-Proteínica (DEP)

La DEP es un estado patológico que se deriva por la carencia de múltiples nutrimentos. Este desequilibrio comprende desde deficiencias energéticas, proteínicas, específicas de una o más vitaminas y/o minerales.

Para la clasificación de la DEP, Touissant y García-Aranda en 2008 consideraron los siguientes factores:

1) Etiológico.

Primaria: ingesta deficiente de alimento en cantidad y calidad.





Secundaria: el alimento no se aprovecha por diversas situaciones fisiopatológicas.

Mixta: combinación de las dos situaciones anteriores.

- 2) Tiempo de evolución a partir de los indicadores establecidos por Waterlow (peso para la estatura y estatura para la edad).
- 3) Magnitud o gravedad establecida por Gómez, el cual considera el peso para la edad y el género. Los términos que establece son: Primer grado o leve (90-76 %), Segundo grado o moderado (75-60 %) y Tercer grado o grave (<60 %).

Dentro de la DEP de tercer grado se presentan diferentes casos clínicos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Características desnutrición DEP tercer grado

	<b>Desnutrición calórica Marasmo</b>	<b>Desnutrición proteínica Kwashiorkor</b>
Evolución	Crónica	Aguda
Tejido muscular	Muy disminuido	Muy disminuido
Tejido adiposo	Muy disminuido	Presente pero escaso
Hígado	Normal	Esteatosis, Hepatomegalia
Piel	Seca, sin dermatosis	Lesiones húmedas con dermatosis
Proteínas séricas	Casi normales	Disminuidas
Recuperación	Prolongada (meses)	Breve (semanas)

Fuente: Touissant y García-Aranda 2008.

Los signos característicos de la DEP independientemente de su magnitud son la pérdida de peso, retraso en el crecimiento y diferentes síntomas clínicos asociados a la deficiencia de vitaminas o minerales (Álvarez, et al., 2008).



### 1.3.1 Estado nutricional

El estado nutricional es el equilibrio entre la ingesta de nutrientes y su gasto en diferentes funciones metabólicas así como con el estado de salud de un individuo. Su evaluación es compleja y debe ser individualizada, de manera tal que evalúe la dieta y los diferentes indicadores antropométricos, bioquímicos y del sistema inmune establecidos que en conjunto proporcionan un panorama del estado general del individuo (Jeejeebhoy, 1998; Sacher, 1991).

La evaluación de la dieta consiste en conocer los hábitos de alimentación así como los grupos de alimentos incluidos y las cantidades que se consumen. La evaluación de los indicadores dependerá de las condiciones más adecuadas en el momento.

Los indicadores antropométricos son métodos no invasivos en los cuales se evalúa el tamaño o la composición corporal de un individuo, a través de su estatura, peso corporal y pliegues subcutáneos. Los indicadores bioquímicos miden la concentración de un nutriente o metabolito en sangre, orina, heces o tejidos, algunos de ellos son: proteínas totales, albúmina, prealbúmina, transferrina, la proteína fijadora de retinol y actividad enzimática. Finalmente los indicadores inmunitarios utilizados son el recuento total de linfocitos, recuento de linfocitos T y los niveles de inmunoglobulinas (Fang, et al., 2006; Burtis, et al., 2001). Cabe mencionar que es de suma importancia comparar los indicadores con los valores de referencia establecidos de acuerdo a la edad y género.



## **2. Justificación**

Los modelos animales de deficiencia de biotina, describen la disminución en la ganancia de peso como una característica distintiva de esta condición, misma que durante más de cuatro décadas se había adjudicado a un menor consumo de alimento y como consecuencia de desnutrición. Recientemente se demostró, que la reducción de peso corporal en los ratones deficientes de biotina no tiene relación con una menor ingesta de alimento, ya que ésta es igual o mayor a la de los ratones suficientes de la vitamina. Este hallazgo sugiere que la biotina podría estar involucrada en el proceso de aprovechamiento de los alimentos.

## **2. Hipótesis**

La pérdida de peso de los ratones deficientes de biotina es ocasionada por una alteración en el proceso de digestión y absorción intestinal de hidratos de carbono.



## 2. Objetivos

### General

Evaluar el estado nutricional, el proceso de digestión y absorción intestinal de hidratos de carbono en ratones alimentados con dietas de distinto aporte de biotina.

### Particulares

- Determinar el estado nutricional de los ratones en estudio a través de su crecimiento corporal e ingesta de alimento y la concentración en suero sanguíneo de proteínas totales y albúmina.
- Relacionar el aporte de biotina en la dieta con el metabolismo de glucosa.
- Valorar la digestión de hidratos de carbono complejos a través de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa sérica.
- Evaluar la absorción intestinal de glucosa realizando una curva de absorción de glucosa vía oral.
- Analizar si existe un efecto dosis-respuesta en los parámetros estudiados.



### 3. Modelo animal

Todos los procedimientos efectuados durante la experimentación con los ratones, fueron aprobados por el Comité de Bioética para el Uso de Animales de Experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

En este trabajo se utilizaron tres dietas experimentales denominadas: Deficiente, Suficiente y Suplementada que contienen 0 mg Bt/kg, 4 mg Bt/kg y 100 mg Bt/kg, respectivamente (Catálogo TD.01363, TD.01362 y TD. 02458, marca Harlan Teklad, ver Anexo 1).

En estudios realizados anteriormente se comparó el efecto en el peso corporal de la dieta suficiente con la dieta comercial (Catálogo 2018S, Harlan Teklad) utilizada generalmente por los bioterios de investigación en el peso corporal. Los resultados mostraron que no existe diferencia significativa en el crecimiento corporal de los ratones alimentados con las dietas suficiente y la comercial, lo cual indica que el alimento experimental proporciona los nutrimentos necesarios para el adecuado crecimiento de los ratones (Báez-Saldaña, et al., 1998 y 2004) y por lo tanto en este trabajo se considera como dieta control.

En las dietas suficiente y suplementada no toda la biotina está biodisponible debido a que el alimento contiene como fuente proteínica clara de huevo desecada en la que está presente la glicoproteína avidina. La biotina biodisponible en la dieta suficiente y suplementada es de 1.8 mg Bt/kg y 97.7 mg Bt/kg, respectivamente (Báez-Saldaña, et al., 2009), mientras que con el alimento deficiente además de no contener biotina, se elimina la vitamina previamente presente en el organismo.



## 4. Desarrollo experimental

### 4.1 Diagrama General de Trabajo

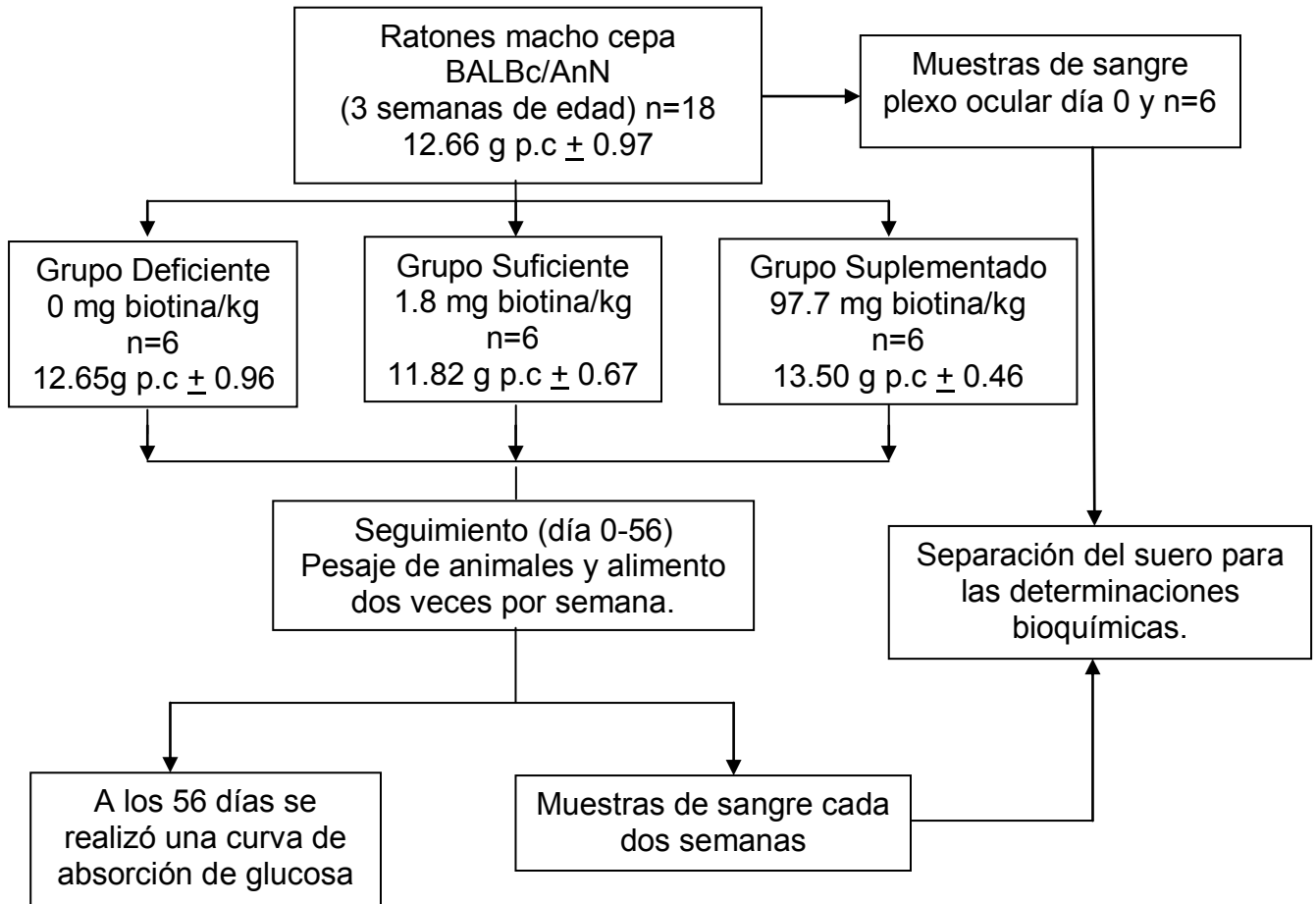
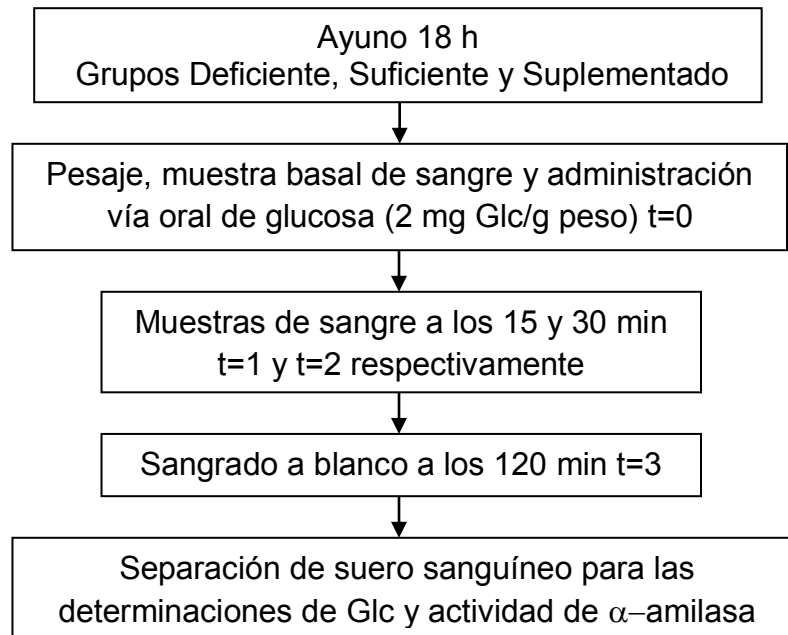


Figura 5. Diagrama general de trabajo



Como se observa en el diagrama anterior de la Figura 5, a los 56 días de experimentación se realizó una curva de absorción oral de glucosa, según el procedimiento detallado en la Figura 6.



**Figura 6.** Diagrama de trabajo de la curva de absorción de glucosa vía oral

El estudio se realizó con 18 ratones de la cepa BALBc/AnN del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, que tenían tres semanas de edad y un peso promedio de  $12.66 \pm 0.97$  g al inicio de la experimentación. Se mantuvieron durante el estudio en condiciones controladas de luz/oscuridad (12 h x 12 h), con alimento y agua *ad libitum*. Los animales fueron distribuidos en tres grupos, cuidando que tuvieran entre ellos el mismo peso promedio y dispersión, al momento de asignarles las dietas denominadas Deficiente, Suficiente y Suplementada.



El momento en que se formaron los grupos se consideró como tiempo cero y a partir de éste se realizó el seguimiento registrando el peso individual de los ratones y el consumo de alimento por grupo, dos veces por semana aproximadamente a la misma hora del día y hasta el final de la experimentación. Además se tomaron muestras de sangre del plexo ocular en intervalos de dos semanas. En el suero sanguíneo se determinaron las concentraciones de proteínas totales, albúmina, glucosa (Glc) y la actividad enzimática de  $\alpha$ -amilasa.

#### 4.2 Consumo de alimento

El consumo de alimento se registró dos veces por semana para cada grupo. Los cálculos se realizaron de la siguiente forma:

$$\text{Consumo de alimento por día} = \frac{((I-F)/n)}{t}$$
$$\text{Consumo específico de alimento} = \frac{\text{Consumo de alimento por día}}{P}$$

I= alimento inicial (g)  
F= alimento final (g)  
n= número de ratones  
t= tiempo (días)  
P= peso promedio grupo (g)

#### 4.3 Análisis en suero sanguíneo

Las muestras de suero colectadas a lo largo del estudio, se obtuvieron cuando los ratones estaban sin ayuno. A las ocho semanas de experimentación, los ratones se mantuvieron en un ayuno de 18 h para evaluar la absorción oral de glucosa. Para comparar los parámetros determinados en este trabajo a las 8 semanas sin ayuno, éstos se midieron en un grupo paralelo de ratones con el mismo tiempo y condiciones de experimentación.





En cada tiempo de análisis, los animales fueron anestesiados con Sevoflurano obteniendo las muestras de sangre a través del plexo ocular usando un tubo de vidrio capilar. El suero se obtuvo por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min y se fraccionó en diferentes volúmenes para almacenarlos a -20 °C hasta el momento de su análisis. Las determinaciones bioquímicas en el suero se realizaron por espectrofotometría y en cada uno de los ensayos se realizó la curva estándar correspondiente. Para calcular la concentración del indicador en el suero, el valor de la absorbancia se interpoló en la curva estándar y dependiendo del caso se multiplicó por el factor de dilución.

#### **4.3.1 Proteínas totales por el método de Bradford**

##### *Fundamento*

Los grupos funcionales ácidos y básicos de las proteínas interactúan con el reactivo azul de Coomassie formando un compuesto colorido cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas (Bradford, 1976).

##### *Reactivos*

- Reactivo de Bradford (Bio-Rad 43622A)
- Estándar de albúmina 1 mg/mL. Se disolvieron 0.0109 g de albúmina sérica bovina fracción V (BSA) (Roche 10735086001) en 10.9 mL de agua destilada que se almacenaron en alícuotas de 1 mL a -20°C.

##### *Curva de calibración*

El estándar de albúmina se diluyó 1:10 con agua destilada y a partir de éste se tomaron alícuotas de 0, 20, 50, 100, 150  $\mu$ L y se ajustaron a un volumen final de 200  $\mu$ L con agua destilada.

##### *Preparación de la muestra*

Las muestras de suero se diluyeron 1:3000 con agua destilada.



### *Procedimiento*

1. En cada pozo de una microplaca para EIA/RIA (Costar 9017), se depositaron en triplicado 160  $\mu$ L de la muestra o estándar y a continuación se agregaron 40  $\mu$ L del reactivo de Bradford.
2. La mezcla de reactivos se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos con agitación en el agitador de microplacas (Boekel Scientific Microjive).
3. En un lector de microplacas (Biotek EL808) se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

### **4.3.2 Albúmina por el método colorimétrico (verde de bromocresol)**

#### *Fundamento*

La albúmina a pH ácido se fija al verde de bromocresol (VBC) produciendo un cambio de color del indicador de amarillo verdoso a verde azulado que es proporcional a la concentración de albúmina presente en la muestra ensayada (Doumas, 1970 y 1996).

#### *Reactivos*

- Solución amortiguadora de succinato 50 mM, pH 4.0: Se disolvieron 1.1835 g ácido succínico (Sigma S-2378) en 150 mL de agua destilada; se adicionó ProClin 200 (Supelco S-00380) al 0.04 %, y se ajustó a un volumen final de 200 mL con agua destilada. Se ajustó el pH a  $4.08 \pm 0.02$  y se almacenó a 4 °C.
- Solución estándar de Verde de Bromocresol (VBC) 0.3 mM: Se disolvieron 0.0419 g VBC (Sigma 114359) en 1 mL de NaOH 0.1 N. Posteriormente se diluyó con agua destilada hasta llegar a un volumen final de 200 mL. Se almacenó a 4 °C protegido de la luz.
- Reactivo de albúmina: Se diluyó un volumen de solución estándar de VBC con tres volúmenes de la solución amortiguadora de succinato 50 mM, se adicionó Tween 20 (Sigma P-5927) al 0.4 %. Se ajustó el pH a  $4.23 \pm 0.02$  y se almacenó a 4 °C protegido de la luz.



- Estándar de albúmina 0.1 g/mL: Se disolvió 1.0027 g de BSA y se llevó a un volumen final de 10 mL con agua destilada. Se almacenaron en alícuotas de 1 mL a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### *Curva de calibración*

A partir del estándar de albúmina se tomaron alícuotas de 0, 100, 300, 500, 800 y 1000  $\mu\text{L}$  y se ajustaron a un volumen final de 1000  $\mu\text{L}$  con agua destilada.

#### *Procedimiento*

1. En cada pozo de una microplaca para EIA/RIA (Costar 9017) se depositaron por triplicado 2  $\mu\text{L}$  de muestra o estándar y a continuación se agregaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de albúmina.
2. La mezcla de reactivos se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos con agitación en el agitador de microplacas (Boekel Scientific Microjive).
3. En un lector de microplacas (Biotek EL808) se midió la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm.

### **4.3.3 Glucosa por el método de *o*-Toluidina**

#### *Fundamento*

La glucosa reacciona en medio ácido y en presencia de calor con la *o*-toluidina para formar un compuesto de color azul-verde (N-glucosilamina) proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada. Es el método más utilizado debido a su alta especificidad, sencillez y a que no se tiene que desproteinizar el suero en la determinación (Henry 1974).

#### *Reactivos*

- Reactivo *o*-Toluidina. Se disolvieron 0.5040 g de tiourea (Sigma T-8656) en 9 mL de *o*-toluidina (Merck K33102610) y se llevó a un volumen final de 100 mL con ácido acético glacial (Merck K33688063). Se almacenó en un frasco color ámbar en refrigeración.



- Estándar de glucosa 1 mg/mL. Se disolvieron 0.01 g de glucosa anhidra pura (dextrosa) (Sigma G-6152) en 10 mL de agua destilada. Se almacenaron en alícuotas de 1 mL a -20 °C.

#### *Curva de calibración*

La solución estándar de glucosa se diluyó 1:10 con el reactivo de *o*-toluidina. De esta dilución se tomaron alícuotas de 0, 10, 20, 50 y 150  $\mu$ L y se ajustaron a un volumen final de 250  $\mu$ L con el reactivo de *o*-toluidina.

#### *Preparación de la muestra*

En un tubo Eppendorf se depositaron 5  $\mu$ L de suero y a continuación se adicionaron 245  $\mu$ L del reactivo de *o*-toluidina.

#### *Procedimiento*

1. Se colocaron los tubos Eppendorf (muestras y estándares) en un baño de agua a ebullición durante 10 min.
2. Una vez fríos los tubos se depositaron 200  $\mu$ L de los estándares y de las muestras en cada pozo de una microplaca para EIA/RIA (Costar 9017).
3. En un lector de microplacas (Biotek EL808) se midió la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm.

#### **4.3.4 Actividad enzimática de $\alpha$ -amilasa**

Se empleó un método sacarogénico para medir la actividad de  $\alpha$ -amilasa debido a que es uno de los más confiables y utilizados (Kaplan, 1990). En una reacción enzimática se pueden distinguir tres fases: la de retardo, la lineal y de agotamiento. Para determinar la actividad de una enzima es necesario estar en la zona lineal para que la formación de producto sea constante y únicamente dependa de la concentración de la enzima presente en la muestra (Eisenthal, 1992; Harris, 2009). Aunque en la literatura se indica que el tiempo de incubación del sustrato con la enzima es de 30 min; en este trabajo se realizó un estudio cinético para verificar que en el laboratorio este tiempo



estuviera en la zona lineal. El método consistió en medir la absorbancia en diferentes tiempos de incubación (10, 20, 30, 45 y 60 min).

### *Fundamento*

Los productos liberados por la acción de la amilasa sobre el sustrato son sustancias reductoras, las cuales reaccionan en presencia de metales pesados. La actividad enzimática es directamente proporcional a la cantidad de sustancia reductora producida (Henry, 1960 y 1974).

### *Reactivos*

- Solución de fosfatos 0.1 M pH 7. Se disolvieron 1.1121 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Baker 3246-01) y 2.3366 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Baker 3818-01) en 100 mL de agua destilada y se llevaron a un volumen final de 250 mL. Se midió el pH de la solución el cual fue de  $7.02 \pm 0.02$ .
- Sustrato. Se disolvieron 1.5329 g de almidón soluble grado alimenticio en 100 mL de la solución de fosfatos pH  $7.02 \pm 0.02$  y se calentó a ebullición durante tres minutos. Se enfrió a temperatura ambiente y se llevó a un volumen final de 140 mL con la solución de fosfatos.
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.66 N. Se diluyeron 5.5 mL de ácido en 300 mL de agua destilada.
- Tungstato de sodio 10 %. Se disolvieron 2 g de tungstato de sodio (Técnica Química T1230) en 20 mL de agua destilada.
- Estándar de maltosa 0.1 g/mL: Se disolvieron 0.1139 g de maltosa monohidratada (Sigma M-5885) en 1.139 mL de agua destilada. Se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$ .
- Reactivo de cobre. Se disolvieron 2.0054 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidro (Merck 6392) en 20 mL de agua destilada. Se adicionaron 0.375 g de ácido tartárico (Baker Analyzed 33717) y una vez disuelto se agregó 0.225 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Sigma C-7631). Se mezcló y se llevó a un volumen de 50 mL con agua destilada.
- Reactivo de ácido fosfomolibdico. Se disolvieron 3.4928 g de ácido molibdico (Reasol) y 0.5118 g de tungstato de sodio en 20 mL de  $\text{NaOH}$  10 % y 20 mL de agua destilada. Se hirvieron durante 30 min para eliminar  $\text{NH}_3$ . Posteriormente se enfrió a



temperatura ambiente y se agregó agua destilada hasta llegar a un volumen de 20 mL. Se adicionaron 12.5 mL de ácido ortofosfórico concentrado (85 %  $H_3PO_4$ ) y se llevó a un volumen final de 50 mL con agua destilada.

- Solución de cloruro de sodio al 0.9 %. Se disolvieron 0.7220 g de NaCl (Sigma S7653) en 80 mL de agua destilada y se almacenó a 4 °C.

#### *Curva de calibración*

A partir del estándar de maltosa se tomaron alícuotas de 0, 15, 30, 45, 60 y 75  $\mu$ L y se ajustaron a un volumen final de 500  $\mu$ L con agua destilada.

#### *Preparación de la muestra*

Las muestras de suero se diluyeron 1:2 con solución salina al 0.9 %.

#### *Procedimiento*

1. En un tubo Eppendorf se adicionaron 70  $\mu$ L del sustrato y se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante cinco minutos y a continuación se agregaron 10  $\mu$ L de suero diluido, se mezcló y se colocaron nuevamente en el baño de agua. Las determinaciones se realizaron por duplicado.
2. Después del tiempo de incubación establecido se retiraron los tubos del baño e inmediatamente se agregó a cada tubo 15  $\mu$ L de  $H_2SO_4$  0.66N y se mezcló, después se agregaron 5  $\mu$ L de tungstato de sodio al 10 % y nuevamente se mezcló.
3. Se centrifugó a 5000 rpm por dos minutos y se transfirieron 40  $\mu$ L del sobrenadante a un tubo Eppendorf.
4. Los productos obtenidos de la acción enzimática se cuantificaron por el método de azúcares reductores. Para los estándares se procedió de la misma forma.

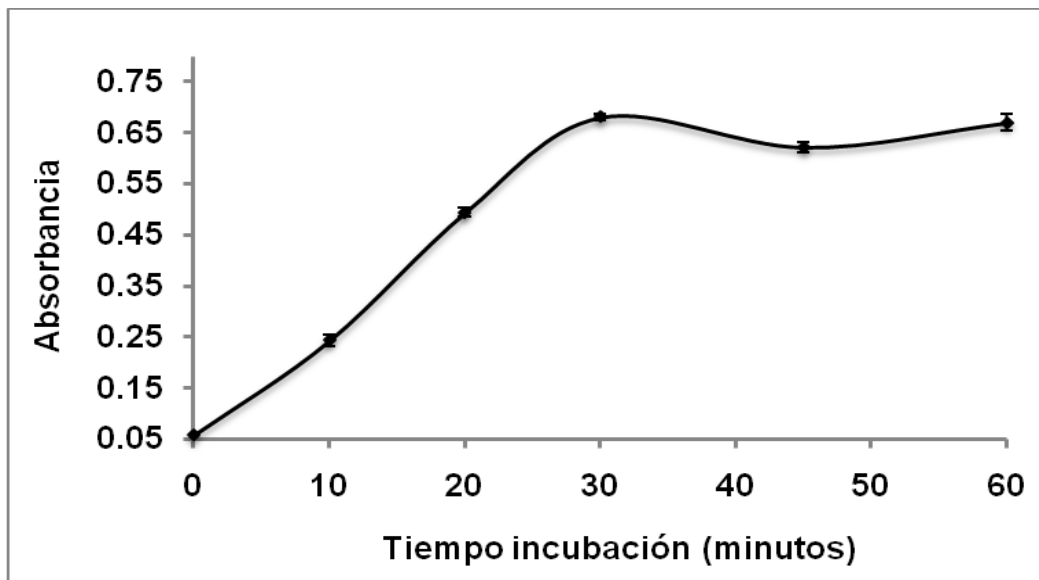
#### *Método de Folin-Wu (azúcares reductores)*

5. A cada tubo Eppendorf se le agregaron 40  $\mu$ L del reactivo de cobre y se agitaron en vortex durante cinco segundos.



6. Se colocaron los tubos en un baño de agua hirviendo durante 10 min.
7. Los tubos se enfriaron a temperatura ambiente y se adicionó a cada tubo 40  $\mu$ L del reactivo de ácido fosfomolibdico y se colocaron en un baño de agua hirviendo durante cinco minutos.
8. Posteriormente se diluyó 1:10 con agua y se mezcló por inversión.
9. En cada pozo de una microplaca para EIA/RIA (Costar 9017), se depositaron 200  $\mu$ L de los estándares y de las muestras.
10. En un lector de microplacas (Biotek EL808), se midió la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm.

Los resultados del estudio cinético mostraron que la respuesta es lineal desde los 10 hasta los 30 min de incubación (Figura 7), en tiempos posteriores la respuesta se mantuvo constante y por lo tanto la actividad de la enzima no se encuentra en la zona lineal. Para cuantificar la actividad de la enzima en el suero de los ratones se estableció como tiempo de incubación 30 min puesto que se reprodujo en el laboratorio lo descrito en la literatura.



**Figura 7.** Linealidad de producto formado por  $\alpha$ -amilasa sérica de ratón  
Valores promedio  $\pm$  D.E, n=3



#### **4.4 Análisis Estadístico**

El análisis estadístico se realizó para cada determinación utilizando el software SigmaStat 3.1, comparando las medias a través de un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparación múltiple.



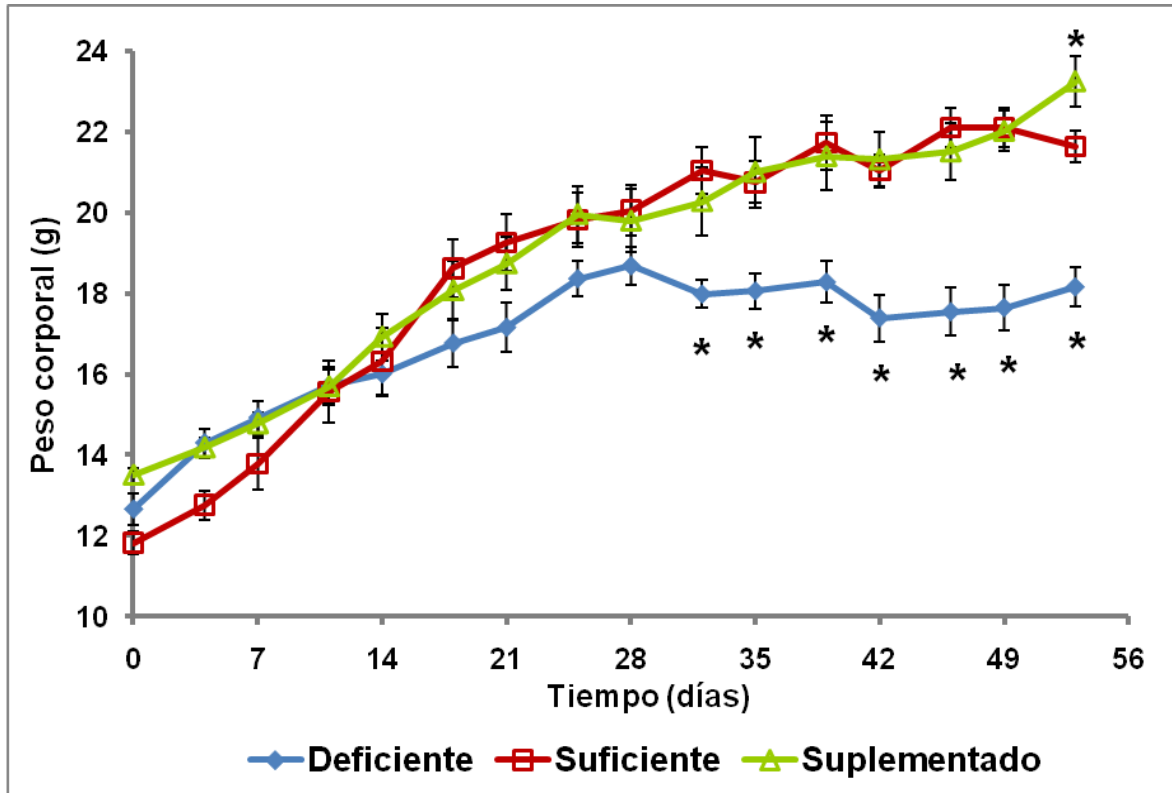


## 5. Resultados

**Peso corporal y velocidad de crecimiento.** Durante el tiempo de experimentación se realizó el seguimiento de los grupos registrando el peso individual de los ratones (día 0-56); a partir del cual se elaboró la curva de crecimiento (Figura 8), misma que fue similar para los tres grupos hasta el día 28. Posteriormente, se observó que la curva del grupo deficiente se ubicó por debajo de las otras dos permaneciendo constante hasta el final del estudio. Este comportamiento se puede apreciar más claramente en la Tabla 4 en donde la velocidad de crecimiento del grupo deficiente es la misma a los 42 y 53 días. Consecuentemente al término del estudio, tanto el peso como la velocidad de crecimiento del grupo deficiente fueron menores a las de los grupos suficiente y suplementado.

En la curva de crecimiento a los 53 días se observó diferencia significativa entre el grupo suficiente y suplementado. Este comportamiento también se observó en el grupo en paralelo que se estaba trabajando en el laboratorio (mismas condiciones experimentales), el cual fue sometido a un tiempo de experimentación mayor, de tal forma que se puede decir que la suplementación de biotina favorece el crecimiento de los animales.

Como se describió en el procedimiento experimental, previamente al sacrificio los ratones se sometieron a un ayuno de 18 h y cabe mencionar que esta condición produce la inmediata reducción del peso en 5.9 %, 6.6 % y 7.6 % en promedio para los grupos deficiente, suficiente y suplementado, respectivamente; aunque estos valores no se presentan en las curvas de la Figura 8 ni en la Tabla 4.



**Figura 8.** Curva de crecimiento de los tres grupos experimentales  
 Valores promedio  $\pm$  ESM, n=6  
 \* Diferencia significativa entre grupos (P<0.001)

**Tabla 4.** Velocidad de crecimiento<sup>1</sup>

Grupo	VC <sub>7</sub> (g/día)	VC <sub>14</sub> (g/día)	VC <sub>28</sub> (g/día)	VC <sub>32</sub> (g/día)	VC <sub>42</sub> (g/día)	VC <sub>53</sub> (g/día)
Deficiente	0.32 $\pm$ 0.07	0.24 $\pm$ 0.5	0.22 $\pm$ 0.02	*0.17 $\pm$ 0.01	*0.11 $\pm$ 0.01	*0.10 $\pm$ 0.01
Suficiente	0.28 $\pm$ 0.08	0.32 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.01
Suplementado	0.18 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.01

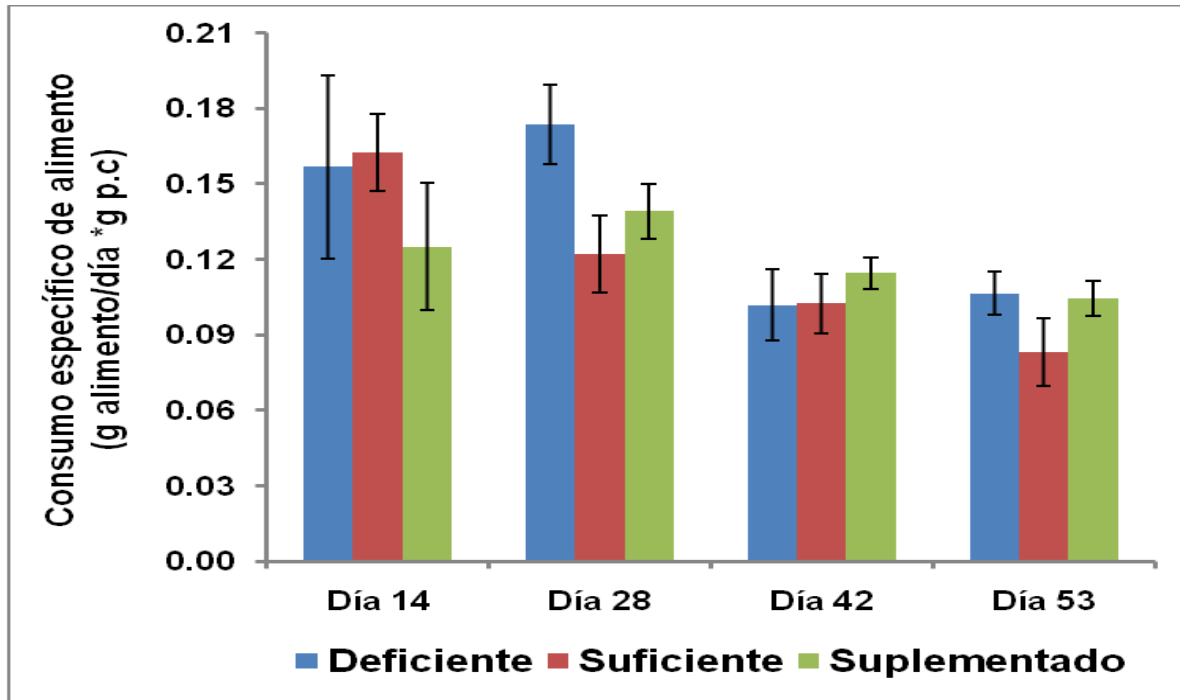
Valores promedio  $\pm$  ESM, n=6  
 \* Diferencia significativa entre grupos (P<0.01)

<sup>1</sup>Velocidad de crecimiento (VC)= (Peso final-Peso inicial)/Número de días del bioensayo.

El subíndice en la velocidad de crecimiento (VC) indica el día en que se calculó.



**Consumo de alimento.** El seguimiento del consumo específico de alimento se presenta en la Figura 9. Durante la primera mitad del experimento el consumo promedio de los ratones en los tres grupos osciló alrededor de 0.15 g alimento/día \* g p.c y fue menor en 30 % en la segunda mitad. No se observaron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales a ninguno de los tiempos estudiados.



**Figura 9.** Consumo de alimento de los tres grupos experimentales  
Valores promedio  $\pm$  ESM, n=4

\* Diferencia significativa entre grupos (P<0.006)



**Indicadores del estado nutricional.** Además del peso corporal, las concentraciones de proteínas totales y albúmina en el suero sanguíneo se han utilizado ampliamente para evaluar el estado nutricional de los individuos (Touissant y García-Aranda, 2008; Jeejeebhoy, 1998). En la Tabla 5 se muestran estos indicadores bioquímicos junto con los datos del peso corporal de la Figura 8 para hacer más clara la comparación.

Igual que para el consumo específico de alimento, estos parámetros no tuvieron diferencias significativas entre los tres grupos estudiados y además se mantuvieron dentro del valor de referencia reportado (Suckow, et al., 2001), reiterando que la pérdida de peso en el grupo deficiente no se debe a desnutrición por menor ingesta de alimento ni por mala digestión o absorción de proteínas. Es importante resaltar que tampoco hay diferencias entre los valores al inicio de la experimentación (Día 0), momento en el que los ratones se encuentran alimentados con la dieta comercial control, lo que confirma nuevamente que la dieta denominada suficiente cumple con todos los requerimientos para el desarrollo adecuado de esta especie (Báez-Saldaña, et al., 2004). Adicionalmente, el ayuno de 18 h no causó algún cambio en estos indicadores.



Tabla 5. Indicadores del estado nutricional

Días de estudio	Grupo	Peso Corporal (g)	Proteínas Totales (g/L)	Albúmina (g/L)
0	Dieta control	12.66 ± 0.97	52.6 ± 2.3	39.0 ± 1.2
14	Deficiente	16.00 ± 0.54	50.9 ± 4.1	37.5 ± 2.3
	Suficiente	16.31 ± 0.82	54.8 ± 4.1	42.4 ± 1.2
	Suplementado	16.92 ± 0.58	47.9 ± 4.2	36.6 ± 1.4
28	Deficiente	18.68 ± 0.47	63.5 ± 2.9	37.4 ± 2.3
	Suficiente	20.04 ± 0.62	58.3 ± 1.7	42.9 ± 0.8
	Suplementado	19.79 ± 0.78	53.6 ± 1.7	40.2 ± 0.7
42	Deficiente	*17.39 ± 0.58	59.5 ± 3.7	39.2 ± 3.0
	Suficiente	21.04 ± 0.38	61.5 ± 1.8	39.8 ± 1.8
	Suplementado	21.30 ± 0.69	61.6 ± 2.8	40.7 ± 1.7
56 <sup>a</sup>	Deficiente	*17.33 ± 0.14	51.7 ± 2.2	35.7 ± 2.1
	Suficiente	22.54 ± 0.70	55.5 ± 2.0	38.3 ± 0.7
	Suplementado	*25.31 ± 0.57	54.4 ± 3.4	40.9 ± 2.9
<b>Ayuno 18 h</b>				
56	Deficiente	*17.08 ± 0.55	65.3 ± 3.5	48.1 ± 3.4
	Suficiente	20.55 ± 0.40	63.2 ± 1.5	46.8 ± 3.8
	Suplementado	21.55 ± 0.59	64.5 ± 3.3	42.9 ± 2.4

Valores promedio ± ESM, n=6

\* Diferencia significativa entre grupos (P&lt;0.001)

<sup>a</sup> Resultados de los grupos que se trabajaron en paralelo bajo las mismas condiciones experimentales.

**Glucosa sérica.** El estado funcional de la biotina se ha relacionado de manera importante con el metabolismo de la glucosa. Los efectos de la deficiencia de esta vitamina son controvertidos, ya que en ratas se ha observado hiperglucemia (citado por Romero-Navarro, et al., 1999), mientras que en ratones se ha observado hipoglucemia



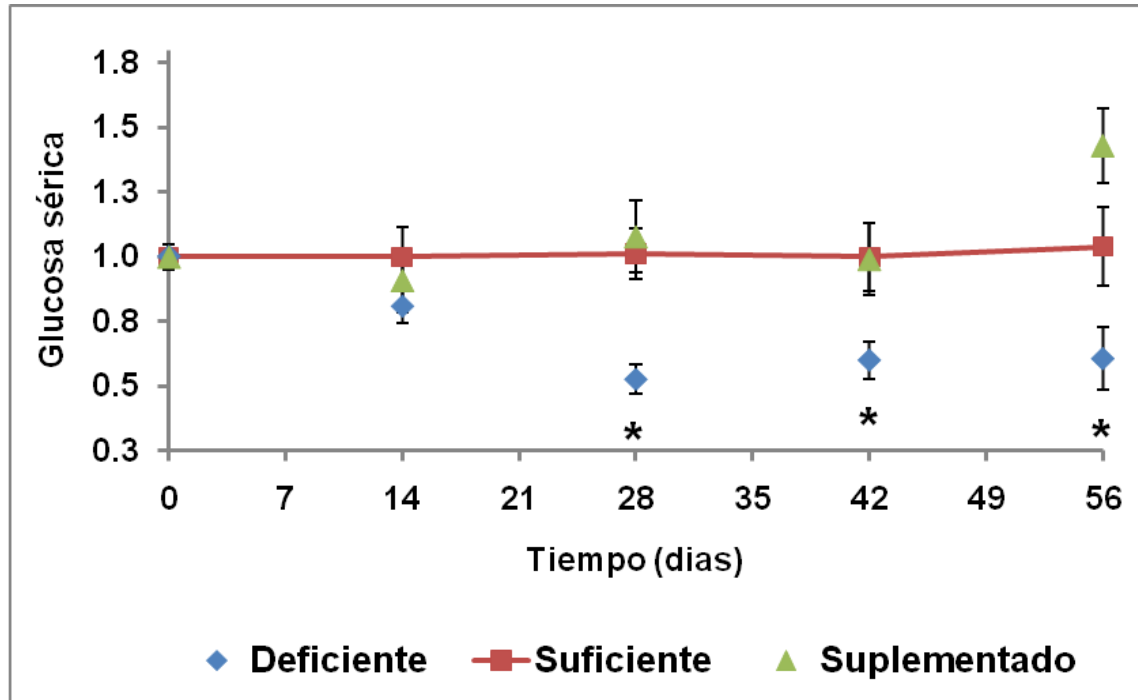
(Del Vecchy, 2006). En la Tabla 6 se muestran las concentraciones de glucosa en donde se puede apreciar que el grupo deficiente a los 28 días entró en un estado de hipoglucemia, el cual permaneció hasta el final de la experimentación, mientras que los grupos suficiente y suplementado se mantuvieron dentro de los valores normales y además no presentaron diferencias significativas entre ellos. En la Figura 10 se puede observar más fácilmente este comportamiento, en donde se utilizaron los valores de los ratones del grupo suficiente como referencia para evaluar los de los otros dos grupos (Ver Anexo 2).

**Tabla 6.** Glucosa sérica

<b>Días de estudio</b>	<b>Grupo</b>	<b>Glucosa (mM)</b>
0	Dieta control	5.1 ± 0.2
14	Deficiente	3.9 ± 0.3
	Suficiente	4.9 ± 0.6
	Suplementado	4.4 ± 0.5
28	Deficiente	*2.7 ± 0.3
	Suficiente	5.1 ± 0.5
	Suplementado	5.5 ± 0.6
42	Deficiente	*2.5 ± 0.3
	Suficiente	4.2 ± 0.6
	Suplementado	4.4 ± 0.5
56	Deficiente	*2.4 ± 0.5
	Suficiente	4.0 ± 0.6
	Suplementado	5.7 ± 0.6

Valores promedio ± ESM, n=6

\* Diferencia significativa entre grupos (P<0.001)



**Figura 10.** Glucosa sérica normalizada con grupo suficiente  
Valores promedio  $\pm$  ESM, n=6  
\* Diferencia significativa entre grupos ( $P < 0.098$ )

**Actividad enzimática  $\alpha$ -amilasa.** En el suero se encuentran dos isoenzimas, la forma (S) salival y la (P) pancreática en una proporción 60:40 respectivamente, de tal forma que sin diferenciarlas, se evaluó su actividad en el suero de los ratones (Henry, 1960; Kaplan, 1990). En la Tabla 7 se muestra la actividad de éstas, misma que no presentó diferencias significativas entre los grupos estudiados.

En estudios *in vitro* se ha observado que la actividad de la  $\alpha$ -amilasa es prácticamente igual con almidón o con glucosa como sustratos (Baks, et al., 2005), por lo cual en este trabajo también se midió su actividad durante el experimento de la curva de absorción de glucosa. En la Figura 11, se muestra que en los tres grupos experimentales la actividad de la  $\alpha$ -amilasa no presenta diferencias significativas entre ellos.

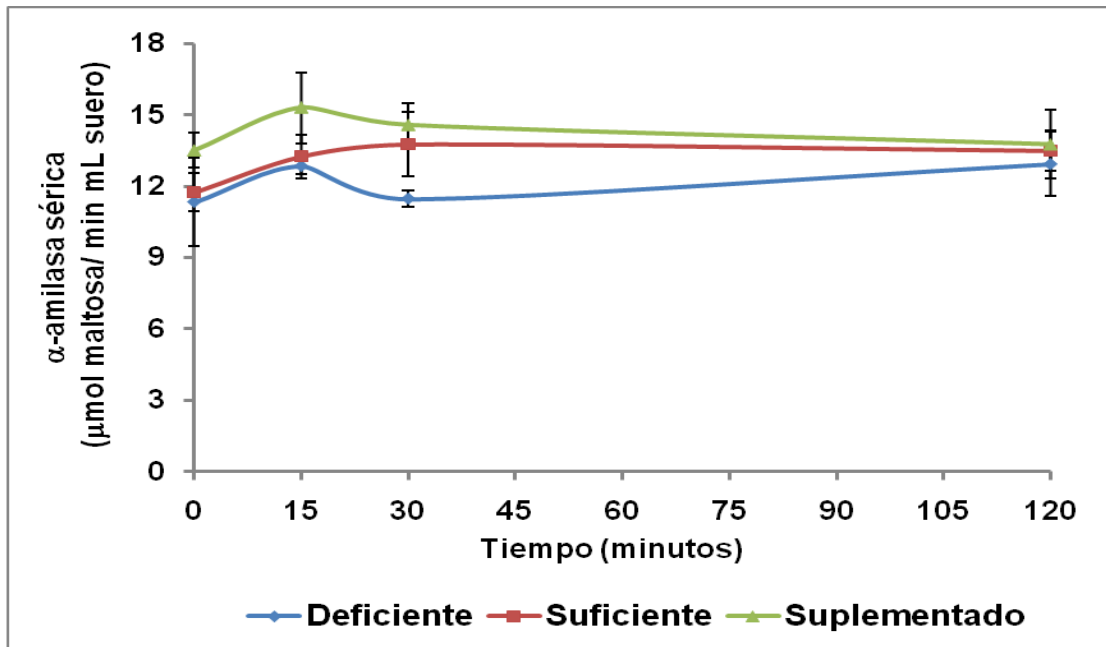
**Tabla 7.** Actividad enzimática de  $\alpha$ -amilasa sérica

<b>Días de estudio</b>	<b>Grupo</b>	<b><math>\alpha</math>-amilasa (<math>\mu</math>mol maltosa/min*mL)</b>
0	Dieta control	14.5 $\pm$ 0.9
14	Deficiente	11.9 $\pm$ 0.4
	Suficiente	12.0 $\pm$ 1.3
	Suplementado	13.7 $\pm$ 1.1
28	Deficiente	10.6 $\pm$ 0.6
	Suficiente	13.0 $\pm$ 0.9
	Suplementado	11.8 $\pm$ 1.1
42	Deficiente	12.1 $\pm$ 0.9
	Suficiente	12.4 $\pm$ 0.8
	Suplementado	13.7 $\pm$ 1.3
56	Deficiente	14.1 $\pm$ 0.3
	Suficiente	14.6 $\pm$ 0.7
	Suplementado	16.4 $\pm$ 1.2

Valores promedio  $\pm$  ESM, n=6

\* Diferencia significativa entre grupos (P&lt;0.002)





**Figura 11.** Actividad enzimática  $\alpha$ -amilasa sérica en la curva de absorción de glucosa vía oral

Valores promedio  $\pm$  ESM, n=6

\* Diferencia significativa entre grupos ( $P < 0.002$ )

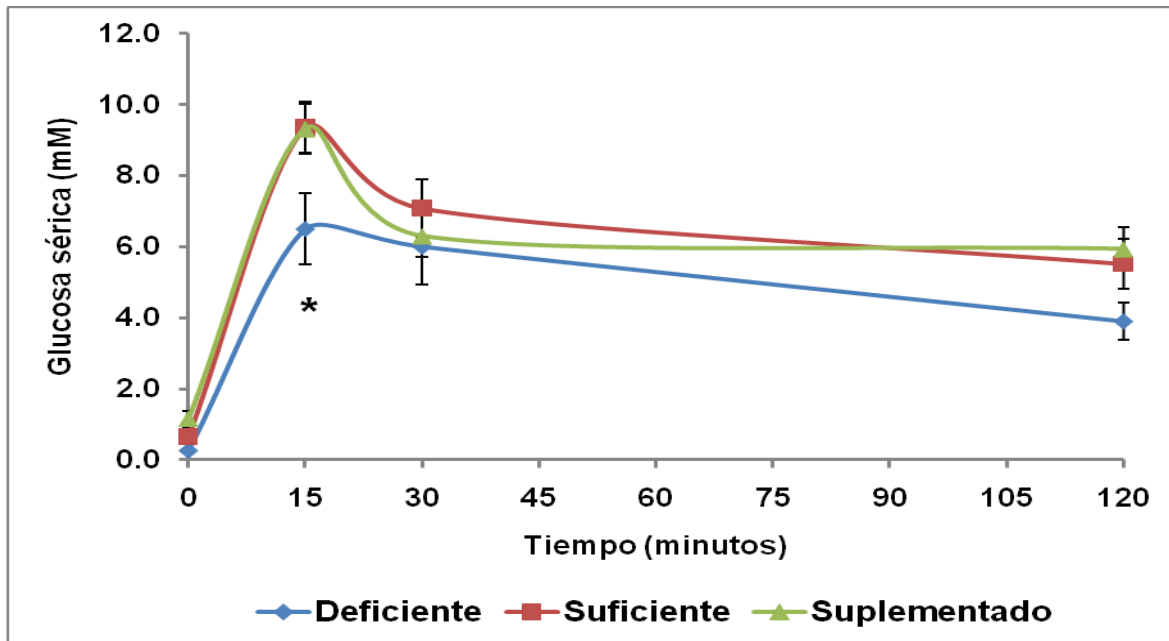
**Absorción intestinal de glucosa.** La absorción intestinal de glucosa se evaluó a través de una curva de absorción oral después de un ayuno de 18 h, cuantificando la glucosa a los 15, 30 y 120 min posteriores a su administración. En la Tabla 8 se muestran los valores numéricos de la concentración sérica de glucosa y en la Figura 12 se presenta la forma gráfica de éstos. Con relación a la glicemia sin ayuno (Tabla 6), el ayuno causó que este hidrato de carbono (HC) disminuyera 10 veces, mientras que en el suficiente y suplementado 6 y 4 veces, respectivamente. A los 15 min de la administración los niveles de glucosa en sangre aumentaron con respecto a la basal 31, 14 y 10 veces en los ratones deficientes, suficientes y suplementados, respectivamente. En los tiempos consecuentes los niveles séricos de glucosa disminuyeron en los tres grupos (Tabla 8).

**Tabla 8.** Concentración glucosa sérica (mM) en la curva de absorción oral de glucosa

Grupo	Basal	15 min	30 min	120 min
<b>Deficiente</b>	0.25 ± 0.5	*6.5 ± 1.0	6.1 ± 1.1	3.9 ± 0.5
<b>Suficiente</b>	0.66 ± 0.5	9.4 ± 0.7	7.1 ± 0.8	5.5 ± 0.7
<b>Suplementado</b>	1.15 ± 0.2	9.3 ± 0.7	6.3 ± 0.6	5.9 ± 0.6

Valores promedio ± ESM, n=6

\* Diferencia significativa entre grupos (P&lt;0.001)

**Figura 12.** Curva de absorción oral de glucosa

Valores promedio ± ESM, n=6

\* Diferencia significativa entre grupos (P&lt;0.001)



## 6. Discusión

El propósito de este estudio fue determinar el mecanismo que produce la pérdida de peso cuando hay deficiencia puntual de biotina. Se abordaron dos posibilidades: a) Alteraciones en la digestión y/o absorción de proteínas e hidratos de carbono e b) Indicadores bioquímicos que correspondan a desnutrición. Por otra parte, también se estudió si la alimentación con una dieta que aporta dosis farmacológicas de biotina (50x) tendría un efecto dependiente de la dosis en los mismos parámetros analizados.

Cabe resaltar que para todas las determinaciones, no se observaron diferencias significativas entre los ratones alimentados con la dieta comercial (Día 0) y la dieta suficiente, lo cual aporta nuevos elementos para establecer que esta dieta cumple satisfactoriamente con todos los requerimientos necesarios para el adecuado desarrollo de esta especie. Como ya se había mencionado, la única diferencia entre las dietas experimentales es el contenido de biotina, así que es posible afirmar que los efectos observados se deben específicamente al aporte de esta vitamina.

Una de las características distintivas de la desnutrición es el retraso en el crecimiento, misma que se presenta con la deficiencia de biotina en donde la disminución en el peso corporal fue de 16 % con respecto a los otros dos grupos. En humanos esta reducción en el peso corporal correspondería a Desnutrición Energético-Proteínica (DEP) de segundo grado de acuerdo a la clasificación de Gómez (Gómez, 2003 y Touissant y García-Aranda, 2008), sin embargo no se puede aseverar como tal para los ratones. Para poder afirmar que existe un cuadro de DEP, además de bajo peso se deben presentar otros indicadores bioquímicos característicos de esta condición, entre los que se encuentran bajas concentraciones séricas de proteínas totales y albúmina. Está ampliamente aceptado que las proteínas totales permiten evaluar el estado proteínico del organismo, de tal manera que cuando hay desnutrición proteínica disminuyen (Touissant y García-Aranda, 2008). Este análisis generalmente se complementa con el de albúmina, debido a que esta proteína responde rápidamente a los cambios que se presenten en el metabolismo proteínico y refleja el estado nutricional de las últimas tres semanas (Berthil, et al., 2004 y Fang, et al., 2006).



Los niveles de albúmina sérica menores a 30 % del intervalo normal se asocian en los humanos a un deterioro en la nutrición y se relacionan de manera directa con la ingesta de los aminoácidos de cadena ramificada, leucina, isoleucina y valina (Touissant y García-Aranda, 2008). Adicionalmente, alteraciones en los niveles séricos de albúmina son indicativas de insuficiencia hepática y de deshidratación (Jeejeebhoy, 1998; Fang et al., 2006). Teniendo en cuenta todo lo anterior, en este trabajo se demuestra que la deficiencia de biotina no presenta las características bioquímicas de un déficit proteínico y se descarta la posibilidad de una insuficiencia hepática o deshidratación.

Los hidratos de carbono (HC) constituyen la mayor parte de la dieta y representan del 50 al 70 % del total de las calorías ingeridas (Guyton, 1989). Después de una comida estándar, la mitad de los HC ingeridos son oxidados y la otra mitad es almacenada en el hígado y en músculo esquelético en forma de glucógeno. Los HC antes de ser metabolizados, tienen que ser degradados hasta su forma más simple. Las enzimas digestivas, entre las cuales se encuentra la  $\alpha$ -amilasa son las responsables de hidrolizar estos combustibles en el intestino delgado. En general, las actividades elevadas de  $\alpha$ -amilasa se presentan en enfermedades del páncreas exócrino como la pancreatitis. La causa más común de esta enfermedad es la obstrucción del conducto de Vater, situación que genera alteraciones en la digestión y un proceso que termina en la degradación del páncreas (Guyton, 1989). En la mayoría de los casos con DEP hay patologías que se han relacionado con pancreatitis y alteración en la digestión de HC. En este trabajo no se observaron diferencias en la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en los ratones alimentados con las distintas dietas; por lo anterior se puede aseverar que no hay alteraciones en el funcionamiento del páncreas exócrino y por consiguiente no sugiere que la deficiencia de biotina cause DEP. Esta afirmación se ve fortalecida con la similitud en la curva de la  $\alpha$ -amilasa después de la administración oral de glucosa.



La curva de absorción oral de glucosa además de ser indicativa de la absorción intestinal de este HC, también puede proporcionar información sobre el aprovechamiento de la misma. Aparentemente la absorción de glucosa por los ratones del grupo deficiente es menor con respecto a los otros grupos, sin embargo, al normalizar el incremento a los 15 min con respecto a los niveles basales se puede observar una absorción de más del doble (31x Grupo Deficiente vs 12x Grupos Suficiente y Suplementado). De esta misma manera es posible interpretar la hipoglucemia en la deficiencia de biotina como resultado de una mayor necesidad de glucosa por el organismo, de tal forma que los diferentes tejidos la absorben con mayor rapidez, especialmente por el cerebro y músculo esquelético que utilizan como fuente de energía principal a la glucosa (Frayn, 1998; Brandan, 2002).

En la deficiencia de biotina el metabolismo energético está alterado debido a la baja actividad de las carboxilasas, las cuales participan en diferentes rutas metabólicas que confluyen en la vía principal de conversión de los alimentos en energía (Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos) (Friedrich, 1988; Montgomery 1980). Así, la hipoglucemia que se presenta en los ratones se puede explicar por la baja actividad de estas enzimas en el hígado. Éste es el órgano con mayor cantidad de carboxilasas y en los ratones deficientes de biotina, las actividades de la PCC y PC que están involucradas en la gluconeogénesis, se reducen 85 % a las cuatro semanas (Báez- Saldaña, et al., 1998 y 2009), de tal forma que la única fuente de glucosa para el organismo es la proveniente de la dieta.

El hígado es el órgano que provee energía y proporciona combustible a otros tejidos. Durante estados de ayuno y en deficiencias nutricias, esta energía la demanda el músculo esquelético. Los ácidos grasos son la principal fuente común de energía en el hígado y músculo esquelético (Brandan, 2002). En el hígado, la ACC1 afecta la primera reacción para la síntesis de ácidos grasos, mientras que en músculo esquelético la ACC2 es la enzima que frena la oxidación de ácidos grasos y en la deficiencia de biotina su actividad está disminuida. Esto representa que la síntesis de glucosa y ácidos grasos, así como la producción de energía a través del Ciclo de los Ácidos



Tricarboxílicos estarían muy bajas; mientras que la oxidación de ácidos grasos podría estar acelerada. El músculo esquelético es el tejido más abundante en el cuerpo y principal sitio de actividad metabólica en un individuo, con una constante entrada y salida de los intermediarios del Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos. Teniendo todo lo anterior en cuenta, es posible proponer que la casi nula actividad de las carboxilasas está induciendo el catabolismo del músculo esquelético para proveer de aminoácidos al hígado para la síntesis de proteínas, explicando la pérdida de masa muscular en los ratones deficientes de biotina sin afectar las concentraciones de proteínas y albúmina. No obstante, el hígado no puede proveer de glucosa, aunque tenga aminoácidos gluconeogénicos por la falta de la actividad de las PCC y PC.



## 7. Conclusiones

- Se corroboró que la dieta suficiente al igual que la dieta comercial control, cumple con todos los requerimientos para el desarrollo adecuado de los ratones.
- La digestión y absorción intestinal de proteínas e hidratos de carbono no se encuentran afectadas ante la deficiencia de biotina.
- Se encontró una tendencia dependiente de la dosis de biotina, aunque no significativa, en la actividad enzimática de  $\alpha$ -amilasa y en la concentración de glucosa sérica.
- En los ratones deficientes de biotina, la única fuente aparente de glucosa del organismo es la proveniente de la dieta, debido a que la actividad de las enzimas Piruvato Carboxilasa y Propionil CoA Carboxilasa se encuentran disminuidas.
- La hipoglucemia observada en los ratones deficientes de biotina sugiere una mayor utilización de glucosa para cubrir los requerimientos energéticos de los diferentes órganos y tejidos que utilizan como combustible a los ácidos grasos.
- La pérdida de peso de los ratones deficientes de biotina puede ser producida por la utilización de grasas principalmente y de aminoácidos musculares para mantener el metabolismo energético del hígado.



## 8. Referencias

- Abu-Elheiga L., Oh W., Kordari P. and Wakil S.J., (2003). Acetyl-CoA carboxylases 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 100:10207-10212.
- Álvarez J., Del Río J., Planas M., García P., García A., Calvo V., Oliveira G., Irlés J.A. y Piñeiro G., (2008). Documento SENPE-SEDOM sobre la codificación de la desnutrición hospitalaria. *Nutrición Hospitalaria*, 23(6): 536-540.
- Báez-Saldaña A., Díaz G., Espinoza B., Ortega E., (1998). Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67:431-437.
- Báez-Saldaña A. y Ortega E., (2004). Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. *The Journal of Nutrition*, 134:1970-1977.
- Báez-Saldaña A., Zendejas I., Revilla M., Islas M., Cárdenas A., Rojas A., Vilches A. y Fernández C., (2004). Effects on biotin on piruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxilase, and markers for glucose and lipids homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79:238-243.
- Báez-Saldaña A., Camacho I., Espinosa J., (2009). Biotin deficiency and biotin excess effects on the female reproductive system. *Steroids*, 74:863-869.
- Baks T., Janssen E.M.A., Boom R.M., (2005). The effect of carbohydrates on  $\alpha$ -amylase activity measurements. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:114-119.
- Baynes J.W., Dominiczack M.H., (2005). Bioquímica Médica. Editorial Mosby. 2º Edición. Madrid, España. pp 88-94.





- Berdainer C.D., Zemleni J., (2009). Nutrition Advanced: Macronutrients, Micronutrients and Metabolism. Editorial CRC Press. Boca Raton, Florida, pp 364-365, 400-405.
- Berthil P., Monique G.M., Sain-van der Velden., (2004). Albumin turnover: experimental approach and its application in health and renal diseases. *Clinica Chimica Acta*, 347:1-14.
- Bradford M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Brandan N., Aguirre V., et. al., (2002). Interrelaciones Metabólicas. Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). Argentina. pp 1-23.
- Burtis C.A., Ashwood E.R., (2001). Fundamentals of Clinical Chemistry. 5° Edición, USA, Philadelphia, pp 372-377, 945-954.
- Dakshinamurti K., (2005). Biotin-a regulator of gene expression. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16:419-423.
- Del Vecchy G., (2006). Determinación de somatotropina y del factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-I) en ratones deficientes de biotina. (Tesis de Licenciatura). UNAM
- Doumas B.T., Watson W.A., Biggs H.G., (1970). Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clinica Chimica Acta*, 258: 21-30.
- Doumas B.T., Peters T., (1996). Serum and urine albumin: a progress report on their measurement and clinical significance. *Clinica Chimica Acta*, 258: 2-20.
- Eisenthal R., Danson M., (1992). Enzyme Assays: A Practical Approach. Editorial Oxford University Press. USA. pp 9-13.



- Fang J.C., Chirag D.N., Dym H., (2006). Nutritional aspects of care. *Oral Maxillofacial Surgery Clinics of North America*.18:115-130.
- Frayn N.K., (1998). Regulación del metabolismo. Una perspectiva humana. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, pp. 47-48,55-86.
- Friedrich W., (1988). Biotin. In: Vitamins. Editorial Walter de Gruyter, Berlin, pp. 753-805.
- Gómez F., (2003). Desnutrición. *Salud Pública de México*, 45:S576-S582.
- Guyton A., (1989). Tratado de Fisiología Médica, Editorial Interamericana McGraw-Hill, 7° Edición, México, D.F., pp 775-795.
- Harris T.K., Keshwani M.M., (2009). Measurement of enzyme activity. *Methods in Enzymology*, 463:57-71.
- Henry R., Chiamori N., (1960). Study of the saccharogenic method for the determination of serum and urine amylase. *Clinical Chemistry*, 6: 434-452.
- Henry R., Cannon D., Winkelman J., (1974). Clinical Chemistry: Principles and Techniques, Editorial Harper & Row, 2° Edición, New York, pp 945-949, 1285-1287.
- Institute of Medicine (IOM), (1998). Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin and Choline. National Academy Press, Washington DC. AI, Adequate Intake.
- Jeejeebhoy K.N., (1998). Nutritional assessment. *Clinical Nutrition*, 27: 347-368.
- Kaplan L.A., Pesce J.A., (1990). Química Clínica: Métodos. Editorial Panamericana, Buenos Aires, pp 828- 832.



- Mock D.M., (2005). Marginal biotin deficiency is teratogenic in mice and perhaps humans: a review of biotin deficiency during human pregnancy and effects of biotin deficiency on gene expression and enzyme activities in mouse dam and fetus. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16:435-437.
- Montgomery R., Dryer R.L., Conway T.W., (1980). Biochemistry. A case – oriented approach. Editorial Mosby, St. Louis, USA, pp 281-296.
- Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999. Para la atención a la salud del niño.
- Pacheco-Álvarez D., Solórzano-Vargas R., León Del Río A., (2002). Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Archives of Medical Research*, 33:439-447.
- Romero-Navarro G., Cabrera-Valladares G., German M.S., et al., (1999). Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and biotin-deficient rats. *Journal of Endocrinology*, 140: 4595-4600.
- Sacher R.A., McPherson R.A., (1991). Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Tests. Editorial F.A. Davis. 10° Edición, Philadelphia, EUA. pp 773-777.
- Shils M.E., Olson J.A., Shike M., Ross C.A. (2002). Nutrición en Salud y Enfermedad. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. 9° Edición. USA, Philadelphia, pp 531- 539.
- Suckow M.A., Danneman P., Brayton C., (2001). The Laboratory Mouse. Editorial CRC Press. Boca Raton, New York, pp 9.
- Touissant G., García-Aranda J., (2008). Desnutrición Energético Proteínica en: Nutriología Médica, Casanueva E., Kaufer-Horwitz, M. Editores, Editorial Panamericana, 3° Edición, México, D.F. pp 263-296.



- Vilches-Flores A., Fernández-Mejía C., (2005). Efecto de la biotina sobre la expresión genética y el metabolismo. *Revista de Investigación Clínica*, 57: 716-724.
- Wagle S.R., (1963). Effects of biotin deficiency on carbohydrate metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 103: 267-271.
- Wolf B., (1995). Disorders of Biotin Metabolism. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., editors. *The Metabolic and Molecular Bases in Inherited Disease*, Editorial Mc Graw-Hill, 7° Edición. New York, pp 3151-3177.
- Zemleni J., Mock D., (1999). Biotin biochemistry and human requirements. *Journal Nutrition Biochemistry*, 10:128.



**Anexo 1**  
**Composición de Dietas**

	<b>Suficiente</b>	<b>Deficiente</b>	<b>Suplementada</b>
<b>Ingrediente</b>	<b>g/kg</b>	<b>g/kg</b>	<b>g/kg</b>
Clara de huevo deshidratada	300	300	300
Dextrosa monohidratada	517.340	517.340	517.340
Aceite de maíz	100	100	100
<b>Celulosa</b>	<b>40.000</b>	<b>40.004</b>	<b>39.904</b>
Mezcla de minerales, AIN-76 (170915)	35	35	35
Fosfato de Calcio dibásico	3.41	3.41	3.41
<b>Biotina</b>	<b>0.004</b>	<b>0.000</b>	<b>0.100</b>
Vitamina B <sub>12</sub>	0.030	0.030	0.030
Pantotenato de Calcio	0.066	0.066	0.066
Colina	3.497	3.497	3.497
Acido Fólico	0.002	0.002	0.002
Vitamina K <sub>3</sub>	0.050	0.050	0.050
Niacina	0.099	0.099	0.099
Piridoxina	0.022	0.022	0.022
Riboflavina	0.022	0.022	0.022
Tiamina	0.022	0.022	0.022
Vitamina A	0.040	0.040	0.040
Vitamina D <sub>3</sub>	0.004	0.004	0.004
Vitamina E	0.242	0.242	0.242
Colorante	0.150	0.150	0.150

\*Fuente: Harlan Teklad

El ajuste en el contenido de biotina se realiza incrementando o disminuyendo la celulosa



## Anexo 2

### Normalización de datos con respecto al grupo suficiente

Glucosa sérica (mM) grupo deficiente y suficiente

Grupo Deficiente		Grupo Suficiente	
# ratón	Semana 4	# ratón	Semana 4
1	3.2	7	4.3
2	3.1	8	4.8
3	2.3	9	4.8
4	1.9	10	5.4
5	2.1	11	4.0
6	3.7	12	7.5
promedio	<b>2.7</b>	promedio	<b>5.1</b>
D.E	0.72	D.E	1.3
% C.V	26.4	% C.V	24.4

Normalizando a uno el grupo suficiente, se realizó el cálculo para cada dato de cada semana de experimentación:

$$N = \frac{G_n}{x}$$

N= Normalización  
G<sub>n</sub>= Glucosa sérica del ratón n (mM)  
x= Promedio de la Glc sérica del grupo suficiente (mM)

Ejemplo:

$$N = \frac{4.3}{5.1} = 0.84$$

Para normalizar los datos del grupo deficiente con el grupo suficiente, se realizó el mismo cálculo para cada dato de cada semana de experimentación. Estos cálculos se realizaron también para el grupo suplementado.



## Glucosa sérica normalizada con grupo Suficiente

Grupo Deficiente		Grupo Suficiente	
# ratón	Semana 4	# ratón	Semana 4
1	0.63	7	0.84
2	0.61	8	0.94
3	0.45	9	0.94
4	0.37	10	1.1
5	0.41	11	0.78
6	0.72	12	1.47
promedio	<b>0.53</b>	promedio	<b>1.0</b>
D.E	0.14	D.E	0.25
% C.V	26.5	% C.V	24.7