

# Universidad Nacional Autónoma de México

## Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlán"



Status de biotina en pacientes con  
alimentación parenteral total prolongada

### T E S I S

Que para obtener el Título de:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLÓGICA**

P r e s e n t a:

SONIA ZAMUDIO ALONSO

MEXICO

1988



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

## INDICE

	Pag.
RESUMEN	
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS E HIPOTESIS	4
ANTECEDENTES	5
- Historia	6
- Propiedades quimicas	8
- Metabolismo	12
- Propionil CoA Carboxilasa	14
- $\beta$ -Metilcrotonil CoA Carboxilasa	17
- Piruvato Carboxilasa	17
- Acetil CoA Carboxilasa	18
- Deficiencia de Propionil CoA Carboxilasa	19
Deficiencia de $\beta$ -Metilcrotonil CoA Carboxilasa	19
Deficiencia de Piruvato Carboxilasa	20
Deficiencia de Acetil CoA Carboxilasa	22
Deficiencia Múltiple de Carboxilasas	23
- Alimentación parenteral	25
- Antecedentes históricos	27
- Deficiencia de cinc en pacientes con alimentación parenteral	29
Deficiencia de biotina en pacientes con alimentación parenteral	32
DISEÑO DEL ESTUDIO	34

MATERIAL Y METODOS	45
- Aislamiento de linfocitos	48
- Determinación de actividad específica de la PCC y PC	51
- Determinación de proteínas	58
- Determinación de biotina	62
- Determinación de biotinidasa	70
- Determinación de creatinina	75
- Determinación de cinc	78
RESULTADOS	80
DISCUSION Y CONCLUSIONES	116
BIBLIOGRAFIA	125

## INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

FIGURAS	Pag.
Fig. A-1 Estructura de la d-biotina.	10
Fig. A-2 Vías metabólicas en las que participan las carboxilasas dependientes de biotina.	14
Fig. A-3 Estructura de la biotina unida covalentemente a un residuo de lisina de una enzima carboxilasa.	15
Fig. M-1 Distribución de las células antes y después de centrifugar en presencia de Ficoll-paque.	50
 <b>GRAFICAS</b>	
Gráfica R-1 Efecto de la cantidad de proteínas en la velocidad enzimática de la Propionil CoA Carboxilasa.	87
Gráfica R-2 Efecto del tiempo de incubación a 30 °C sobre la actividad enzimática de la Propionil CoA Carboxilasa.	84
Gráfica R-3 Efecto de la concentración de biotina sobre la actividad específica de la Propionil CoA Carboxilasa.	88
Gráfica R-4 Evolución de la actividad específica de la Propionil CoA Carboxilasa y la Piruvato Carboxilasa en el estudio del Paciente APT-6.	106
Gráfica R-5 Evolución de la actividad específica de la Propionil CoA Carboxilasa y la Piruvato Carboxilasa en el estudio del Paciente APT-7.	107
Gráfica R-6 Evolución de la actividad específica de la Propionil CoA Carboxilasa y la Piruvato Carboxilasa en el estudio del Paciente APT-8.	108
Gráfica R-7 Evolución de la actividad específica de la Propionil CoA Carboxilasa y la Piruvato Carboxilasa en el estudio del Paciente APT-9.	109



## RESUMEN

La biotina, vitamina hidrosoluble, forma parte del complejo B y participa en diversas reacciones importantes en el organismo humano. Fue identificada por primera vez como esencial para los seres vivos, cuando Kögl y Tönnis la aislaron a partir de yema de huevo y probaron su actividad como factor de crecimiento para levaduras (Kögl, 1936).

La estructura de la biotina fue determinada por du Vignard en 1942 (du Vignard, 1942) y confirmada por Harris y colaboradores, al llevar a cabo su síntesis total (Harris, 1943).

La biotina actúa como cofactor de las enzimas que están involucradas en cuatro procesos de carboxilación en las células de mamíferos. Tres de las enzimas dependientes de biotina se encuentran localizadas en mitocondrias: La Propionil CoA Carboxilasa (PCC), La  $\beta$ -Metilcrotonil CoA Carboxilasa (MCC) y la Piruvato Carboxilasa (PC). La primera está involucrada en el catabolismo de la isoleucina y valina entre otros, la segunda es necesaria para la degradación de la leucina y la tercera metaboliza el piruvato para producción de oxalacetato en la gluconeogénesis.

La cuarta enzima dependiente de biotina es la Acetil CoA Carboxilasa (ACC), se localiza en el citosol y cataliza el paso limitante de la síntesis de ácidos grasos (Wolf, 1982).

El interés por esta vitamina ha ido en aumento debido a la detección de pacientes que deben su deficiencia a un defecto genético, como es el caso de los errores innatos del metabolismo, ó a una ingesta deficiente.

En el segundo grupo se incluyen a los pacientes con alimentación ó nutrición parenteral total prolongada (APT), que no reciben esta vitamina ó que su aporte es insuficiente, por lo que llegan a presentar el cuadro clínico atribuido a la deficiencia de biotina. Los síntomas característicos son: dermatitis periorificial, alopecia, depresión, hipotonía muscular y ataxia. Generalmente esta deficiencia no se detecta cuando se encuentra a nivel subclínico y sólo cuando el cuadro clínico es severo se intenta solucionar el problema.

Las soluciones para alimentación ó nutrición parenteral, no contienen biotina y en México no existía un multivitamínico con esta vitamina. En 1987 se empezó a utilizar el MVI-12 (0.069 mg de biotina en 5 ml), se emplea en muy pocos hospitales, debido a su costo.

Esta situación ha generado que se incremente el número de pacientes con alimentación parenteral total que presentan deficiencia de biotina.

En animales es donde más estudios sobre deficiencia de biotina se han realizado, la Piruvato carboxilasa, en pollos, es el mejor indicador del estado de esta vitamina (Whitehead, 1985). En humanos, generalmente se ha medido biotina en plasma y orina, pero no carboxilasas.

En la Unidad de Genética de la Nutrición, interesados en este problema, se desarrolló el presente estudio para determinar que parámetro es mejor indicador del status de biotina en el organismo, que funcione a la vez como predictor de la deficiencia temprana de esta vitamina.

Se estudiaron 9 pacientes, de los cuales 4 fueron sometidos a APT por tiempo prolongado (más de un mes). Estos pacientes permanecieron hospitalizados en el Instituto Nacional de Pediatría y en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional del I.M.S.S., recibieron el tratamiento habitual que proporciona el servicio de apoyo nutricional. Desde su ingreso al estudio, recibieron un complejo vitamínico que no contiene biotina (MVI-10) y se mantuvieron de esta forma, hasta que, mediante el estudio longitudinal clínico-

metabólico se determinó el momento en que se iniciaría la administración de esta vitamina. De ninguna manera se puso en riesgo el bienestar y la vida del paciente.

Se midieron las concentraciones de biotina en plasma y orina. En linfocitos se evaluó la actividad específica y el índice de activación de las carboxilasas dependientes de biotina, específicamente la PCC y la PC. El índice de activación se obtiene al dividir la actividad específica de los linfocitos incubados durante dos horas en Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) enriquecido con biotina ( $10^{-8}$  M) entre la actividad en los linfocitos incubados el mismo tiempo en MEM sin biotina.

En la búsqueda de indicadores del status de biotina, en cuatro de los pacientes (Grupo B), se determinó semanalmente el nivel de biotina en plasma y orina. Estos cuatro pacientes se empezaron a estudiar desde el inicio de la alimentación parenteral, sin administración de biotina. Las muestras también se tomaron después de que se decidió que era necesario suministrar esta vitamina.

Los cinco pacientes restantes (Grupo A), se estudiaron sólo en dos ocasiones: cuando presentaban un cuadro característico de la deficiencia de biotina, provocado por una

alimentación parenteral total, sin el aporte de esta vitamina y cuatro meses después de que se les administró la biotina.

Los controles fueron 27 donadores sanos cuyas edades estaban entre los 16 y los 38 años.

Los pacientes fueron 8 adultos (7 hombres y 1 mujer) y 1 niña de 10 años de edad. Sus diagnósticos eran: síndrome de intestino corto, estenosis esofágica, ileostomía y diarrea crónica.

En los pacientes del grupo A, el nivel de biotina en plasma y orina no varió significativamente respecto a los controles, tanto en la fase de carencia como en la de administración de biotina.

Al no administrar biotina, la actividad específica de las carboxilasas disminuyó paulativamente conforme transcurrió el tiempo con APT, llegando en algunos casos hasta el 10% de su valor inicial. La enzima que presentó cambios más tempranos ante la ausencia de biotina, fue la PCC. En este grupo de pacientes, el índice de activación no presentó una tendencia clara de comportamiento.

En el grupo B, la biotina en plasma se encontró por debajo del 10% respecto a los controles, cuando los pacientes

presentaron el cuadro clínico de deficiencia de biotina; en igual porcentaje se vieron disminuidas las actividades de las carboxilasas en relación a los controles.

En ambos grupos la actividad de las carboxilasas aumentó cuando se les administró biotina a los pacientes, pero en la mayoría no llegó a niveles normales. En los pacientes del grupo B, los síntomas de deficiencia de biotina, desaparecieron en su totalidad con la administración de esta vitamina.

Analizando los resultados obtenidos de este estudio, proponemos que la actividad de la Propionil CoA Carboxilasa, así como su índice de activación, se pueden utilizar como predictores tempranos del status de biotina.

## INTRODUCCION

## INTRODUCCION

La biotina es cofactor de cuatro enzimas que catalizan procesos de carboxilación en las células de mamíferos; estas enzimas son: la Propionil CoA Carboxilasa (PCC), involucrada en el catabolismo de isoleucina, valina y otros compuestos. La  $\beta$ -Metilcrotonil CoA Carboxilasa (MCC), que participa en la degradación de leucina. La Piruvato Carboxilasa (PC), necesaria para el metabolismo del piruvato y la Acetil CoA Carboxilasa (ACC), que a diferencia de las tres primeras que se localizan en mitocondria, la ACC se encuentra en el citosol y cataliza el primer paso de la síntesis de ácidos grasos (Wolf, 1982).

La biotina se une a un residuo de lisina de la apocarboxilasa, mediante un enlace covalente entre el grupo carboxilo de la porción alifática de esta vitamina y el grupo amino de la lisina. Esta unión (biotinización), requiere de una enzima llamada holocarboxilasa sintetasa (HS), cuya función específica es formar un complejo activo, que reacciona con el grupo amino de un residuo de lisina en la apocarboxilasa previamente sintetizada (Wolf, 1982).

Anteriormente se pensaba que no era factible encontrar casos con deficiencias naturales de biotina, ya que esta vitamina se encuentra practicamente en todos los alimentos, a menos que la dieta incluyera grandes cantidades de clara de huevo cruda que contiene avidina, la cual se une a la biotina y evita su actividad (Sydenstricker, 1942). Sin embargo, recientemente ha aumentado el interés por esta vitamina, debido al hallazgo de pacientes con deficiencia por un defecto genético (errores innatos del metabolismo) ó por la falta de aporte dietético (Wolf, 1982). En el segundo grupo se incluyen a los pacientes con alimentación parenteral total (APT) prolongada, en los que el aporte de esta vitamina es insuficiente ó nulo, por lo que llegan a presentar deficiencia de biotina (Mock, 1985), las manifestaciones clinicas incluyen: dermatitis periorificial, conjuntivitis, alopecia, depresión, irritabilidad, hipotonía muscular, ataxia y excreción anormal de algunos ácidos orgánicos -3-hidroxisovalérico, 3-metilcitrónico y 3-hidroxi propiónico- (Nyhan, 1985). Generalmente esta deficiencia se detecta cuando el estado del paciente es crítico.

Los casos reportados de deficiencia de biotina por alimentación parenteral se han enfocado principalmente al estudio de biotina en plasma y en orina, sólo en algunos se ha incluido la evaluación indirecta de las carboxilasas por

medio de la cuantificación de ácidos orgánicos (Mock, 1985). Todas estas determinaciones se han realizado cuando se presenta un cuadro clínico severo de deficiencia de biotina, por lo que nos interesó evaluar diferentes parámetros dependientes de esta vitamina antes, durante y después de que se presente la deficiencia de biotina, así como el poder conocer cual de ellos se puede utilizar como indicador del estado de la vitamina en el organismo humano y evitar de esta forma la deficiencia con una administración oportuna de biotina.

Para profundizar la información sobre el metabolismo de esta vitamina en humanos y obtener predictores tempranos de su deficiencia son de gran importancia los pacientes con APT prolongada, en quienes es posible controlar el aporte de biotina y efectuar observaciones precisas de tipo clínico y bioquímico en una forma continua, esto forma parte del presente trabajo y no se había estudiado con anterioridad.

## **OBJETIVOS E HIPOTESIS**

**OBJETIVO:**

Evaluar diferentes parámetros que dependen de la biotina como indicadores del status de esta vitamina en humanos y como predictores de manifestaciones clínicas de su deficiencia.

**HIPOTESIS:**

El grado de activación de las carboxilasas de linfocitos incubados con altas concentraciones de biotina, es un mejor indicador del status de esta vitamina, que sus niveles en fluidos biológicos ó que la actividad específica de las carboxilasas.

**ANTECEDENTES**

## ANTECEDENTES

Además de los componentes mayoritarios -proteínas, ácidos nucleicos, glúcidos y lípidos- las células vivas contienen cantidades mínimas de substancias orgánicas llamadas vitaminas que son vitales para el metabolismo normal de muchas formas de vida. Su importancia biológica se manifestó debido a que algunos organismos no las pueden sintetizar (como es el caso del humano) y deben adquirirlas de procedencia exógena (Lehninger, 1980).

Aunque son sumamente heterogéneas en estructura química y en función biológica, las vitaminas pueden ser agrupadas convenientemente en dos clases: las hidrosolubles y las liposolubles.

Las vitaminas liposolubles comprenden a las vitaminas A, D, E y K. No se ha podido establecer claramente su función biológica. Su reservas pueden durar meses y llegan a ser tóxicas ya que no existen mecanismos autorreguladores.

Las vitaminas hidrosolubles incluyen al grupo del complejo B y al ácido ascórbico ó vitamina C. Dado que son solubles, por lo general se asocian con el compartimiento líquido del cuerpo. Se excretan en la orina cuando sus niveles séricos

exceden la saturación tisular y por esta razón, deben suministrarse en forma continua en la dieta (Martin, 1986).

La biotina forma parte del complejo B y participa en diversas reacciones importantes en el organismo humano.

### HISTORIA

Se llegó al descubrimiento de la biotina por dos vías de experimentación: Una, el estudio de un síndrome tóxico que se demostró finalmente, se debe a una sustancia antagonista de la biotina; otra, la investigación hecha por Wildiers para establecer las necesidades de las levaduras para su proliferación (Goodman, 1978).

En 1916, Batemen observó que una alta concentración de clara de huevo cruda en la dieta era tóxica. En 1927, Boas confirmó que las ratas alimentadas con un régimen cuya fuente de proteínas era exclusivamente la clara de huevo cruda presentaban un síndrome caracterizado por trastornos neuromusculares, dermatitis grave, caída de pelo. La investigadora dio a la afección el nombre de "lesión por clara de huevo" y demostró que podía evitarse cocinando la proteínas o administrando levadura, hígado y otros alimentos (Goodman, 1978; Robinson, 1966).

Parson y colaboradores reprodujeron el síndrome tóxico en diferentes especies y estudiaron la distribución y el comportamiento del factor protector.

En 1937 György estudió también la lesión por clara de huevo cruda y concluyó que el síndrome era de origen carencial. En consecuencia dio a la sustancia protectora aislada de hígado, el nombre de vitamina H, de la palabra alemana Haut, piel, (György, 1937 y 1939).

Kögl y Tönnis en 1936, al estudiar los factores de crecimiento de las levaduras, aislaron de la yema de huevo en forma cristalina y pura un compuesto que actuaba como factor esencial en su estudio y al cual denominaron biotina (Kögl, 1936).

Allison y colaboradores habían demostrado que la proliferación de ciertas cepas de Rizobium dependían de una sustancia a la que llamaron coenzima R (West, 1939).

Los caminos de estas investigaciones se cruzaron cuando se demostró que la biotina, la vitamina H, la coenzima R, factor W ó vitamina BW eran la misma sustancia.

En 1942 la estructura de la biotina se estableció por du Vigneud y fue confirmada en 1943 por Harris, llevando a cabo la síntesis total de esta vitamina (Harris, 1943; Goodman, 1978).

El isómero  $\alpha$ -biotina fue aislado por Kögl a partir de yema de huevo, mientras que el aislado de hígado fue llamado  $\beta$ -biotina. Hoy es aceptado que las formas  $\alpha$  y  $\beta$  de la biotina son idénticas (György, 1974).

La distribución de la biotina en la naturaleza es amplia, puede encontrarse en diversos tejidos animales y verduras. Las principales fuentes en la dieta del humano son la yema de huevo, hígado de res, de cordero o de cerdo, pescado, levadura de cerveza, frutas y vegetales como son la coliflor, calabazas, espinacas y plátano entre otras. También se ha aislado a esta vitamina a partir de riñón y páncreas. En el humano es sintetizada por bacterias de la flora intestinal (Bonjour, 1984).

#### PROPIEDADES QUÍMICAS

La biotina es un ácido orgánico complejo con peso molecular de 244.31.

La biotina libre es soluble en Alkalís diluidos y en agua caliente, poco soluble en Ácidos diluidos, agua fría y alcohol, es prácticamente insoluble en más solventes orgánicos.

La fórmula condensada de la biotina es  $C_{10}H_{16}O_6N_2S$  y estructuralmente esta formada por dos anillos fusionados, uno de los cuales es un uréido y el otro un imidazol (fig.A1). Junto con la tiamina son las únicas dos vitaminas que contienen azufre (Goodman, 1978. Bonjour, 1984).

Han sido estudiados ocho isómeros de la biotina, pero solo el D-biotina posee actividad biológica cuando se encuentra unido a la enzima de las cuales es cofactor (György, 1974), en el humano estas enzimas son: Propionil CoA Carboxilasa (PCC),  $\beta$ -Metilcrotonil CoA Carboxilasa (MCC), Piruvato Carboxilasa (PC) y Acetil CoA Carboxilasa (ACC).

Algunos análogos de la biotina han sido sintetizados químicamente o aislados de fuentes naturales. El oxibiotina o el biotinol, pueden reemplazar a la biotina en la nutrición y aliviar síntomas de deficiencia en animales, sin embargo, tienen una baja actividad y no hay reportes de su uso en humanos.

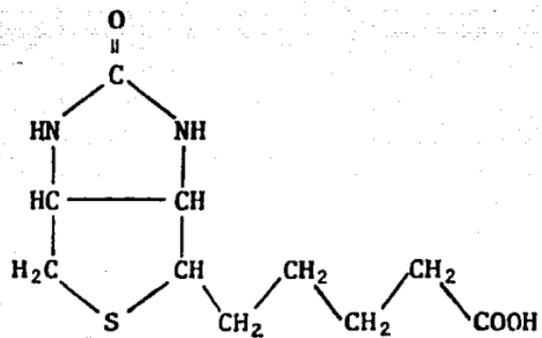


Fig. A-1. Estructura de la d-Biotina

Los análogos de tiobiotina y el sulfoxido de biotina son inactivos en animales pero activos en ciertas especies microbianas. Homólogos de la biotina como el norbiotina, el homobiotina o la sulfona de biotina son potentes antagonistas de esta vitamina (György, 1974; Achuta, 1977; György, 1968; Mystry, 1964). El  $\alpha$ -dehidrobiotina es uno de los más potentes inhibidores de la biotina, sin embargo no se tienen muchos datos sobre este compuesto que es producido por una clase de Saccharomyces lydicus (Hanaka, 1969).

Existen compuestos que pueden unirse a la biotina para formar un complejo estable que impide la utilización de esta vitamina por los animales y microorganismos. Saccharomyces avidinii produce la streptavidina y la stravidina, estos compuestos pueden inactivar a la biotina libre y aparentemente inhiben la síntesis de biotina en microorganismos susceptibles (Bonjour, 1984).

Otro compuesto que se une a la biotina es la avidina (proteína ávida); fue aislada de la clara de huevo por Eakin (1940). Es una glicoproteína con peso molecular de 70 000 daltons, posee una estructura tetramérica con subunidades idénticas que contiene cada una un sitio de unión para la biotina por lo que se logra una gran afinidad, no sólo la biotina libre es complejada por la avidina, también compuestos

estructuralmente semejantes a la biotina que contienen un ureido intacto en una configuración cis, al igual que la biocitina (E-N-biotinil-L-lisina) y la biotina unida a la enzima.

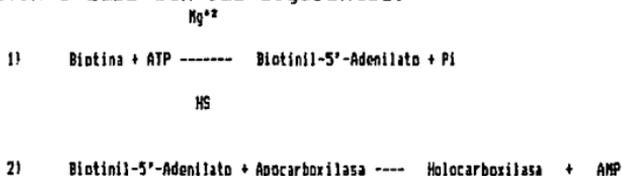
El complejo avidina-biotina esta unido por una débil pero específica afinidad de los grupos ureidos, es estable en un rango amplio de pH y no es degradado en el tracto gastrointestinal (Goddman, 1978; Bonjour, 1984).

#### METABOLISMO:

La biotina de la dieta puede presentarse en forma libre o más frecuentemente unida en forma covalente a proteínas. Es absorbida en el primer tercio del intestino delgado. La liberación de la biotina unida a proteínas, una vez que éstas han sido degradadas en el intestino, requiere de la actividad de la biotinidasa, enzima cuya función es hidrolizar la unión biotina-lisina para que ya libre, la biotina pueda llevar a cabo su actividad biológica. No se sabe si esta vitamina es liberada en la luz del intestino ó si se absorbe como biocitina y se libera en la sangre y los tejidos. Existe muy poca información acerca del transporte, depósito en tejidos y almacenamiento en animales y humanos (Achuta, 1977; Mistry, 1964; Völker, 1977; Bhagavan, 1970).

En el ser humano generalmente la cantidad de biotina excretada en heces excede a la de la dieta; esto se atribuye a la síntesis de esta vitamina por la flora intestinal (Martín, 1986).

La biotina actúa como cofactor de las enzimas que catalizan las cuatro reacciones de carboxilación conocidas en las células de mamíferos, siendo estas: la Propionil CoA Carboxilasa (PCC), la  $\beta$ -Metilcrotonil CoA Carboxilasa (MCC), la Piruvato Carboxilasa (PC) y la Acetil CoA Carboxilasa (ACC) (fig. A-2). La biotina se une a un residuo de lisina de la apocarboxilasa mediante un enlace covalente entre el grupo carboxilo de la porción alifática de la biotina y el grupo épsilon amino de la lisina (fig. A-3). Esta unión requiere de una enzima llamada holocarboxilasa sintetasa (HS), cuya función específica es formar un complejo activo que reacciona con el grupo épsilon amino de un residuo de lisina en la apocarboxilasa previamente sintetizada. Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:



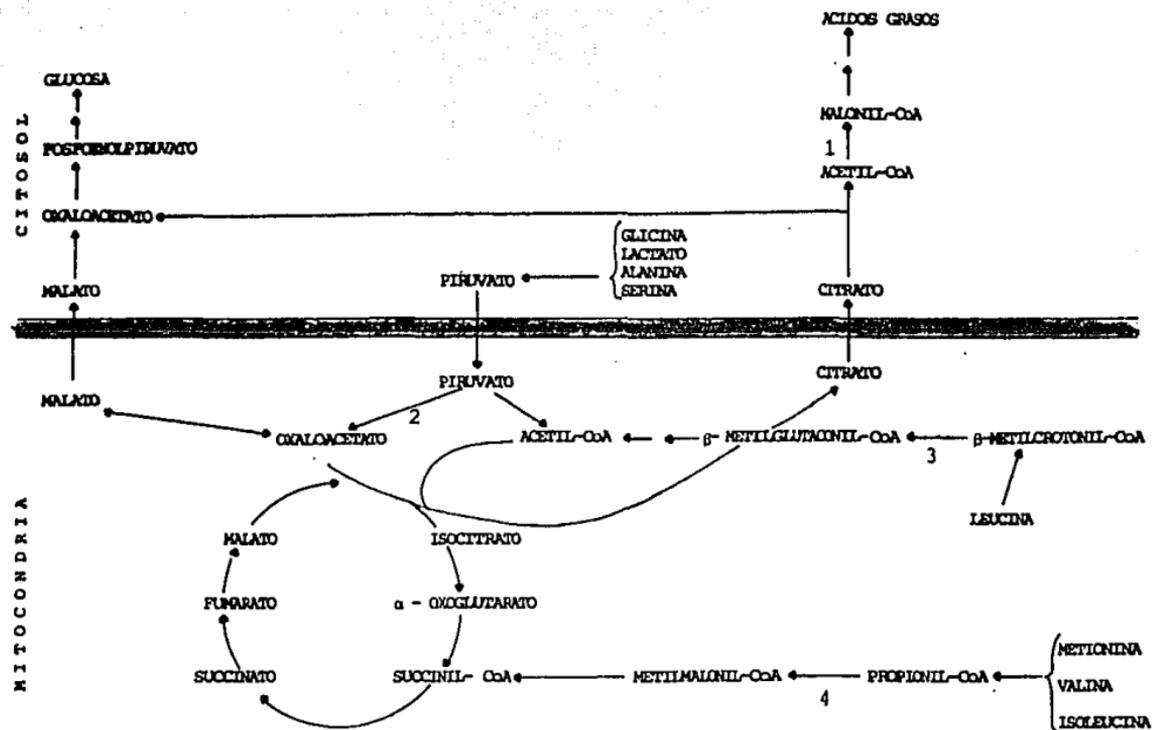


Fig. A-2. Vías metabólicas en las que participan las carboxilasas dependientes de biotina: Acetil CoA Carboxilasa (1), Piruvato Carboxilasa (2),  $\beta$ -Metilcrotonil-CoA Carboxilasa (3) y Propionil CoA Carboxilasa (4).

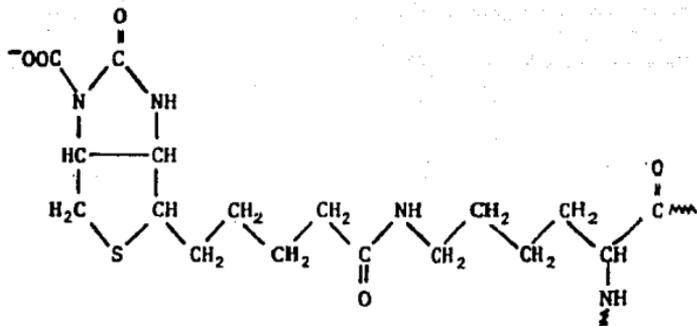
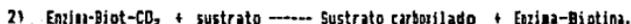
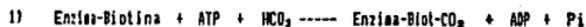


Fig A-3. Estructura de la biotina unida covalentemente a un residuo de lisina de una enzima carboxilasa.

Una vez formada la holoenzima (biotina-apoenzima), en el proceso de carboxilación existe la formación de un complejo intermediario en donde el grupo carboxibiotil funciona como acarreador del grupo carboxilo. La reacción se lleva a cabo en los dos siguientes pasos:



Para todas las carboxilasas el donador del carboxilo es el ion bicarbonato; se requiere también un metal divalente que generalmente es  $\text{Mg}^{2+}$  aunque también puede ser  $\text{Mn}^{2+}$ .

#### Propionil CoA Carboxilasa (PCC):

La PCC es una enzima mitocondrial que tiene un peso molecular de aproximadamente 540,000 daltons, es un tetrámero con cada protómero compuesto de dos tipos de subunidades, las  $\alpha$  cuyo peso molecular es 72,000 y las  $\beta$  es 56000. Contiene cuatro moléculas de biotina por molécula de enzima, localizadas en las subunidades grandes ( $\alpha$ ). Esta enzima es activada por cationes monovalentes y no se le han encontrado inhibidores específicos. Participa en el catabolismo de colesterol, ácidos grasos de número non de carbonos, de los aminoácidos

isoleucina, valina, metionina y treonina a través de la vía metabólica del propionato para desembocar en el ciclo de Krebs (Achuta, 1972; Wolf, 1982).

#### $\beta$ -Metilcrotonil CoA Carboxilasa (MCC):

La MCC es una enzima mitocondrial constituida por cuatro protómeros, cada uno con dos subunidades diferentes llamadas  $\alpha$  y  $\beta$  con peso molecular de 74,000 y 58,000 daltons respectivamente. Esta enzima es activada por cationes monovalentes y participa en el catabolismo de la leucina llegando a la Acetil CoA de donde puede desembocar en la síntesis de ácidos grasos o a citrato en el ciclo de Krebs (Saudubray, 1981; Wolf, 1982).

#### Piruvato Carboxilasa (PC):

La PC es una enzima mitocondrial cuyo peso molecular es de 500,000 daltons, está constituida por cuatro protómeros iguales ( $\alpha$ ) con peso molecular de 130,000 daltons cada uno, es activada alostericamente por acetil CoA. Se inactiva a 0°C, a esta temperatura se disocia en cuatro subunidades. La holoenzima contiene cuatro moléculas de biotina unidas covalentemente a las cuatro subunidades. Participa en el metabolismo del piruvato catalizando el paso de piruvato a oxaloacetato como primer paso de la gluconeogénesis, además de

participar en la anaplerosis del ciclo de Krebs (Wolf, 1982. Lehninger, 1979).

#### Acetil Coenzima A Carboxilasa (ACC):

La ACC esta localizada en el citosol; es un polimero con subunidades idénticas ( $\alpha$ ) con peso molecular de 250,000 cada una. Cada subunidad contiene una molécula de biotina (Wolf, 1982).

La Acetil CoA Carboxilasa, participa en forma importante en la síntesis de ácidos grasos, es controlada en hígado y tejido adiposo de mamíferos por citrato. La activación por citrato se acompaña por polimerización de la enzima, logrando una forma filamentosa y alcanza pesos moleculares hasta de 5 millones.

Esta enzima es inhibida por Malonil CoA y derivados de ácidos grasos de cadena larga (Goodridge, 1972).

Se han reportado pacientes que presentan deficiencia de alguna de las carboxilasas, así como pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas. Ambos casos se revisarán a continuación.

### Deficiencia de Propionil CoA Carboxilasa

De las deficiencias aisladas de cada una de las carboxilasas, la más común y mejor caracterizada es la deficiencia de PCC, conocida como acidemia propiónica. Generalmente en los niños afectados la sintomatología se inicia durante el periodo neonatal, con vómito, letargia e hipotonía (Wolf, 1981). Los individuos afectados acumulan propionato y sus metabolitos. Excretan grandes concentraciones de los ácidos orgánicos: metilcitrato, 3-hidroxi-*propionato* y propionil glicina en la orina. Una ingestión excesiva de proteínas ó su catabolismo aumentado por infecciones recurrentes pueden precipitar episodios de acidemia orgánica, cetoacidosis e hiperamonemia. Existe una considerable variación en la expresión clínica de la acidemia propiónica. Algunos pacientes manifiestan pocos o ninguno de los síntomas, mientras que otros, aún dentro de la misma familia, pueden presentar las características clásicas de la enfermedad (Wolf, 1979). Las causas de esta variación clínica están poco claras por ahora.

### Deficiencia de B-metilcrotonil Coenzima A Carboxilasa

La deficiencia de B-metilcrotonil CoA carboxilasa ha sido sospechada en 10 casos reportados en la literatura (Wolf,

1981; Bartlett, 1980; Stokke, 1972); en 7 de ellos, se encontró que en realidad se trataba de deficiencia múltiple de carboxilasas. La deficiencia aislada de MCC fue confirmada enzimáticamente sólo en uno de los casos. En una preparación mitocondrial hepática se encontró actividad normal de PCC, excluyendo la posibilidad de una deficiencia múltiple. En la orina se encontró excreción de los ácidos B-hidroxiisovalérico y B-cetoglutarico. La paciente reportada en este trabajo falleció a las 13 semanas de edad, antes de que los efectos del tratamiento con biotina pudieran ser evaluados (Finnie, 1976).

#### Deficiencia de Piruvato Carboxilasa

En algunos niños con acidosis congénita ha sido posible identificar la deficiencia enzimática responsable; entre ellas se encuentra la de Piruvato Carboxilasa (PC).

La piruvato carboxilasa tiene un papel central en la regulación del metabolismo de carbohidratos, no solo en aquellos tejidos con una gran actividad de PC, como hígado y riñón, sino también en otros tejidos, particularmente en el cerebro en desarrollo (Sanders, 1982). Por lo tanto, una deficiencia en esta enzima, puede dar lugar a una gran variedad de anomalías bioquímicas y de síntomas clínicos. Todos los pacientes con deficiencia de PC reportados,

mostraron concentraciones séricas elevadas de lactato usualmente acompañado por aumento de piruvato, así como de alanina. A pesar de la deficiencia de PC, la hipoglicemia no ha sido un dato consistente. La síntesis de ácidos grasos, esteroides y cuerpos cetónicos puede estar elevada, debido a la alta concentración de acetil CoA presente, dado que el exceso de piruvato induciría, a través del complejo piruvato deshidrogenasa, una síntesis aumentada de acetil CoA. Esto enfatiza el importante papel que tiene la PC en la regulación del metabolismo de lípidos.

Las manifestaciones clínicas más comunes son: acidosis metabólica, hipotonía, retraso en el desarrollo mental y físico y convulsiones. El inicio de los síntomas aparece en el periodo neonatal generalmente y los pacientes mueren poco tiempo después. Se ha sugerido a la deficiencia de PC como posible causa de la enfermedad de Leigh: Encefalomielopatía necrosante subaguda (ENS) (Grover, W.D., 1972), enfermedad degenerativa del tallo cerebral, frecuentemente caracterizada por hallazgos bioquímicos similares a aquellos descritos para la deficiencia de PC. Sin embargo, estudios recientes (Atkin, 1979; Murphy, J.V., 1981) indicaron que ENS y la deficiencia de PC son entidades distintas, y una revisión de los pacientes en los cuales se había descubierto una actividad diferente de PC en sus tejidos, sugirió que muy probablemente los tejidos estudiados fueron conservados y/o ensayados bajo condiciones

no óptimas, conduciendo a actividades de PC falsamente deficientes.

La manifestación clínica más grave es el profundo daño neurológico que sufren estos pacientes. Una posible explicación sería una anaplerosis deficiente, dado que el cerebro es virtualmente dependiente del metabolismo aeróbico que requiere un ciclo de Krebs activo.

No existe tratamiento efectivo de la deficiencia de PC. Los principales intentos se han enfocado al reemplazo de los intermediarios del ciclo de Krebs que se encuentran disminuidos. La administración de dosis farmacológicas de biotina se ha intentado, sin éxito. Una leve mejoría clínica se ha observado al administrar tiamina, presumiblemente al derivar el piruvato a través de la vía de la piruvato deshidrogenasa (Brunette, M.G., 1972). La deficiencia de PC parece ser heredada de un modo autosómico recesivo.

#### Deficiencia de Acetil Coenzima A Carboxilasa

En 1981 se reportó el primer caso de deficiencia aislada de Acetil CoA carboxilasa (Feldman, G.L., 1981). La paciente, que desde recién nacida presentaba miopatía hipotónica y daño neurológico, excretaba en la orina metabolitos del ácido

hexanóico, como ácido 2-etil-3-ceto-hexanóico, ácido 2-etil-3-hidroxi-hexanóico y ácido 2-etil-hexanodioico.

El diagnóstico fue confirmado al encontrar la actividad del a ACC hepática de la paciente deficiente al compararla con hígado de rata y como un 10% de la actividad normal al medirla en sus fibroblastos. La PCC de la paciente se encontró dentro de límites normales (Wolf, 1982).

#### Deficiencia Múltiple de Carboxilasas

La Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC) es un grupo de errores inatos del metabolismo de la biotina, los que se heredan en forma autosómica recesiva y en donde las carboxilasas dependientes de esta vitamina se encuentran deficientes.

Existen dos tipos de DMC, la debida a deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa (HS) y la ocasionada por deficiencia de la Biotinidasa.

La deficiencia de HS generalmente se presenta en los primeros días de vida con un cuadro muy grave de vómito, letargia e hipotermia que evolucionan a coma y muerte del paciente. La concentración de biotina en plasma se encuentra normal.

La deficiencia de Biotinidasa se presenta después del segundo ó tercer mes de vida y tiene como manifestaciones, alopecia, dermatitis, ataxia, hipotonía y acidosis metabólica. La concentración de biotina en plasma se encuentra por debajo de los niveles normales. El cuadro clínico debido a deficiencia de biotina (exógena ó genética) es similar al ocasionado por deficiente absorción intestinal de cinc, en la acrodermatitis enteropática o de ácidos grasos esenciales.

Ambos tipos de DMC responden a la administración de biotina (Wolf,1983; Sweetman,1981), en dosis farmacológicas en el caso de deficiencia de Holocarboxilasa Sintetasa y en cantidades pequeñas, en el de deficiencia de Biotinidasa.

## ALIMENTACION II IN PARENTERAL TOTAL

En el ayunamiento prolongado, el organismo humano puede subsistir durante algún tiempo, gracias a mecanismos de reserva que amortortiguan, aunque no evitan, el daño progresivo que se provoca cuando la ingestión oral se encuentra ausente. Estos mecanismos minimizan el consumo de proteínas como aporte calórico. En esta fase, las grasas son el principal sustrato energético. Cuando un sujeto recibe un traumatismo (cirugías mayores, quemaduras, sepsis, síndrome de intestino corto), se liberan las siguientes hormonas: catecolaminas, glucagón y cortisona que se oponen a la acción de la insulina a nivel central y periférico, ocasionando un mayor consumo de proteínas provenientes del músculo, con una selección particular de aminoácidos de cadena ramificada. El ciclo de Krebs se encuentra alterado y hay una mayor glucólisis anaeróbica, esto provoca que los pacientes puedan perder hasta 1 kg. de peso diario y llegar a la muerte por desnutrición en un corto plazo.

En la actualidad se dispone de métodos parenterales eficaces para suministrar todos aquellos elementos (carbohidratos, grasas, proteínas, vitaminas y minerales) suficientes para lograr la síntesis celular y por consiguiente disminuir el catabolismo. Estos métodos son muy útiles cuando

se aplican oportunamente, con indicaciones adecuadas y técnicas muy cuidadosas.

La alimentación parenteral total (APT) representa uno de los adelantos terapéuticos más importantes de los últimos 17 años y ha modificado el curso de muchos padecimientos gastrointestinales.

Este procedimiento terapéutico no es inócuo, se acompaña de complicaciones: técnicas, sépticas y metabólicas. Las complicaciones metabólicas son ocasionadas en general por deficiencias o excesos en la administración de algunos de los elementos necesarios para lograr la síntesis celular.

Estas alteraciones aumentan dependiendo del grado de trauma con que curse el paciente. Las salidas anormales del contenido del tubo digestivo como en la diarrea y el contenido de una fistula enterocutánea aumentan las pérdidas de todos los nutrimentos. Por lo tanto para el éxito del manejo de un paciente con nutrición enteral o parenteral es necesario hacer balances diarios y determinaciones semanales de cada uno de los nutrimentos.

### Antecedentes históricos:

Los primeros intentos de la alimentación parenteral datan del siglo XVII cuando Scotus, en 1664 infundió vino a los animales de experimentación. Courten, de Inglaterra, en 1669 inyectó aceite de oliva parenteralmente.

Las epidemias del siglo pasado dieron lugar a diferentes observaciones como las de Latta en 1832, quien revivió a un paciente con infusión salina aplicada por vía endovenosa; posteriormente, en 1873, Hodder mostró los efectos favorables del uso de leche por la vena. En 1920 Yamakawa utilizó emulsiones de grasa aplicadas por la misma vía.

Posteriormente, en 1938, Ross usó por primera vez aminoácidos intravenosos, observando que era posible, con sólo estos medios parenterales, mantener a un individuo con buena nutrición.

En el postoperatorio se observó que el uso de soluciones glucosadas ofrecía un aporte energético que ayudaba a los enfermos mientras reanudaban su alimentación oral; sin embargo, sólo con esto no se obtenía una regresión del estado catabólico. En 1959 Moore, refiere que el uso de aminoácidos en el postoperatorio produce un aumento en la excreción

urinaria de estos productos nitrogenados, pero si se asocia su administración suficiente cantidad de carbohidratos para ofrecer un buen aporte calórico, si se detiene el catabolismo postquirúrgico. Estos estudios fueron confirmados por Jones y Peaston en 1966.

En 1968 Dudrick, en su comunicado sobre nutrición parenteral a largo plazo con crecimiento, desarrollo y balance de nitrógeno positivo indica que es posible, mediante una serie de requisitos técnicos, lograr con cierta facilidad un balance nitrogenado positivo exclusivamente por vía parenteral. En 1971 este mismo autor publica los principios y la práctica de la nutrición parenteral señalando las múltiples indicaciones de este método, sus riesgos y las fórmulas usadas (Sahagun, 1982).

En principio las soluciones parenterales deben reproducir una imagen de la alimentación oral, es decir, incluir proteínas, grasas, carbohidratos, agua, sales minerales, vitaminas.

El valor de la nutrición parenteral es conocido, sin embargo también lo son las complicaciones que se presentan, entre las cuales se incluye la deficiencia de cinc y/o de biotina.

### Deficiencia de cinc en pacientes con alimentación parenteral total

Existen en el organismo veinticuatro ó más metaloenzimas que contienen cinc, como es la anhidrasa carbónica, la deshidrogenasa láctica, la fosfatasa alcalina y la cinasa de timidina.

La fuente más importante del metal es la proteína animal, en cambio los alimentos procesados, los cítricos y las verduras sin hojas son deficientes en este metal.

El cinc es secretado en el jugo pancreático y en pequeña proporción en la bilis; las heces son la principal vía de excreción, aunque también se eliminan cantidades importantes en el sudor. El cinc al igual que el cobre es fijado por la metalotioneína hepática cuando la ingestión del metal aumenta.

La deficiencia de cinc ocurre como un trastorno primario de su absorción, en la acrodermatitis enteropática, enfermedad genética muy similar clínicamente a la deficiencia de biotina. La deficiencia secundaria de cinc puede presentarse en la malabsorción de cualquier origen o por aumento en su excreción urinaria.

En pacientes con deficiencia de cinc, la actividad de la ribonucleasa sérica parece estar aumentada, en tanto que la actividad de la anhidrasa carbónica eritrocitaria es baja. (Martin, 1985). Se ha discutido la función del cinc en los procesos de cicatrización; Hallbook y Lanner demostraron aceleración en el proceso de cicatrización cuando se administró cinc a pacientes con niveles bajos del metal en el suero, pero no cuando las concentraciones fueron normales (Henkin, 1974). Lee y Green, en un estudio en ratas a las cuales se les administraron diversas dietas variando el contenido de cinc en las mismas, no encontraron diferencias en el proceso de cicatrización (Lee, 1975). Este aspecto sigue siendo motivo de controversias.

En la literatura se ha informado deficiencia aguda de cinc en pacientes que reciben APT, aún a pesar de recibir cinc en el plasma transfundido (Gartside, 1975; Fisher, 1976; Hankins, 1976; Haslted, 1972; Jacobson, 1977; Halsted, 1974).

Algunos de los mecanismos posibles para explicar las concentraciones bajas de oligoelementos en el suero durante la APT son disminución de la ingesta, aumento en las pérdidas, incremento en la utilización bajo el estímulo anabólico que acompaña a la APT o redistribución con utilización en otros compartimientos del cuerpo (Solomons, 1976). Otro mecanismo

posible es la disminución en las proteínas plasmáticas con disminución de las cantidades de zinc ligadas a las mismas.

Así mismo, se ha comprobado que en los estados de alarma, hay un aumento en la excreción urinaria de zinc, sobre todo cuando existe catabolismo de la masa muscular (Fell, 1973).

Ize-Lamache, Carrasco y colaboradores (Ize-Lamache, 1981) realizaron un estudio prospectivo de 28 pacientes sometidos a la alimentación parenteral total y se determinaron niveles séricos de zinc y cobre, así como las pérdidas urinarias de dichos metales. Los pacientes fueron divididos en dos grupos, uno considerado como séptico y otro no séptico; a su vez, cada grupo fue subdividido según se administró o no plasma.

Se encontró disminución de los niveles séricos de ambos metales en pacientes sépticos y no sépticos, con aumento de las pérdidas por orina en ambos grupos en relación a las observadas en los grupos controles; las pérdidas mayores de metales por orina fueron observadas en el grupo de pacientes sépticos. Es probable que otras pérdidas hayan sido por líquido de las fistulas enterocutáneas.

Dado estos resultados en los pacientes con pérdidas altas de oligoelementos deben administrarse preparados comerciales que proporcionan concentraciones de zinc, cobre y

manganeso, en forma que no precipiten con las soluciones de alimentación parenteral.

### Deficiencia de biotina en pacientes con alimentación parenteral

El primer reporte de deficiencia de biotina asociada con alimentación parenteral fue hecho por Mock en 1981 en el cual presentó el caso de un niño quien después de 3 meses con alimentación parenteral total desarrolló un síndrome clínico que consistía de erupción exfoliativa y aciduria orgánica asociada con reducción de biotina en plasma y orina (Mock, 1981). Después de esta información se han publicado muchos casos de niños y adultos. Esos reportes han variado considerablemente en el criterio para el diagnóstico de la deficiencia de biotina y en el régimen de tratamiento.

Se han presentado casos de pacientes que no reciben biotina ni oral ni parenteralmente llegando a presentar en poco tiempo los síntomas de deficiencia de esta vitamina. Después de recibir biotina en sus soluciones parenterales los síntomas desaparecen. Esto sugiere que la deficiencia de biotina ocurre cuando no se proporciona esta vitamina al organismo y su biosíntesis por la flora intestinal se ve comprometida por diarreas o cirugías principalmente (Sheila, 1983).

Los factores que contribuyen a la deficiencia de biotina en la alimentación parenteral son:

1) La alimentación parenteral es la única fuente significativa de nutrientes en este tipo de pacientes y es muy común que la biotina no se encuentre en el suplemento vitamínico.

2) El uso de antibióticos de amplio espectro puede provocar disminución en la síntesis de biotina por la flora intestinal.

3) Grandes pérdidas de fluidos entéricos por vía secretoria como fistula o diarrea principalmente (Mock, 1985).

La combinación de los síntomas de deficiencia de biotina como son alopecia, dermatitis e irritabilidad ó depresión han sido muchas veces confundidos con deficiencia de ácidos grasos ó deficiencia de cinc, debido a que los cuadros carenciales son muy parecidos. Sin embargo es importante aclarar que al referirse a la deficiencia de biotina queda implícita la deficiencia de ácidos grasos debido a que, como ya se mencionó anteriormente, la biotina es cofactor de la Acetil CoA Carboxilasa la cual participa importantemente en la síntesis de ácidos grasos.

**DISEÑO DEL ESTUDIO**

## DISEÑO DEL ESTUDIO

### - Pacientes con alimentación parenteral total (APT):

Se planeó estudiar a pacientes que requerirían de APT por tiempo prolongado, es decir, por más de un mes. Estos pacientes estarían hospitalizados en el Servicio de Apoyo Nutricional del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional del I.M.S.S., servicio que está a cargo del Dr. Antonio Carrasco. Además se estudió a una niña con APT, internada en el Instituto Nacional de Pediatría, a cargo del Dr. Jaime Ramírez.

Los pacientes recibieron el tratamiento habitual que proporciona el Servicio de Apoyo Nutricional. Desde su ingreso al estudio recibieron un complejo vitamínico que no contiene biotina (MVI 10). Se mantuvieron de esta forma hasta que mediante el estudio longitudinal, clínico-metabólico de se determinó el momento en que se iniciaría la administración de biotina, con un nuevo producto, esto fue cuando la actividad específica de las carboxilasas se encontraban muy por debajo de los niveles normales.

En ningún momento se puso en peligro el bienestar y menos aún la vida del paciente.

Criterios de inclusión:

1. Pacientes internados en el Hospital de Especialidades del I.M.S.S. ó en el Instituto Nacional de Pediatría, que fuera probable la alimentación parenteral total prolongada, es decir, por más de 30 días.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes con problemas neurológicos ó cutáneos al inicio del estudio.

2. Pacientes cuyo peso del estudio fuera menor del 60% de acuerdo a su edad y sexo.

Criterios de eliminación:

1. Pacientes que recibieran biotina, antes de ser indicado por la persona responsable del estudio.

Los pacientes incluidos en este estudio fueron 9 y se describen a continuación:

Clave: APT-1

Edad: 33 años

Sexo: Masculino

**Diagnóstico: Estenosis esofágica.**

**Días con APT: 36**

El paciente APT-1 padecía de Esofagitis de un año de evolución (1985). Cuando ingresó al estudio presentaba alopecia, lesiones dérmicas perinasales y peribucales, no mejoró con la aplicación de micostatin, persistieron las lesiones y hubo sangrado en la mucosa nasal.

La dosis de biotina administrada en la solución parenteral fue de 10 ml de MVI-12 (0.138 mg) en 2000 ml de solución parenteral cada 24 horas.

**Clave: APT-2**

**Edad: 23 años**

**Sexo: Femenino.**

**Diagnóstico: Síndrome de intestino corto.**

**Días con APT: Más de 141.**

El Síndrome de intestino corto fué secundario a resección intestinal por perforación intestinal causado por un legrado uterino intrumental mal realizado.

Cuando ingresó al estudio presentaba lesiones dérmicas, depresión y caía de cabello.

La dosis de biotina administrada en la solución parenteral fue de 10 ml de MVI-12 (0.138 mg) en 2000 ml de solución parenteral cada 24 horas. Los últimos días en el estudio recibió dieta blanda.

Clave: APT-3

Edad: 38 años

Sexo: Masculino.

Diagnóstico: Ileostomía de gasto alto.

Días con APT: Más de 114.

La ileostomía fue consecuencia de una hernia Bodaleck estrangulada, que originó varias reintervenciones, sepsis y una ileostomía de gasto alto (más de 500 c.c. diarios).

Cuando ingresó al estudio presentaba cuadro multicarenal y diarrea severa.

La dosis de biotina administrada en la solución parenteral fue de 10 ml de MVI-12 (0.138 mg) en 2000 ml de solución parenteral cada 24 horas. Los últimos días en el estudio recibió dieta blanda.

Clave: APT-4

Edad: 55 años

Sexo: Masculino.

Diagnóstico: Síndrome de intestino corto.

Días con APT: No determinado, falleció.

Síndrome de intestino corto secundario a complicaciones quirúrgicas y trombosis mesentérica.

Cuando ingresó al estudio presentaba alopecia, depresión y lesiones dérmicas.

Falleció por complicaciones debidas a las cirugías, antes de la administración de biotina.

Clave: APT-5

Edad: 40 años

Sexo: Masculino.

Diagnóstico: Síndrome de intestino corto.

Días con APT: Más de 69.

La dosis de biotina administrada en la solución parenteral fue de 10 ml de MVI-12 (0.138 mg) en 2000 ml de solución parenteral cada 24 horas.

Clave: APT-6

Edad: 10 años

Sexo: Femenino.

Diagnóstico: Diarrea crónica.

Días con APT: 137.

Desde 1980 tenía problemas gastrointestinales. Esta paciente estuvo hospitalizada en el Instituto Nacional de Pediatría.

El cuadro clínico que presentó por la deficiencia de biotina, debida a la ausencia de esta vitamina en la solución parenteral fue: alopecia, depresión y dermatitis peribucal y perianal. Durante su hospitalización se desnutrió notablemente.

La causa de la diarrea no se logró averiguar, pese a múltiples estudios diagnósticos.

La administración de biotina fue intermitente y la dosis fue de 0.0276 mg a 0.1104 mg, por dificultades económicas para conseguir el multivitamínico MVI-12.

Clave: APT-7

Edad: 36 años

Sexo: Masculino.

Diagnóstico: Fístula.

Días con APT: 54.

Presentó molestias por la fístula tres meses anteriores a su ingreso al hospital.

Durante su hospitalización perdía 170 ml diarios por la fístula.

La dosis de biotina administrada en la solución parenteral fue de 10 ml de MVI-12 (0.138 mg) en 2000 ml de solución parenteral cada 24 horas. Los últimos días en el estudio recibió té con azúcar y posteriormente dieta blanda.

Clave: APT-8

Edad: 64 años

Sexo: Masculino.

Diagnóstico: Síndrome de intestino corto.

Días con APT: 79

Síndrome de intestino corto secundario por perforación del ciego por ameboma.

Inicia padecimiento cinco meses antes de su ingreso al hospital.

La dosis de biotina administrada en la solución parenteral fue de 10 ml de MVI-12 (0.138 mg) en 2000 ml de solución parenteral cada 24 horas.

Clave: APT-9

Edad: 22 años

Sexo: Masculino.

Diagnóstico: Fístula.

Días con APT: 52

Inició padecimiento un mes antes de ingresar al hospital.

La dosis de biotina administrada en la solución parenteral fue de 10 ml de MVI-12 (0.138 mg) en 2000 ml de solución parenteral cada 24 horas.

Estos pacientes se dividieron en dos grupos:

Grupo A: Pacientes que llevaban ya mucho tiempo con alimentación parenteral total y presentaban manifestaciones de deficiencia de biotina cuando se inició el estudio, en ese momento aún no se contaba en México con multivitamínico parenterales con biotina (MVI-12). De estos pacientes se recolectarán dos muestras de sangre y orina: la primera cuando ingresarán al estudio y la segunda, después de tres meses de recibir biotina en su dieta ó en la solución parenteral (APT-1 al APT-5).

Grupo B: Pacientes que ingresarán al estudio al iniciar la alimentación parenteral total y que semanalmente se les tomó muestra de sangre y orina durante el periodo en que la solución parenteral no contenía biotina y posteriormente cuando se les administró esta vitamina en la solución y/ó

dieta (APT-6 al APT-9) (\*), durante un periodo de 75 días en promedio.

A cada paciente se le practicó vigilancia clínica continua, desde el inicio de la dieta APT, haciendo énfasis en el estado nutricional que tenía al inicio de su tratamiento y durante el transcurso del mismo por el tiempo que lo requería. Así mismo se tuvo una especial vigilancia en cambios de la piel, el cabello, además de la exploración neurológica, buscando intencionalmente cambios en el estado de ánimo (depresión), hipotonía muscular y alteraciones en la marcha (ataxia).

Respecto a la búsqueda de parámetros que se puedan utilizar como indicadores del estado de biotina, se determinó en promedio semanalmente el nivel de biotina total en plasma y en orina, en linfocitos la actividad específica y el índice de estimulación de dos carboxilasas, específicamente de la Propionil CoA Carboxilasa (PCC) y la Piruvato Carboxilasa (PC). En el grupo A no se determinó la Piruvato Carboxilasa ni el Índice de activación debido a que este grupo se empezó a estudiar en la etapa inicial del proyecto.

En cada uno de los pacientes se cuantificó además cinco en plasma y en orina así como creatinina en ésta última, el fin principal de determinar creatinina es el tener un compuesto

cuya excreción es constante y así poder referir la cantidad de biotina a éste.

Los valores normales (controles) se obtuvieron de donadores clínicamente sanos.

## MATERIAL Y METODOS

## MATERIAL Y METODOS

Material necesario para extracción de linfocitos:

- Anticuaugulante: Acido citrico, Citrato de sodio, Dextrosa (ACD):

Reactivos	Cantidad (g)	Concentración (mM)
Citrato trisódico (A. Chemical)	2.5	97.0
Acido citrico (Chemical)	0.798	38.0
Dextrosa anhidra (J.T. Baker)	2.45	136.0
Cloruro de sodio (J.T. Baker)	0.9	154.0

Se afora la solución a 100 ml. con agua destilada, el pH es de 5.0.

El anticuaugulante se esteriliza por filtración usando un filtro Millipore con poro de 0.2 micras. Se conserva en refrigeración (4°C) y en el momento de su uso se mantiene el frasco cerca del mechero teniendo cuidado de mantener esta solución libre de contaminantes, principalmente hongos. La cantidad usada de anticuaugulante es: 0.38 ml. (380 µl) por cada 2.5 ml. de sangre.

- Solución salina amortiguada con tris (TBS), modificada:

Reactivos	Cantida (g)	Concentración (mM)
Tris-HCL (Sigma)	1.82	15.0
Cloruro de sodio (J.T. Baker)	9.0	0.9%
EDTA (J.T. Baker)	20 ml. de sol. stock EDTA 0.1 M.	20.0

Se disuelven los reactivos en 900 ml. de agua destilada, ajustar el pH a 7.4 con ac. clorhídrico y aforar a 1000 ml. con agua destilada.

Se conserva en refrigeración y antes de usar asegurarse que el pH sea 7.4 (pH fisiológico de la sangre) para evitar hemolisis.

- Ficoll hypaque:

Reactivos	Cantidad (g)
Diatricato de sodio (Sigma)	20.0
Ficoll (Sigma)	12.7

Se disuelven los reactivos en 190 ml. de agua destilada y se mide la densidad ajustándola con agua hasta tener el volumen de 200 ml.

Se conserva en refrigeración.

- Medio Esencial Mínimo (MEM):

Reactivos	Cantidad
Medio Mínimo esencial de Eagle (GIBCO)	9.8 g.
Bicarbonato de sodio (J.T. Baker)	2.2 g.
Piruvato de sodio (Sigma)	0.1 g.
Glutamina 200 mM (Sigma)	12.0 ml.
Antibióticos 100X	20.0 ml.

- Stock de antibióticos 100X:

Estreptomina (Lakeside)	2.0 g.
Unidades de penicilina (Lakeside)	$2 \times 10^6$
Agua bidestilada	200.0 ml.

El medio Esencial mínimo se esteriliza por filtración, usando un filtro Millipore con poro de 0.22 micras. Su pH es 7.4 y se conserva en refrigeración. Cuando se trabaja con este medio se hace en la campana de flujo laminar para evitar su contaminación.

### Aislamiento de linfocitos

Los linfocitos se aíslan a partir de 5 ml. de sangre venosa que se coloca en tubos de centrifuga de 15 ml con 760µl de ACD y se mezcla suavemente.

La sangre se centrifuga durante 15 minutos a una velocidad de 1200 rpm; al terminar la centrifugación se retira el plasma, el cual se divide en alícuotas de 1.5ml, las que se congelan para determinaciones posteriores. Al paquete celular que se queda en el tubo se le adiciona un volumen de TBS a temperatura ambiente igual al del plasma retirado y evitando producir hemólisis se le adiciona un volumen adicional de TBS igual a la cantidad inicial de sangre (5 ml.) para así tener finalmente 10 ml. de sangre diluida 1:1.

En tubos de centrifuga de 15 ml. se colocan 4.0 ml. de ficoll hypaque 1077 y sobre él se van agregando los 10 ml. de sangre diluida, evitando que se mezclen. Al terminar de adicionar la sangre diluida en el tubo se pueden observar dos fases, la inferior incolora y transparente (ficoll) y la superior de color rojo (sangre diluida). Centrifugar 30

minutos a 1600 rpm y al terminar esto en los tubos se podran observar 4 fases que en orden descendente son: 1) Plasma + TBS, 2) Linfocitos, 3) Ficoll y 4) eritrocitos y granulocitos (fig. M1). Se desecha la primera fase (de plasma + TBS), la fase de linfocitos se pasa a un tubo de centrifuga con 3 ml. de TBS y posteriormente se lleva el volumen a 15 ml con TBS. Estos 15 ml se dividen en dos tubos de plástico cónicos marcados previamente "sin biotina" y "con biotina". Se centrifugan a 1200 rpm durante 15 minutos y así las células se concentran en el fondo del tubo. Se retira el sobrenadante y en la campana de flujo laminar se le adiciona a cada tubo 2.5 ml. de MEM; unicamente al marcado "con biotina" se le agregan los  $\mu$ l necesarios para tener una concentración de Biotina de  $10^{-8}$  M (Terttu Sourmala y cols. 1985) que equivalen a 122  $\mu$ l de una solución de biotina 5 mg en 100 ml. Se resuspenden las células con una pipeta pasteur y se incuban a 35°C por 2 horas con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (para mantener el pH del medio) . Esta maniobra tiene el objeto de que la biotina del medio penetre a las mitocondrias y sea usada como cofactor por las carboxilasas (PCC, PC y MCC). Posteriormente a esta incubación se lavan los linfocitos con TBS para eliminar el exceso de MEM y se centrifugan 15 minutos a 1200 rpm; en el fondo del tubo se concentran los linfocitos y eritrocitos. Para eliminar los eritrocitos, aunque no sean visibles, una vez que se ha retirado el sobrenadante se adicionan 300  $\mu$ l de agua destilada helada para provocar la lisis de los mismos por choque

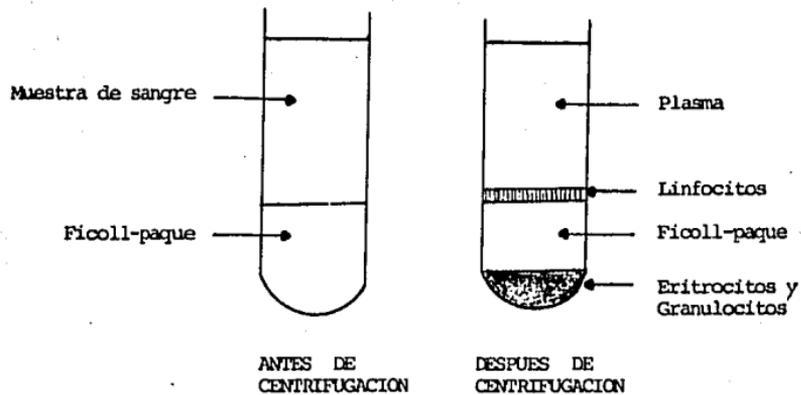


Fig. M-1. Distribución de las células antes y después de centrifugar en presencia de Ficoll-paque.

hipotónico e hipotérmico; además se agita en el vortex a su máxima velocidad durante 30 segundos cada tubo, se recuperan las células y se colocan en tubos eppendorf volviéndose a lavar con TBS. Se centrifugan a una velocidad de 7 g durante 5 minutos, se desecha el sobrenadante y si se vuelven a observar eritrocitos se repite el choque, se centrifuga, se secan las paredes del tubo y con la boca del mismo hacia abajo se congelan en a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el día del ensayo de carboxilasas.

Determinación de actividad enzimática de carboxilasas (PCC y PC<sub>1</sub>)

Material:

- Buffer de Tris BX:

Reactivos	Cantidad	Concentración (mM)
Tris (Sigma)	9.69 g.	800
Cloruro de magnesio (J.T. Baker)	4.8 ml. de sol.stock 1M.	48
Cloruro de potasio (J.T. Baker)	2.98 g.	400
EDTA (J.T. Baker)	4.0 ml. de sol.stock 0.1M	4.0

Disolver los reactivos en 90 ml. de agua destilada. Usar ácido clorhídrico para ajustar pH a 8.0 y afore la solución en 100 ml. con agua destilada.

Para conservar el buffer, dividirlo en alícuotas de 10ml.  
y mantener en congelación.

- Buffer de lisis:

Reactivos	Concentración (mM)
Tris (Sigma)	50.0
EDTA (J.T. Baker)	0.025

Disolver los reactivos en 90 ml. de agua destilada, usar ácido clorhídrico para ajustar pH 8.0 y aforar a 100 ml.

Hacer alícuotas de 10 ml. y conservar en congelación.

Cuando se requiera el buffer se descongela en baño de hielo.

- n- Propionil Coenzima A (PCoA):

Disolver 27.6384 mg. de PCoA (peso molecular de 863.7) en 1.5 ml. de agua destilada para tener una solución de PCoA 19.2mM.

Para su conservación dividir en alícuotas de 0.5 ml. y mantener en refrigeración. Cuando se utilice se descongela en baño de hielo.

- Acetil Coenzima A (AcCoA):

Disolver 25.0 mg. de AcCoA en 4.29 ml. de agua destilada para tener una solución de AcCoA 7.2 mM.

Para conservarla se hacen alicuotas de 0.5 ml. y se mantienen en congelación, en el momento de su uso se descongela en baño de hielo.

- Solución stock BX + ATP + Glutation reducido (GSH):

Reactivos	Cantidad:
ATP (Sigma)	0.0144 g.
GSH (Sigma)	0.0061 g.
Buffer Tris BX	1.0 ml.

El buffer Tris BX se descongela a temperatura ambiente. Se mezclan los reactivos perfectamente y se dejan en baño de hielo para su uso inmediato en el ensayo enzimático.

- Solución de citrato sintetasa en piruvato de sodio:

### Solución de piruvato de sodio:

Disolver 0.0044 g. de piruvato de sodio en 1.0 ml. de agua destilada.

Hacer una dilución de citrato sintetasa en piruvato de sodio 1:10, para esto en un tubo eppendorf adicionar 90  $\mu$ l de la solución de piruvato de sodio y 10  $\mu$ l de citrato sintetasa, se mantiene en hielo hasta su uso en el ensayo.

### - Solución de centelleo (Solución Bray):

Reactivos	Cantidad
Naftaleno (J.T. Baker)	180 g.
PPD (New England)	12 g.
Etilenglicol (Sigma)	60 ml.
Metanol (Merck)	300 ml.
Dioxano cbp (J.T. Baker)	3000 ml.

Agregar cada uno de los reactivos con agitación hasta la completa disolución del Naftaleno y PPD. Se conserva a temperatura ambiente en frasco ámbar para evitar quimioluminiscencia.

### - Bicarbonato de sodio radiactivo ( $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ):

Actividad específica: 7.7 microCi/micromol.

Molaridad: 0.1

Isótopo radiactivo:  $^{14}\text{C}$

Técnica para determinación de actividad enzimática de PCC y PC

El ensayo de carboxilasas (Sweetman 1982) se basa en la incorporación de  $^{14}\text{CO}_2$  del  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  en el sustrato apropiado para dar un producto marcado por un isótopo radiactivo ( $^{14}\text{C}$ ) el cual puede ser cuantificado en el contador de centelleo líquido, mientras que el bicarbonato radiactivo que no reaccionó es eliminado como  $^{14}\text{CO}_2$ . Así el producto primario de la PCC al actuar en el sustrato propionil-CoA es  $^{14}\text{C}$ -metilmalonil-CoA y el de la PC al actuar en el sustrato Piruvato es el ácido  $^{14}\text{C}$ -oxalacético; como este último es inestable se agrega citrato sintetasa a la mezcla de reacción para convertirlo en ácido  $^{14}\text{C}$ -cítrico, el cual sí es estable. La acetil-CoA actúa como activador alostérico de la PC y también sirve como sustrato con el ácido  $^{14}\text{C}$ -oxalacético para la síntesis del ácido  $^{14}\text{C}$ -cítrico.

Las células en las que se realiza este ensayo son linfocitos por su contenido de mitocondrias y fácil obtención.

En tubos eppendorf previamente marcados para reconocer los blancos y los problemas de cada enzima, se le adiciona a cada uno 10  $\mu$ l de la mezcla de reacción correspondiente (esto se realiza manteniendo los reactivos en baño de hielo), estas mezclas contienen en volúmenes iguales lo siguiente:

Reactivo	Blanco para PCC	PCC	Blanco para PC	PC
Agua	25	25	0	0
Stock 8X+ATP+GSH	25	25	25	25
CoAs o agua	25 (agua)	25 PCoA	25 (agua)	25 AcCoA
Citrato sintetasa en piruvato de sodio	0	0	25	25
NaH <sup>+</sup> CO <sub>3</sub>	25	25	25	25
Volumen total	100	100	100	100

Para romper los linfocitos y dejar libres las carboxilasas mitocondriales, se resuspenden las células en 300µl de buffer de lisis y se tratan con un sonicador Branson modelo 200 descargando en cada tubo 20 pulsos de 0.5 seg con un descanso intermedio de 40 seg, sumergidos en hielos. La intensidad es de 80 watts, estas condiciones de sonicación se establecieron en el laboratorio al montar la técnica de Sweetman (ver en resultados).

Inmediatamente después adicionar 10 µl de células sonicadas a cada tubo con mezcla de reacción, mezclar e incubar en baño maría 1 hora a 30°C con agitación.

Detener la reacción metiendo los tubos en hielo y adicionar a cada uno 10 µl de ácido fórmico al 15%, mezclar perfectamente y esperar 15 minutos.

Recortar papel Whatman 3 MM para cromatografía, en tiras que contengan cuadros de 3 x 3 cm y marcarlos con el número de cada tubo; aplicar en el centro del cuadro 25  $\mu$ l de su correspondiente mezcla. Después de 15 minutos adicionar 30  $\mu$ l de ácido fórmico 15% a cada muestra y secar el papel con una pistola de aire durante 30 minutos. Colocar en pequeños fragmentos cada cuadro de papel en un vial con 1.0 ml. de agua destilada para eluir la muestra y agregar 5.0 ml. de solución Bray. Agitar y contar en un contador de centelleo líquido 10 minutos, isótopo  $^{14}\text{C}$  y standard externo.

Es necesario medir proteínas en las células sonificadas para poder reportar la actividad específica en picomolas de  $^{14}\text{CO}_2$  fijado por minuto por mg de proteína.

#### Determinación de proteínas (Lowry, 1951):

##### Material:

- Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 N:

Reactivos	Cantidad
Carbonato de sodio (J.T. Baker)	20 g.
Hidróxido de sodio (J.T. Baker)	4 g.

Disolver los reactivos en agua destilada, aforar a 10 ml.

- Sulfato còprico 1.0 %:

1.0 g. de sulfato còprico disolverlo en agua destilada y aforar a 100 ml.

- Tartrato de sodio y potasio 2.0 %:

2.0 g. de tartrato de sodio y potasio se disuelven en 100ml. de agua destilada.

- Albùmina sèrica bovina (BSA):

100 g. de BSA adicionar en 100 ml. de agua destilada. Hacer alicuotas de volùmenes pequeños y conservar a menos 20°C.

Técnica de Lowry para determinar proteínas:

Solución A:

Carbonato de sodio (J.T. Baker) 2%	100 partes
Sulfato Còprico (J.T. Baker) 1%	1 parte
Tartrato de sodio y potasio (J.T. Baker) 2%	1 parte

**Solución B:**

Folin (Sigma)  
Agua destilada

1 parte  
1 parte

Ambas soluciones se deben preparar inmediatamente antes de usar.

## Curva estándar:

Tubo	µl BSA	µl agua dest.	µl B. lisis	µl Sol.A
1, 2	0	500	0	2500
3, 4	0	480	20	2500
5, 6	10	470	20	2500
7, 8	20	460	20	2500
9, 10	40	440	20	2500
11, 12	50	430	20	2500
13, 14	60	420	20	2500
Muestra experimental:				
15, 16	20	460	20	2500

Para desarrollar el color que es proporcional al contenido de proteínas, adicionar a todos los tubos 250 µl de solución B, mezclar perfectamente y dejar reposando 30 minutos a temperatura ambiente antes de la lectura a 700 nm en el espectrofotómetro; el color es estable por dos horas.

Graficar colocando en las abscisas los mcg. de albúmina (proteína) y en el eje de las ordenadas las lecturas a 700 nm. Trazar la mejor recta respecto a los puntos obtenidos e interpolar las lecturas de las muestras.

Cálculos para determinar la actividad específica

Eficiencia = % de eficiencia para  $^{14}\text{C}$  dividido entre 100.

DPM = CPM ÷ Eficiencia.

$$\frac{\text{DPM}}{\mu\text{g prot}} = \frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ mg}} \times \frac{1 \mu\text{Ci}}{2.22 \times 10^4 \text{ DPM}} \times \frac{1 \text{ mmol}}{7.7 \mu\text{Ci}} \times \frac{106 \text{ pmoles}}{1 \text{ mmol}} = \frac{\text{pmoles}}{\text{mg prot}}$$

$$\frac{\text{pmoles } ^{14}\text{CO}_2 \text{ fijado}}{\text{mg proteínas}} = \frac{60 \text{ minutos}}{\text{incubación}} = \frac{\text{pmoles } ^{14}\text{CO}_2}{\text{mg.prot.} \times \text{minuto}}$$

Determinación de biotina (Thuy Le, 1985, comunicación personal):

Material:

- Cloruro de sodio 0.15 M. Conservar en refrigeración.

- Biotina-<sup>3</sup>H (Dupont):

De biotina radiactiva de 1 mCi/ml. Tomar 5  $\mu\text{l}$  y evaporada en un vial. Adicionar 2 ml de NaCl 0.15 M.

Concentración: 5  $\mu\text{l}$  de biotina tritiada / 4.5 ml. de Cloruro de sodio.

- Biotina "fría" (Sigma):

Solución A:

Disolver 5 mg de biotina en 100 ml. de Cloruro de sodio 0.15M o 50 µg en 1 ml. de Cloruro de sodio. Hacer pequeñas alícuotas y conservar en congelación.

Solución B:

Diluir la solución A 1:100 en Cloruro de sodio. Conservar en congelación pequeñas alícuotas.

Solución C:

Hacer una dilución de la solución B 1:100 en cloruro de sodio 0.15 M. Preparar inmediatamente antes de usar y desechar el sobrante.

Avidina:

Solución A:

Disolver 5.0 mg de avidina en 1.412 µl de Cloruro de

sodio, para obtener una solución de avidina 40  $\mu$ M. Conservar en congelación en pequeñas alícuotas.

#### Solución B:

Hacer una dilución de 1:100 de la solución A con Cloruro de sodio. Conservar en congelación en pequeñas alícuotas.

#### Solución C:

Diluir la Solución B 1:30 con Cloruro de sodio, inmediatamente antes de usar y desechar el sobrante.

#### - Anticuerpo anti avidina:

Se utilizan anticuerpos antiavidina producidos en conejo.

- Células de *Staphilococcus aureus*, obtenidas en forma comercial como Pansorbin (Hoechst).

#### Dilución de avidina:

Antes del ensayo de avidina realizar lo siguiente:

1. Preparar avidina solución B como se describe antes y hacer una dilución 1:30.

2. Proseguir como lo indica la siguiente tabla:

Tubo	Biotina- <sup>35</sup> H	NaCl 0.15 M	Avidina
1, 2 (Bco)	20	220	
3, 4	20	202	18
5, 6	20	200	20
7, 8	20	198	22
9, 10	20	196	24
11, 12	20	190	30

3. Mezclar perfectamente y dejar en reposo 30 minutos a temperatura ambiente.

4. Adicionar 10  $\mu$ l de anti-avidina (1:10). Mezcle por 30 minutos a temperatura ambiente.

5. Adicionar 20  $\mu$ l de Staphilococcus aureus. Mezcle por 30 minutos a temperatura ambiente.

6. Centrifugar y contar el sobrenadante.

**Cálculos:**

Considerar al promedio de los tubos 1 y 2 (blancos) como el 100 % de biotina radiactiva no unida.

Elegir la cantidad de avidina que tenga 20-30% de biotina radiactiva no unida (lo cual equivale a 70 - 80% de biotina unida).

**Técnica de Thuy Le:**

Para determinar la cantidad de biotina se usa una técnica de dilución isotópica que se basa fundamentalmente en la competencia entre biotina "fría" (B) y biotina tritiada ( $^3\text{H}$ B) por la unión a la avidina. Dado que el complejo avidina-biotina no tiene un peso molecular muy grande y no se precipita fácilmente es necesario unir a éste el anticuerpo  $\alpha$ -avidina y posteriormente las células de *Staphylococcus aureus*, facilitando así la separación de la biotina libre y la unida por medio de centrifugación.

## Curva estándar:

Tubo	Biotina ( $\mu$ l sol.C)	$\mu$ l $^3$ H B	$\mu$ l NaCl 0.15 M.	Avidina ( $\mu$ l sol.C)
1, 2	0	10	220	0
3, 4	0	10	200	20
5, 6	5	10	195	20
7, 8	10	10	190	20
9, 10	20	10	180 20	
11, 12	40	10	160 20	
13, 14	60	10	140	20

Después de mezclar la biotina "fria" y la tritiada, agitar perfectamente y centrifugar para evitar perder muestra en el momento de abrir el tubo eppendorf (esto debe hacerse después de agregar cada uno de los siguientes compuestos), adicionar la avidina, dejar incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos, agregar los anticuerpos  $\alpha$ -avidina (10 $\mu$ l a cada tubo), incubar 30 minutos, adicionar el Staphilococcus aureus (10 $\mu$ l a cada uno de los tubos) y volver a incubar 30 minutos, centrifugar a 11 x g por 5 minutos. Tomar una muestra de 220  $\mu$ l del sobrenadante mezclarla con 2.5 ml de solución Bray y contar en el contador para centellen liquido con las condiciones siguientes: isótopo radiactivo:  $^3$ H, tiempo de conteo para cada vial: 1 minuto cada vial, con el porcentaje de desviación.

Graficar en papel semilogaritmico colocando en el eje de las abscisas la cantidad de pg de biotina que tiene cada tubo y en el eje de las ordenadas el porcentaje de biotina unida, de esta forma resulta una curva sigmoidea donde se interpola el porcentaje de biotina unida de la muestra para obtener la cantidad de biotina en pg. Con esta técnica se determina biotina en orina y en plasma.

La cantidad de biotina que contiene cada tubo se indica a

#### Cantidad de biotina

1, 2	no avidina
3, 4	0 pg
5, 6	25 pg
7, 8	50 pg
9, 10	100 pg
11, 12	200 pg
13, 14	300 pg

### Cálculos para estimar la biotina unida:

Considerar los tubos 1 y 2 (no avidina) como el 100% de biotina libre o no unida. Obtener los porcentajes de los demás tubos calculándolos por regla de tres en donde el promedio de CPM de los tubos 1 y 2 es el 100% y el promedio de CPM del siguiente par de tubos es X% de biotina libre, por resta se obtiene el porcentaje de biotina unida.

CPM (tubos no avidina) - 100 %

CPM (tubos subsecuentes) -     X %    

X = Porcentaje de biotina no

unida.

Biotina unida = 100 % - Porcentaje de biotina no unida

Conversión de pg a ng por ml de biotinas:

$$\frac{\text{pg}}{\mu\text{l}} \times \frac{1\mu\text{l}}{10^{-3}\text{ml}} \times \frac{10^{-12}\text{g}}{1\text{pg}} \times \frac{1\text{ng}}{10^{-9}\text{g}} = \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$$

Determinación de biotinidasa. método colorimétrico (Wolf, 1983):

**Material:**

- Buffer de fosfato monobásico:

Disolver 13.61 g de fosfato monobásico (J.T. Baker) en 100 de agua destilada teniendo se esta forma una solución con 200  $\mu$ moles en 200 ml, ajustar a pH 6.0 con hidróxido de potasio. Conservar en refrigeración.

- Solución de EDTA:

Disolver 5.848 g de EDTA en 100 ml de agua destilada para tener una solución con 200  $\mu$ moles de EDTA en 100 ml. Conservar en refrigeración.

- Albúmina sérica bovina:

Disolver 500 mg de albúmina sérica bovina (Sigma) en 100 ml de agua destilada. Conservar en refrigeración.

- Solución stock de ácido N-biotinil-p-aminobenzoato (Sigma):

Disolver 23.865 mg de N-biotinil-p-aminobenzoato (B-PAB)

en 100ml de agua destilada, teniendo así una concentración de 150 nM en 100 ml.

- Acido tricloroacético (Merck) 30%:

Mezclar 30 ml de acido tricloroacético y aforar a 100 ml con agua destilada. Conservar a temperatura ambiente.

- Nitrito de sodio (Sigma) 0.1%:

0.01 g de nitrito de sodio disolver en 10 ml de agua destilada. Preparar inmediatamente antes de usar.

- N-1- Naftil etilendiamina hidroclico (HNED) 0.1% :

Disolver 0.05 g de HNED en 50 ml de agua destilada. Conservar en refrigeración.

- Sulfonamida (Sigma) 0.5%

Disolver 0.25 g de sulfonamida en 50 ml de agua destilada. Conservar en refrigeración.

Técnica de Wolf para determinar la actividad de biotinidasas

La técnica consiste en cuantificar el p-amino benzoato (PAB) que es liberado de un sustrato artificial, biotinil-para aminobezoato (B-PAB), al ponerse éste en contacto con la biotinidasa del plasma.

La actividad específica de la biotinidasa se reporta como: nmoles de PAB liberado por minuto y por ml de plasma o también nmoles de PAB liberados por minuto y por mg de proteínas.

Curva estándar:

Tubo	$\mu$ l PAB	B.monobásico $\mu$ l	EDTA $\mu$ l	BSA $\mu$ l	Agua $\mu$ l
1, 2	0	200	100	100	1600
3, 4	5	200	100	100	1595
5, 6	10	200	100	100	1590
7, 8	15	200	100	100	1585
9, 10	20	200	100	100	1580
11, 12	25	200	100	100	1575
13, 14	30	200	100	100	1570
15, 16	40	200	100	100	1560

Después de adicionar a cada tubo lo indicado, agregar 200 $\mu$ l de TCA 30%, mezclar y centrifugar a 6000 rpm por 15 minutos con freno bajo. Del sobrenadante tomar 1.5 ml. y mezclar con 0.5 ml de agua destilada; posteriormente hacer la reacción para desarrollar color.

**Reacción para desarrollar color:**

1.- Agregar a cada tubo 200  $\mu$ l de solución de nitrito de sodio 0.1%. Dejar reposar 3 minutos.

2.- Adicionar 200  $\mu$ l de sulfamida 0.5% y esperar 3 minutos.

3.- Adicionar 200  $\mu$ l de HNED 0.1% y esperar 10 minutos.

4.- Leer a  $A_{544}$ .

**Procesamiento de las muestras para determinar la actividad de biotinidasa en plasma:**

Tubo	$\mu$ l Amortiguador	$\mu$ l EDTA	$\mu$ l BSA	$\mu$ l Sustrato	$\mu$ l Agua
1, 2	200	100	100	300	1300
3, 4	200	100	100	300	1200
5, 6	200	100	100	300	1200

Después de adicionar lo indicado en cada tubo, preincubar con agitación por 15 minutos a 37°C y hacer lo siguiente:

Tubo		$\mu$ l plasma
1, 2	Blanco	0
3, 4	Problema	100
5, 6	Tiempo cero	100 + 200 $\mu$ l de TCA 30%.

Incubar con agitación 30 minutos a 37 °C.

Adicionar a los blancos y a los problemas 200  $\mu$ l de TCA 30% y sumergirlos en hielo para detener la reacción.

Centrifugar a 6000 rpm / 5 minutos con freno bajo.

Tomar 1.5 ml. del sobrenadante y mezclar con 0.5 ml. de agua. Hacer la reacción para desarrollar color y leer en el espectrocolorimetro a 546 nm.

Graficar en papel milimétrico colocando en el eje de las abscisas nmoles de PAB y en el de las ordenadas la absorbancia a 546 nm. Trazar la mejor recta respecto a los puntos obtenidos e interpolar las absorbancia de las muestras problema.

Cálculos para determinar la actividad específica de la biotinidasa en plasma:

nmoles de N-biotinil-p-aminobenzóico de la muestra = (nmoles de N-biotinil-p-aminobenzóico del problema) - (nmoles de N-biotinil-p-aminobenzóico del tiempo cero).

PBA= N-biotinil-p-aminobenzóico

$$\frac{\text{nmoles de PBA de la muestra} \times 10}{30 \text{ minutos de incubación}} = \frac{\text{nmoles de PBA liberado}}{\text{minuto} \times \text{ml. de plasma}}$$

#### Determinación de creatinina.

Material:

- Solución estándar de creatinina (sigma):

Solución A:

Disolver 250 mg de creatinina en 50 ml de ácido clorhídrico 0.1 N y aforar a 500 ml con agua destilada.

Conservar en congelación.

**Solución B:**

Diluir la solución A 1:50 con agua destilada la concentración es de 50 µg/ml. Conservar en congelación hasta su uso.

**- Hidróxido de sodio 0.75 N:**

Disolver 3.0 g de hidróxido de sodio en 90 ml de agua destilada y aforar a 100 ml con agua. Conservar a temperatura ambiente.

**- Ácido pícrico 0.04 M:**

Disolver 0.9164 g de ácido pícrico en 90 ml de agua destilada y aforar a 100ml. Conservar a temperatura ambiente.

**Procedimiento para medir creatinina en orina:**

La creatinina puede ser determinada en cualquier líquido biológico, pero las muestras que se emplean más comúnmente son plasma, suero y orina. Si se guardan las muestras por periodos largos deben congelarse.

La creatinina en orina se determina por medio de la reacción de Jaffe, basada en que después de la adición de una solución alcalina de picrato se produce una sustancia de color ámbar cuya composición todavía no está establecida.

Curva estándar:

Tubo	sol. stock creatinina	ml Agua	Concentración (µg/ml)
1, 2	0 ml	10.0	0.0
3, 4	0.5 ml	9.5	0.5
5, 6	1.0 ml	9.0	0.10
7, 8	2.0 ml	8.0	0.20
9, 10	4.0 ml	6.0	0.40
11, 12	6.0 ml	4.0	0.60
13, 14	8.0 ml	2.0	0.80
15, 16	10.0 ml	0.0	1.00

Tomar 1.5 ml de cada tubo y mezclar perfectamente con 0.5 ml de hidróxido de sodio y 0.5 ml de ácido picrico, dejar en reposo 20 minutos y posteriormente leer en el espectrofotómetro a 520nm. El color final en la reacción de Jaffe es estable dentro de la primera media hora.

Graficar en papel milimétrico colocando en las abscisas la concentración de creatinina y en las ordenadas las absorbancias de cada tubo.

Las muestras de orina se diluyen 1:100 o 1:200 con agua destilada, se toma 1.5 ml de la dilución hecha y se le agrega 0.5ml de hidróxido de sodio y 0.5 ml de ácido picrico; se deja reposar 20 minutos e inmediatamente después se leen a 520 nm. La lectura obtenida se interpola en la gráfica de la curva estándar.

#### Determinación de cinc (Foote, 1982)

Curva de calibración:

A partir de una solución stock de cinc 50 ppm hacer una dilución 1:50 con agua desionizada para tener una solución cuya concentración es 1 ppm y a partir de esta hacer las diluciones para tener como concentración final 10, 20 30, 40, 60 y 80 ppb.

Condiciones de trabajo:

Flujo: 200 ml/minuto

Temperatura de secado: 90°C

Tiempo: 30 segundos.

Temperatura charring: 600°C

Tiempo: 30 segundos.

Temperatura de atomización: 2100°C

Tiempo: 5 segundos.

Procedimiento para cuantificar cinc en plasma y orina:

La determinación de cinc en plasma y orina se realiza utilizando un espectrómetro de absorción atómica con atomización electrotérmica.

La curva estándar después de tener el espectrograma se grafica en papel milimétrico colocando en las abscisas la concentración de cinc y en las ordenadas los mm.

Las muestras se diluyen 1:100 o 1:200, se inyectan al espectrómetro 20  $\mu$ l y los valores obtenidos se interpolan en la gráfica para obtener ng de cinc/ml.

**RESULTADOS**

## RESULTADOS

### MONTAJE DE LA TÉCNICA PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS CARBOXILASAS

La técnica de Sweetman (Sweetman, 1985) se montó, estableciendo las condiciones óptimas de sonicación (Intensidad y Tiempo) para determinar la actividad de dos enzimas mitocondriales dependientes de biotina (Propionil CoA Carboxilasa y Piruvato Carboxilasa). Todos los ensayos realizados para este fin se repitieron cuando menos en 3 ocasiones, presentando aquí los resultados obtenidos en forma resumida o de uno de los más representativos.

Para el montaje de la técnica antes mencionada, la enzima que se determinó fue la PCC, debido a que es la más estable de las carboxilasas y también con el fin de reducir el gasto de reactivos.

Las condiciones que se experimentarán y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Intensidad	Pulsos	Actividad específica†
1	2 de 5 seg. cada uno	102.84
1	1 de 10 seg. cada uno	98.69
2	10 pulsos de 0.5 seg. c/u	116.9
3	2 de 5 seg. cada uno	233.54
3	2 de 10 seg. cada uno	170.68
3	20 pulsos de 0.5 seg. c/u	279.18
4.5	2 de 5 seg. cada uno	170.82

† Actividad específica promedio (pmoles de  $^{14}\text{CO}_2$  fijados  $\text{minuto}^{-1}$   $\text{mg}$  de proteínas $^{-1}$ )

En intensidades de 5, 6 y 6.5 la muestra se calentó demasiado, por lo que se decidió no hacer la determinación de la actividad de carboxilasas ya que seguramente las enzimas se desnaturalizaron por el calor.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las condiciones que se considerarán óptimas para la sonicación de los linfocitos fueron: Intensidad 3, dos series de 10 pulsos de 0.5 seg. cada uno, con un descanso intermedio de 40 segundos, durante el cual la muestra se mantuvo en baño de hielo.

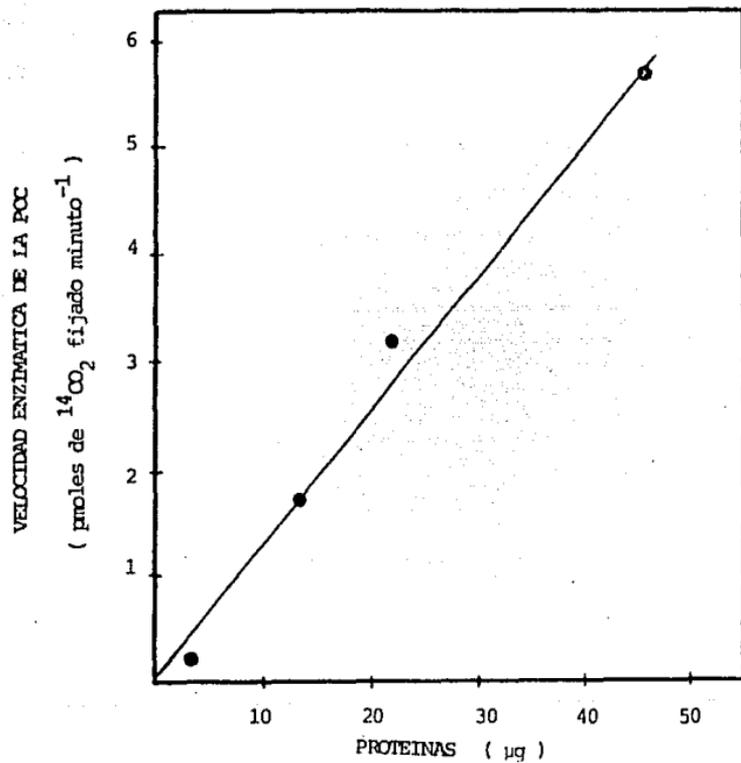
RELACION ENTRE LA CANTIDAD DE PROTEINA Y LA VELOCIDAD  
ENZIMATICA

Se realizaron ensayos para determinar la relación entre la cantidad de proteína y la velocidad enzimática. Al graficar los resultados se obtuvo una línea recta en el intervalo de 0 a 40 microgramos (Gráfica R-1).

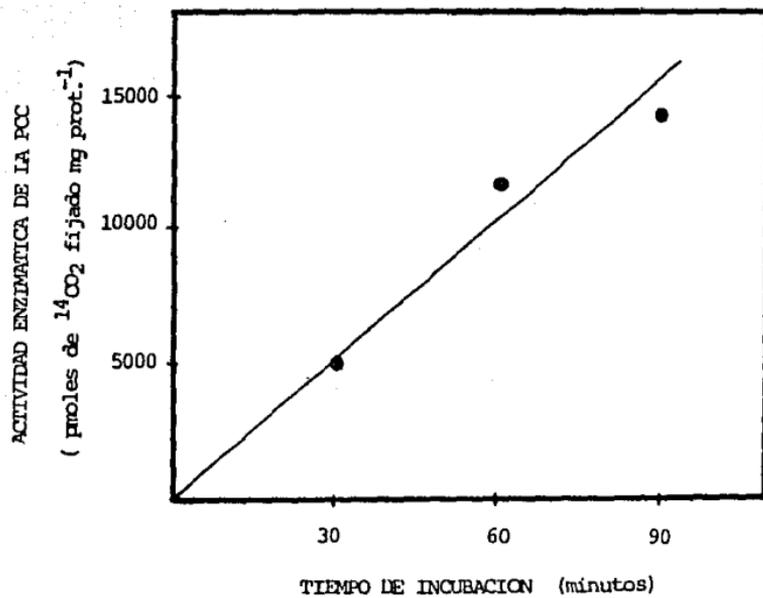
µg Proteínas	Velocidad (pmoles de $^{14}\text{CO}_2$ fijado minuto $^{-1}$ )	Media
0.00	0.00, 0.00	0.00
3.90	0.25, 0.16	0.20
13.00	1.66, 1.86	1.76
20.19	3.10, 3.31	3.20
40.51	5.99, 5.35	5.67

RELACION ENTRE TIEMPO DE INCUBACION Y ACTIVIDAD ENZIMATICA

Se determinó la relación entre diferentes tiempos de incubación (30, 60 y 90 minutos) a 30° C y la actividad enzimática, obteniéndose una recta con pendiente positiva (Gráfica R-2).



Gráfica R-1. Efecto de la cantidad de proteínas en la velocidad enzimática de la Propionil CoA Carboxilasa.



Gráfica R-2. Efecto del tiempo de incubación a 30°C sobre la actividad enzimática de la Propionil CoA Carboxilasa.

Tiempo de incubación (minutos)	Actividad enzimática (pmoles de $^{14}\text{CO}_2$ fijado mg prot $^{-1}$ )	Media
30	5571.12, 4455.76, 5426.13	5151.0
60	13329.79, 10203.31	11766.55
90	15543.34, 13696.69, 13145.06	14128.37

#### COEFICIENTE DE VARIACION

El coeficiente de variación intra e interensayo fue determinado, considerando las actividades específicas en muestras de un sólo donador y obteniéndose los siguientes resultados:

Día	Actividad específica (pmoles de $^{14}\text{CO}_2$ fijado minuto $^{-1}$ mg prot $^{-1}$ )
1	150.81, 164.24, 157.67, 158.29, 147.43
2	166.82, 171.92, 174.61, 147.86, 186.96
3	170.17, 161.04, 183.27, 172.44, 161.14
4	127.36, 127.85, 117.62, 124.60, 128.14
5	158.05, 150.48, 164.51, 146.11, 140.63

Día	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación
1	155.692	6.629	4.25%
2	169.638	14.240	8.39%
3	169.737	9.234	5.44%
4	125.118	4.417	3.53%
5	151.959	9.479	6.23%

Tomando en cuenta los datos anteriores el coeficiente de variación intraensayo, es en promedio 5.61%.

Día	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación
1 a 5	154.429	18.740	12.135%

El coeficiente interensayo es 12.135%.

#### INDICE DE ACTIVACION

El índice de activación (relación de la actividad específica de las carboxilasas de los linfocitos incubados con pbiotina y los incubados sin esta vitamina), proporciona una

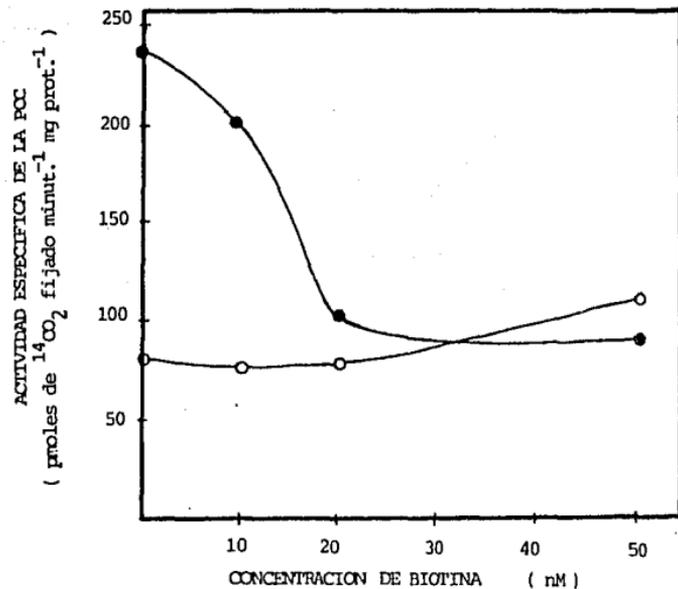
idea de la capacidad de las enzimas para aumentar su actividad en presencia de biotina.

Para determinar la concentración de biotina del medio que active significativamente a las carboxilasas, se realizaron ensayos con muestras de una persona clínicamente sana y un paciente con desnutrición severa, se estudió la relación entre la concentración de biotina en el medio de incubación de los linfocitos, y la actividad específica.

Las concentraciones de biotina en el MEM fueron; 0, 10, 20 y 50 nM, los resultados obtenidos son los siguientes:

Donador sano (Gráfica R-3):

Concentración de biotina (nM)	Actividad específica PCC (pmoles de $^{14}\text{CO}_2$ fijado $\text{minuto}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$ )
0	236.70
10	202.16
20	102.76
50	91.9



Gráfica R-3. Efecto de la concentración de biotina sobre la actividad específica de la Propionil CoA Carboxilasa.

Donador clínicamente sano (●)  
 Paciente desnutrido (○)

## Paciente desnutrido (Gráfica R-3):

---

Concentración de biotina (nM)	Actividad específica PCC (pmoles de $^{14}\text{CO}_2$ fijado $\text{minuto}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$ )
----------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------

---

0	81.89
10	77.88
20	80.18
50	111.14

---

No obtuvimos la concentración de biotina que aumentará significativamente la actividad de la PCC del desnutrido. En este tipo de pacientes la mayoría de sus enzimas se encuentran como apocarboxilasas y necesitan de biotina para ser activas, las concentraciones requeridas son mayores a las que probamos. Sería conveniente repetir este ensayo utilizando concentraciones mayores, esto no fue posible para nosotros por la falta de un paciente con las características deseadas (desnutrición con deficiencia de biotina).

En este experimento pudimos observar que en el donador sano, concentraciones altas de biotina provocan que la actividad específica de la Propionil CoA Carboxilasa disminuya, esto nos sugiere que de alguna forma al encontrarse esta enzima en altas concentraciones de biotina su actividad se inhibe. Nosotros esperábamos que al no tener deficiencia de biotina el donador sano, la actividad de sus carboxilasas permaneciera en el nivel basal aún en presencia de altas

concentraciones de esta vitamina, ya que sus enzimas se encuentran como holocarboxilasas y por tanto no requieren de un cofactor para ser activas ó aumentar su actividad.

Debido a lo anterior se decidió utilizar la concentración de biotina que reporta Suormala, Bonjour y colaboradores, quienes desarrollaron un método para diferenciar deficiencias aisladas de carboxilasas (PCC, PC ó MCC) y evaluar la respuesta de estas enzimas a diferentes concentraciones de biotina en linfocitos y fibroblastos. La concentración con la cual obtuvieron una mayor estimulación fue  $10^{-8}$ M (Suormala, 1985).

## ESTUDIOS EN SUJETOS CLINICAMENTE SANOS

Con el fin de tener valores normales con los cuales poder comparar a los pacientes estudiados, se obtuvo muestra de sangre y de orina de 9 personas clínicamente sanas (4 mujeres y 5 hombres), cuyas edades estaban entre 16 y 38 años, así como 19 muestras de donadores del Banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla y las unidades correspondientes son:

Biotina en plasma: ng de biotina  $\text{ml}^{-1}$

Biotina en orina: ng de biotina  $\text{mg creatinina}^{-1}$

PCC y PC: pmoles de  $^{14}\text{CO}_2$  fijado  $\text{minuto}^{-1}$   $\text{mg de proteína}^{-1}$

Cinc en plasma y orina: ng de cinc  $\text{ml}^{-1}$

Biotinidasas: nmoles de PABA liberado  $\text{minuto}^{-1}$   $\text{ml plasma}^{-1}$

Los resultados se presentan utilizando pruebas de estadística no paramétrica, principalmente percentilas ( $P_{25}$ ,  $P_{50}$  y  $P_{75}$ ) que indican que en el grupo estudiado el 25, 50 ó 75% de los individuos va a tener ese valor ó menos.

La prueba de la probabilidad exacta de Fisher determina si la diferencia entre los grupos que se comparan es significativa ( $p \leq 0.05$ ) (Siegel, 1986).

## DISTRIBUCION PORCENTUAL DE DONADORES NORMALES

	P <sub>25</sub>	P <sub>50</sub>	P <sub>75</sub>	n
Biotina en plasma	4.85	5.60	7.40	9
Biotina en orina	161.12	276.30	484.26	9
PCC	195.00	222.50	300.55	9
PC	16.70	22.05	33.30	6
I.A de PCC	0.51	0.58	0.96	9
I.A de PC	0.82	1.01	1.20	6
Cinc en plasma	0.50	0.58	0.64	9
Cinc en orina	4.01	5.25	8.76	8
Biotinidasa	5.35	6.93	10.0	19

ESTUDIO DE PACIENTES CON MANIFESTACIONES CLINICAS  
SUGESTIVAS DE DEFICIENCIA DE BIOTINA (GRUPO A)

Este grupo estaba integrado por pacientes con alimentación parenteral total (APT) en el momento en que se inició el estudio, se les tomó muestra de sangre y orina, por presentar manifestaciones de deficiencia de biotina y cuatro meses después de que tenían un aporte de esta vitamina en su dieta ó en la solución parenteral, los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

P = Pacientes

N = Normales

ANTES DE LA ADMINISTRACION DE BIOTINA

		P <sub>25</sub>	P <sub>50</sub>	P <sub>75</sub>	n
Biotina en plasma	P	0.23	0.5	0.98	5
	N	4.85	5.6	7.40	9
Biotina en orina	P	7.13	22.00	84.38	5
	N	161.12	276.3	484.26	9
PCC	P	1.65	3.50	13.70	5
	N	195.00	222.50	300.55	9
Cinc en plasma	P	0.18	0.38	0.49	5
	N	0.50	0.58	0.64	9
Cinc en orina	P	5.49	25.40	32.03	5
	N	4.01	5.25	8.76	8

## DESPUES DE ADMINISTRAR BIOTINA

		P <sub>25</sub>	P <sub>50</sub>	P <sub>75</sub>	n
Biotina en plasma	P	8.45	9.00	11.50	3
	N	4.85	5.25	7.40	9
Biotina en orina	P	197.29	208.33	302.08	3
	N	161.12	276.30	484.26	9
PCC	P	106.40	106.90	135.45	3
	N	195.00	222.50	300.55	9
Cinc en plasma	P	0.49	0.50	0.56	3
	N	0.50	0.58	0.64	9
Cinc en orina	P	19.18	19.20	27.86	3
	N	4.01	5.25	8.76	8

### Análisis estadístico:

Para este análisis se compararon los valores de donadores sanos (normales) con los de pacientes antes de que recibieran biotina, con el fin de averiguar el estado de los parámetros evaluados cuando los pacientes ingresarán al estudio. Al realizar la comparación con los pacientes cuando recibieron la vitamina nos permitió conocer su recuperación.

En la prueba de probabilidad exacta de Fisher se tomó como punto de corte la  $P_{25}$  del primer valor que se menciona en la comparación.

#### Biotina en plasma:

Valores comparados	p estimada por la prueba de probabilidad exacta de Fisher	Significancia estadística
Normales y pacientes antes de administrar biotina.	0.01	Significativo
Pacientes antes y después de administrar biotina.	0.62	No significativo
Normales y pacientes después de administrar biotina.	0.54	No significativo

En el grupo A, cuando los pacientes ingresarán al estudio y presentaban síntomas de deficiencia de biotina, la

concentración de esta vitamina en plasma se encontraba disminuida significativamente en relación a los normales. Después de la administración de biotina su nivel en plasma aumentó hasta normalizarse aunque aparentemente en forma no significativa, este resultado estadístico se debe a que la cantidad de datos es reducida.

Biotina en orina:

Valores comparados	p estimada por la prueba de probabilidad exacta de Fisher	Significancia estadística
Normales y pacientes antes de administrar biotina.	0.01	Significativa
Pacientes antes y después de administrar biotina.	0.62	No significativa
Normales y pacientes después de administrar biotina.	0.54	No significativa

La cantidad de biotina en orina antes y después de la administración de esta vitamina fue significativamente menor a los niveles normales, posteriormente con la administración de biotina se normalizó su excreción. La diferencia entre la cantidad antes y después del suministro de la vitamina estadísticamente no es significativa.

**Propionil CoA Carboxilasa:**

Valores comparados	p estimada por la prueba de probabilidad exacta de Fisher	Significancia estadística
Normales y pacientes antes de administrar biotina.	0.01	Significativa
Pacientes antes y después de administrar biotina.	0.62	No significativa
Normales y pacientes después de administrar biotina.	0.04	Significativa

La actividad específica de la Propionil CoA Carboxilasa de los pacientes cuando no recibieron biotina fue menor que los normales, esta diferencia fue estadísticamente significativa, con la administración de biotina llegó a normalizarse. Al comparar la actividad de PCC antes y después del suministro de la vitamina existió un aumento, pero no es significativo, según la prueba de probabilidad exacta de Fisher, sin embargo si observamos los resultados, dicho aumento supera al 100%.

## Cinc en plasma:

Valores comparados	p estimada por la prueba de probabilidad exacta de Fisher	Significancia estadística
Normales y pacientes antes de administrar biotina.	0.05	No significativa
Pacientes antes y después de administrar biotina.	0.62	No significativa
Normales y pacientes después de administrar biotina.	0.21	No significativa

La cantidad de cinc en plasma permaneció muy cerca de los niveles normales y no tuvo cambios significativos antes y después de la administración de biotina.

## Cinc en orina:

Valores comparados	p estimada por la prueba de probabilidad exacta de Fisher	Significancia estadística
Normales y pacientes antes de administrar biotina.	0.02	Significativa
Pacientes antes y después de administrar biotina.	0.62	No significativa
Normales y pacientes después de administrar biotina.	0.54	No significativa

Cuando los pacientes ingresaron al estudio sin haber recibido biotina por un tiempo prolongado, la concentración de cinc en orina fué mayor a la de normales en forma significativa. Con la administración de esta vitamina aumentó su excreción y llega a niveles superiores a los normales pero no en forma significativa.

EFFECTOS DE LA SUSPENSION TEMPORAL DE BIOTINA Y DE LA REANUDACION DE SU ADMINISTRACION (GRUPO B)

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE BIOTINA EN PLASMA DURANTE EL ESTUDIO

	P <sub>25</sub>	P <sub>50</sub>	P <sub>75</sub>	n
Ingreso al estudio	5.40	8.20	12.10	4
Ultimo día sin biot. *	6.75	9.90	11.15	4
Fin del estudio††	6.20	10.10	11.20	4
Normales:	4.85	5.60	7.40	9

\* En promedio transcurrierón 33 días entre el ingreso al estudio y el último día sin la administración de biotina con un intervalo de 17 a 40 días.

\*\* En promedio transcurrierón 42 días entre el inicio de la administración de biotina y el final del estudio con un intervalo de 7 a 95 días.

#### Análisis estadístico:

Se utilizó la prueba de probabilidad exacta de Fisher tomando como punto de corte la  $P_{25}$  del primer valor que se menciona en los valores comparados. Los datos incluidos en esta prueba fueron: Normales y pacientes cuando ingresarón al estudio, con el fin de determinar el estado en que ingresan los pacientes.

Entre los mismos pacientes, cuando ingresarón y el último día sin biotina, esto nos permitió conocer la evolución de los parámetros estudiados en ausencia de esta vitamina.

Último día sin biotina y el fin del estudio, para saber si los parámetros evaluados se recuperan con la administración de biotina.

Normales y fin del estudio, con esta información pudimos determinar si los pacientes llegaron a normalizarse al final del estudio con la administración de la vitamina.

Valores comparados	p estimada por la prueba de probabilidad exacta de Fisher	Significancia estadística
Normales y pacientes cuando ingresaron al estudio.	0.50	No significativa
Ingreso y último día sin biotina.	0.57	No significativa
Último día sin biotina y fin del estudio.	0.57	No significativa
Normales y fin del estudio	0.50	No significativa

Cuando ingresaron los pacientes, la concentración de biotina en plasma se encontraba normal y no tuvo cambios significativos en el transcurso del estudio.

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA PROPIONIL COA CARBOXILASA  
(PCC) DURANTE EL ESTUDIO

	$P_{25}$	$P_{50}$	$P_{75}$	n
Ingreso al estudio	86.07	100.06	260.94	4
Ultimo dia sin biot.*	7.01	28.94	76.88	4
Fin del estudio**	115.67	166.14	183.16	4
Normales	195.00	222.50	300.55	9

Análisis estadístico:

Valores comparados	p estimada por la prueba de probabilidad exacta de Fisher	Significancia estadística
Normales y pacientes cuando ingresarón al estudio.	0.11	No significativa
Ingreso y último día sin biotina.	0.22	No significativa
Ultimo día sin biotina y fin del estudio.	0.50	No significativa
Normales y fin del estudio.	0.02	Significativa

Cuando ingresarón los pacientes al estudio, la actividad específica de la PCC se encontraba muy cercana a la normal, en ausencia de biotina disminuyó notablemente y posteriormente

aumentó sus valores cuando se les suministró la vitamina, estas diferencias, aunque son grandes, no son significativas estadísticamente, sin embargo el resultado de la prueba no paramétrica utilizada puede deberse a que los datos estudiados son pocos. Al finalizar el estudio, la actividad específica de los pacientes fue menor que la normal en forma significativa, esto nos indicó que los pacientes no se normalizaron con la administración de la vitamina.

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA PIRUVATO CARBOXILASA (PC)  
SEGUN EL ESTADO DE SALUD Y LA ADMINISTRACION DE BIOTINA

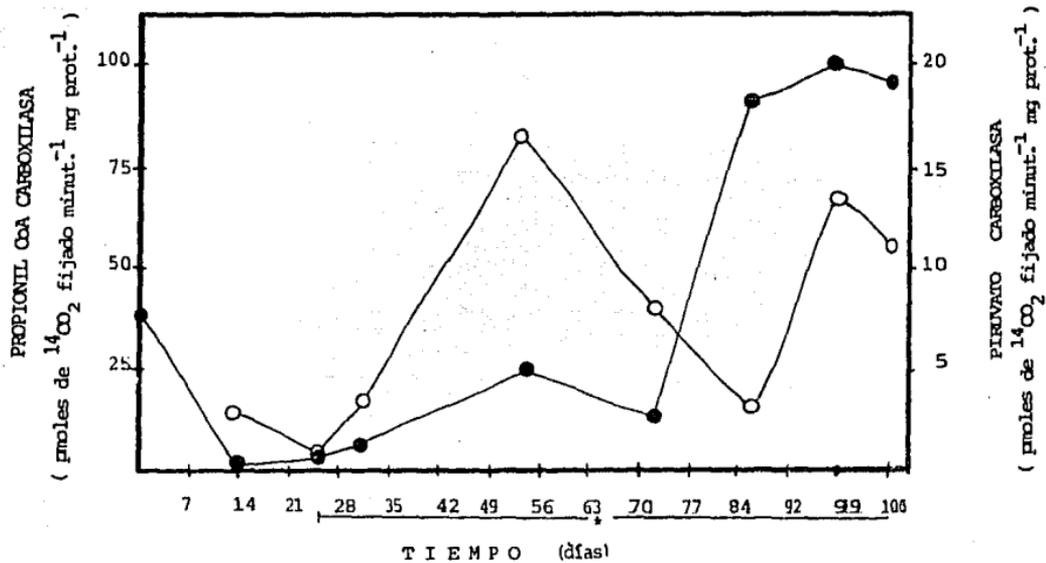
	P <sub>25</sub>	P <sub>50</sub>	P <sub>75</sub>	n
Ingreso al estudio	11.47	12.70	15.25	3
Ultimo dia sin biot.*	2.44	5.89	12.33	4
Fin del estudio**	7.58	13.22	24.65	4
Normales	16.70	22.05	30.30	6

## Análisis estadístico:

Valores comparados	p estimada por la prueba de probabilidad exacta de Fisher	Significancia estadística
Normales y pacientes cuando ingresarón al estudio.	0.35	No significativa
Ingreso y último día sin biotina.	0.34	No significativa
Último día sin biotina / fin del estudio.	0.34	No significativa
Normales y fin del estudio.	0.23	No significativa

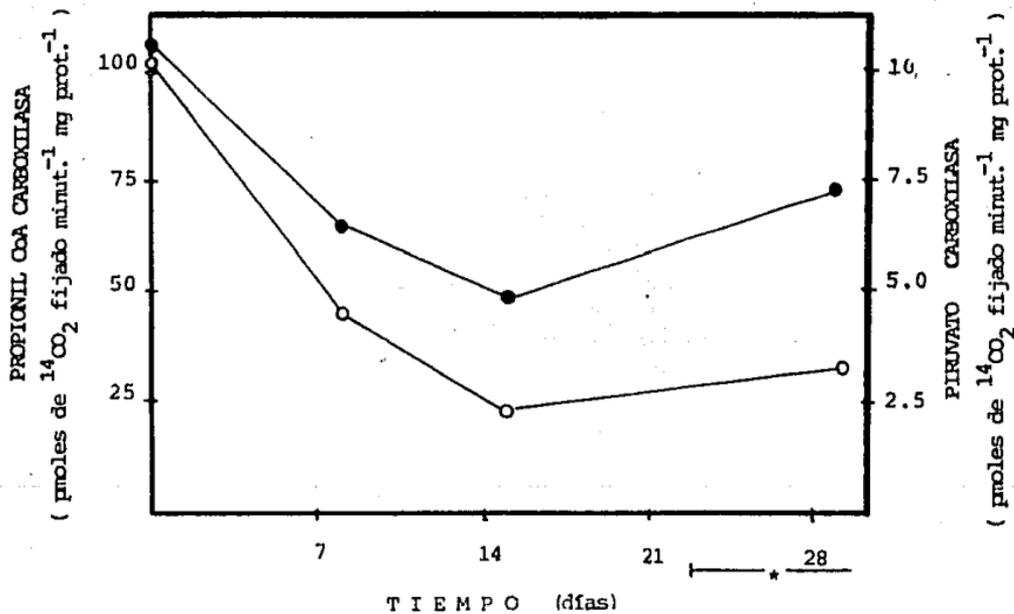
A: Ingresar los pacientes la actividad específica de la PC se encuentra muy cercana a los valores normales, en ausencia de biotina la actividad disminuyó y posteriormente aumentó con la administración de la vitamina, pero no llegó a recuperar sus valores iniciales. Todas las diferencias no son significativas.

La evolución de la actividad específica de la Propionil-CoA Carboxilasa y la Piruvato Carboxilasa durante el tiempo en que se estudió a cada uno de estos pacientes (APT-6, APT-7, APT-8 y APT-9), se puede observar claramente en las gráficas: R-4, R-5, R-6 y R-7, donde en general la actividad específica de la PCC y la PC disminuye en el periodo en que el paciente



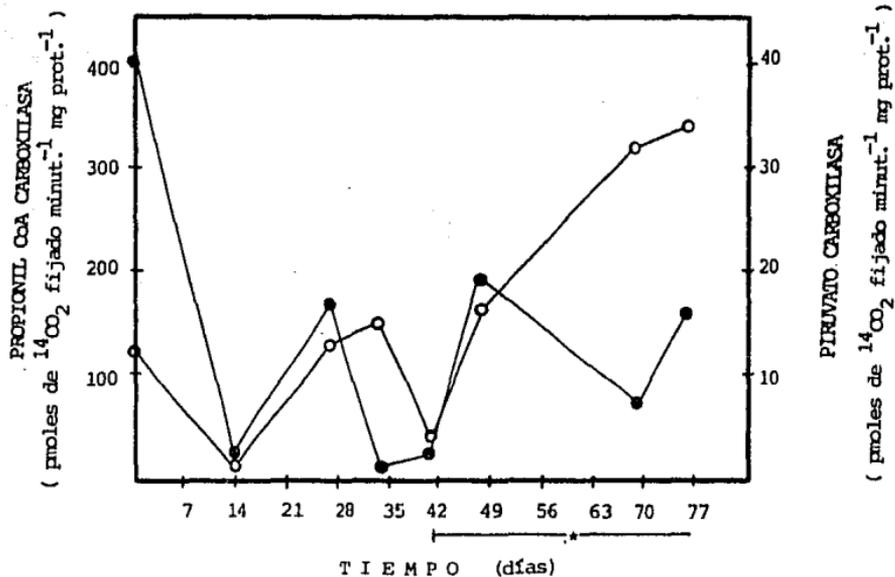
Gráfica R-4. Evolución de la actividad específica de la Propionil CoA Carboxilasa (●) y la Piruvato Carboxilasa (○) en el estudio del paciente APT-6.

Administración de biotina (\*)



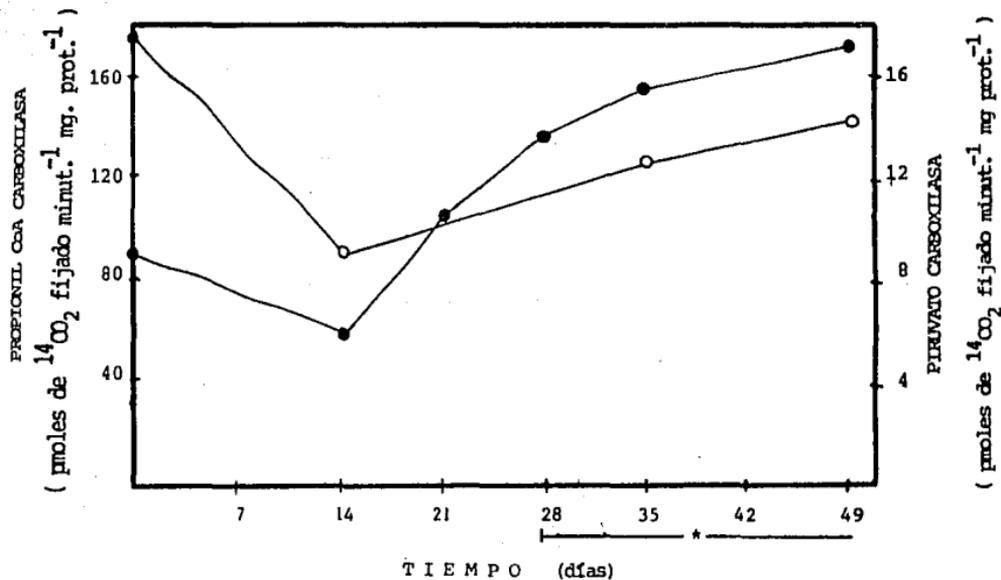
Gráfica R-5. Evolución de la actividad específica de la Propionil CoA Carboxilasa (●) y la Piruvato Carboxilasa (○) en el estudio del paciente APT-7.

Administración de biotina (\*)



Gráfica R-6. Evolución de la actividad específica de la Propionil CoA Carboxilasa (●) y la Piruvato Carboxilasa (○) en el estudio del paciente APT-8.

Administración de biotina (\*)



Gráfica R-7. Evolución de la actividad específica de la Propionil-CoA Carboxilasa (●) y la Pinuvato Carboxilasa (○) en el estudio del paciente APT-9.  
Administración de biotina (\*)

no recibe biotina y aumenta cuando se les suministra esta vitamina, sin llegar a normalizarse.

DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL INDICE ACTIVACION DE LA  
PROPIONIL COA CARBOXILASA (I.A PCC) DURANTE EL ESTUDIO

	P <sub>25</sub>	P <sub>50</sub>	P <sub>75</sub>	n
Ingreso al estudio	0.74	1.07	1.42	4
Ultimo día sin biot.*	1.95	2.48	2.65	4
Fin del estudio**	0.96	1.16	1.20	4
Normales	0.51	0.58	0.96	9

Análisis estadístico:

Valores comparados	p estimada por la prueba de probabilidad exacta de Fisher	Significancia estadística
Normales y pacientes cuando ingresaron al estudio.	0.46	No significativa
Ingreso y último día sin biotina.	0.50	No significativa
Ultimo día sin biotina y fin del estudio.	0.07	No significativa

Normales y fin del estudio.

0.46

No significativa

El índice de activación de la PCC fue normal cuando los pacientes ingresaron, aumentó cuando no se les administró biotina y se normalizó cuando recibieron esta vitamina. En todas las comparaciones de valores la diferencia no es significativa.

DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL INDICE DE ACTIVACION DE LA PIRUVATO CARBOXILASA (I.A PC) DURANTE EL ESTUDIO

	P <sub>25</sub>	P <sub>50</sub>	P <sub>75</sub>	n
Ingreso al estudio	0.99	1.04	1.77	3
Ultimo dia sin biot.*	0.66	0.78	0.98	4
Fin del estudio††	1.08	1.32	1.61	4
Normales	0.82	1.01	1.20	6

## Análisis estadístico:

Valores comparados	p estimada por la prueba de probabilidad exacta de Fisher	Significancia estadística
Normales y pacientes cuando ingresaron al estudio.	0.23	No significativa
Ingreso y último día sin biotina.	0.14	No significativa
Último día sin biotina y fin del estudio.	0.21	No significativa
Normales y fin del estudio.	0.16	No significativa

El comportamiento del índice de activación de la PC fue diferente al de FCC. Al ingresar los pacientes, el índice de activación fue normal, disminuyó cuando no recibieron biotina y posteriormente aumentó hasta normalizarse cuando se les administró esta vitamina.

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA CONCENTRACION DE CINC EN  
PLASMA DURANTE EL ESTUDIO

	$P_{25}$	$P_{50}$	$P_{75}$	n
Ingreso al estudio	0.55	0.60	0.68	4
Ultimo dia sin biot.*	0.50	0.56	0.61	4
Fin del estudio††	0.52	0.67	0.80	4
Normales	0.50	0.58	0.64	9

Análisis estadístico:

Valores comparados	p estimada por la prueba de probabilidad exacta de Fisher	Significancia estadística
Normales y pacientes cuando ingresaron al estudio.	0.50	No significativa
Ingreso y último día sin biotina.	0.57	No significativa
Ultimo dia sin biotina y fin del estudio.	0.57	No significativa
Normales y fin del estudio.	0.50	No significativa

Este oligoelemento se administró en la solución parenteral y su concentración en plasma se mantuvo normal durante el estudio.

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA ACTIVIDAD DE BIOTINIDASA CUANDO LOS PACIENTES PRESENTABAN ACTIVIDAD MAXIMA Y MINIMA DE SUS CARBOXILASAS

	P <sub>25</sub>	P <sub>50</sub>	P <sub>75</sub>	n
Actividad máxima	4.05	4.25	4.99	3
Actividad mínima	3.50	3.75	5.25	3
Normales	5.50	7.20	9.70	19

Análisis estadístico:

Valores comparados	p estimada por la prueba de probabilidad exacta de Fisher	Significancia estadística
Normales y pacientes cuando la actividad de sus carboxilasas fue máxima.	0.20	No significativa
Normales y pacientes cuando la actividad de sus carboxilasas fue mínima.	0.50	No significativa

La actividad de biotinidasa en los dos momentos en que se cuantificó (máxima y mínima actividad de las carboxilasas), no varió significativamente en relación a los normales.

## **DISCUSION Y CONCLUSIONES**

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

En los 5 pacientes del grupo A, que estaban ya con APT cuando se inició el estudio, (todos presentaban manifestaciones sugestivas de deficiencia de biotina), los parámetros dependientes de esta vitamina resultaron anormales:

La concentración de esta vitamina en plasma y orina disminuyó un 86.7 y 82.5% respectivamente en relación a los normales. Esto fue consecuencia de la ausencia de biotina en la alimentación parenteral que recibieron por tiempo prolongado.

Como resultado de la deficiencia de biotina en estos pacientes, la actividad de la Propionil CoA Carboxilasa disminuyó un 95.44% con respecto a los normales.

El cinc en plasma y orina no presentó diferencias significativas con respecto a los normales, por lo que se puede tener plena seguridad en que los síntomas observados en los pacientes son debidos a la deficiencia de biotina.

En este grupo existió una disminución drástica de los parámetros dependientes de biotinilina, por lo que en estos cuatro pacientes se pudieron observar síntomas de deficiencia de biotina como son alopecia, dermatitis y depresión. Esto no ocurrió con el otro grupo de pacientes (ver más adelante), ya que no se permitió que sus parámetros disminuyeran al nivel que se permitiera observar el cuadro clínico de deficiencia de biotina.

Con la administración de biotina, la concentración de esta vitamina en plasma y orina se normalizó. La Propionil CoA Carboxilasa aumentó su actividad, quedando solo 54.93% por debajo de la P<sub>75</sub> de los niños normales y el que no llegara a normalizarse se debió muy probablemente a que la dosis de biotina administrada no es la óptima y su recuperación es más lenta.

En los pacientes del grupo B, que se estudiaron desde su inicio de la alimentación parenteral total (APT-6, APT-7, APT-8 y APT-9), los parámetros determinados se comportaron de la siguiente forma:

La biotina en plasma se mantuvo dentro de los valores normales; no existieron diferencias significativas al ingreso, el último día sin biotina y al finalizar el estudio. Esto nos indica, como ya se ha reportado por otros autores, que la medición de muchas vitaminas en plasma, entre las que se incluye la biotina, no es confiable (Whitehead, 1985), ya que la concentración se altera por el contenido de proteínas plasmáticas y el volumen sanguíneo del paciente.

Por otro lado, el comportamiento de la Propionil CoA Carboxilasa fue diferente al de la biotina. Al ingresar los pacientes, la actividad específica de la Propionil CoA Carboxilasa se encontraba un 13.18% por debajo de la  $P_{75}$  de los controles (300.55 pmoles de  $^{14}CO_2$  fijado  $minut.^{-1}$   $mg$   $prot.^{-1}$ ). Al no administrarles biotina durante un periodo de 33 días en promedio, la actividad específica de esta carboxilasa disminuyó en un 70.54% del valor inicial y sólo en uno de estos pacientes (APT-6) se presentaron síntomas como: alopecia, dermatitis periorificial y depresión, causados por la deficiencia de biotina.

Posteriormente, con la administración de biotina, la actividad específica de esta carboxilasa aumentó paulativamente y en 42 días en promedio, llegó a recuperarse hasta un 67.89% con respecto a sus valores al ingresar y, en el caso de APT-6, los síntomas de deficiencia que tenía desaparecieron.

La actividad específica de la Piruvato Carboxilasa también disminuyó un 19.15% con respecto al valor inicial en el periodo en el que los pacientes no recibieron biotina y se fue recuperando con la administración de esta vitamina, pero no alcanzaron tampoco los valores normales cuando se finalizó el estudio de estos pacientes.

El hecho de que los pacientes no tuvieran valores normales de la actividad de sus carboxilasas cuando ingresaron a este estudio, se debió principalmente a que cuando llegaron al Hospital, habían tenido una serie de tratamientos y padecimientos anteriores que provocaron su desnutrición y/o pérdidas de biotina, ambas situaciones provocaron una disminución en la actividad de las carboxilasas dependientes de esta vitamina, sin embargo

al comparar sus actividades específicas con las de los normales no existieron diferencias significativas.

La dependencia de biotina por carboxilasas es muy clara al analizar las gráficas de evolución de la actividad específica de la Propionil CoA Carboxilasa y la Piruvato Carboxilasa con respecto al tiempo durante el cual se estudio a cada paciente (Graf.R-4, Graf.R-5, Graf.R-6 y Graf.R-7), ya que en el periodo en que no se administró biotina al paciente, la actividad disminuyó y posteriormente aumentó al proporcionarles esta vitamina.

En ambas carboxilasas no se recuperó su actividad hasta un valor normal debido probablemente a que la dosis de biotina y el tiempo de administración no son los óptimos para normalizar la actividad de estas enzimas en tiempos menores a 42 días. Por lo anterior se propone la realización de un estudio complementario a éste, el cual tendría entre sus objetivos el determinar la cantidad mínima de biotina necesaria para que no se afecten los parámetros bioquímicos dependientes de esta vitamina y en caso de pacientes con deficiencia, la dosis para lograr su recuperación en el menor tiempo posible.

El índice de activación se comportó de manera diferente en ambas carboxilasas. En la Propionil CoA Carboxilasa, aumentó hasta un 86.62% al no administrar biotina y disminuyó con la administración de esta vitamina.

El aumento en el índice de activación se atribuye a que al no proporcionar biotina al paciente, gran parte de sus carboxilasas se encuentran como apocarboxilasas, por lo que no presentan actividad y la que se determina en el laboratorio es baja debido a que solo algunas de estas enzimas aún conservan su cofactor. En el índice de activación se pretende proporcionar a las apoenzimas grandes cantidades de biotina para estimular su actividad con el fin de relacionar, mediante un cociente, la actividad estimulada con la basal, esto permite tener una idea de la avidez de las enzimas por la biotina, ya que conforme aumenta su actividad cuando se incuban los linfocitos en un medio rico en esta vitamina, el cociente de la actividad específica con biotina entre la de sin biotina, también aumenta y disminuye conforme el organismo tengan mayor cantidad de esta vitamina disponible para las enzimas.

En una persona sana se esperaría que el índice de estimulación fuera 1.0, ya que al tener cantidades normales de biotina en el organismo todas las carboxilasas ó la mayoría se encuentran activas y no requieren de más biotina, por lo que el aumento de su actividad sería muy poco ó nulo al incubar los linfocitos en un medio rico en esta vitamina.

Sin embargo existe algo de incertidumbre en la interpretación del índice de activación debido a que en normales, éste puede ser igual a 1.0 como se esperaba, pero en muchos casos su valor también puede ser menor, esto es consecuencia de que la actividad de la Propionil CoA Carboxilasa disminuye cuando se incuban los linfocitos en un medio con biotina (gráfica R-3).

El índice de activación de la Piruvato Carboxilasa se comportó de forma contraria al de la Propionil CoA Carboxilasa. El índice disminuyó a un 55.36% desde el valor inicial cuando no se les administró biotina a los pacientes, sugiriendo que sus apocarboxilasas al encontrarse en un medio rico en biotina, ésta no estimula su actividad por alguna circunstancia desconocida ó ejerza un efecto negativo por estar en exceso.

El índice de activación de la Piruvato Carboxilasa en varios donadores sanos no fue menor a 1 como se esperaba, esto se puede atribuir al desconocimiento de la forma en que se comporta la Piruvato Carboxilasa en diferentes concentraciones de biotina, ya que como se mencionó antes, existe la posibilidad de que la concentración utilizada de alguna forma inhiba en lugar de activar a la enzima.

Las variaciones en actividad de las carboxilasas de los controles, es debida a la variabilidad que existe entre los individuos y no a la metodología, ya que el coeficiente de variación inter e intraensayo es muy pequeño (12.13 y 5.61% respectivamente), por lo que la técnica utilizada es confiable

El cinc, como se esperaba, no sufrió cambios significativos. Se les administró continuamente este metal a los pacientes, manteniéndolos dentro de valores normales durante el estudio, esta fue una variable que era importante controlar ya que la deficiencia de este metal presenta un cuadro clínico muy parecido al de deficiencia biotina.

La biotinidasa, enzima que libera a la biotina del complejo biotina-lisina llamado biocitina, se encuentra dentro de los valores normales y no presenta diferencias significativas en su actividad, en la máxima y mínima actividad de las carboxilasas durante el estudio de los pacientes. Lo anterior nos permite suponer que la actividad de esta enzima no es consecuencia del status de biotina en el organismo.

Por todo lo antes expuesto podemos concluir que el estudio realizado con pacientes con alimentación parenteral total nos permitió contribuir al conocimiento del comportamiento que tienen parámetros descendientes de biotina, cuando se mantiene al paciente a. y con la administración de esta vitamina en su dieta parenteral.

De los parámetros bioquímicos estudiados el que refleja en forma más confiable el status de biotina en el organismo humano, es la actividad específica y el índice de activación de la Propionil CoA Carboxilasa.

## BIBLIOGRAFIA

1. Achuta, M. Mistry, SP: Synthesis of biotin dependant carboxylases from their apoproteins and biotin. Biochemical Reviews 43 : 1-10, 1972.
2. Atkin, B. and Utter, M: Pyruvate carboxylase deficiency and lactic acidosis in a retarded child without Leigh's disease. Pediat. Res. 13: 109-116, 1979.
3. Bartlett, K. and Leonard, J: A combined defect of three mitochondrial carboxylase presenting as biotin-responsive methylcrotonyl glucuronida and 3-methylisovaleric aciduria. Clin. Chim. Acta. 100: 183-188, 1980.
4. Bhagavan, H. and Coursin, D. J. Neurochem. 17: 289, 1970.
5. Bonjour, J., Hoffman, F: Biotin. Handbook of vitamins. La Roche N.J. 403-435, 1984.
6. Brunette, M. and Delvine, E: Thiamine-responsive lactic acidosis in a patient with deficient low Km pyruvate carboxylase activity in liver. Pediatrics 50 (5): 702-711, 1972.
7. Burri, B. Sweetman, L and Nyhan, W: Heterogeneity of holocarboxylase synthetase in patients with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. Am. J. Hum. Genet. 37: 224-237, 1985.
8. Donaldson, W: Biotin effects on fatty acid synthesis in chicks. Biotin, Ann. New York Academy of sciences 44: 105-111, 1965.
9. du Vigneaud, V. et al: On the structure of biotin. J. Am. Chem. Soc. 64: 188-189, 1942.
10. Feldman, B. and Wolf, B: Deficient acetyl CoA carboxylase activity in multiple carboxylase deficiency. Clin. Chim. Acta. 111: 147-151, 1981.
11. Finnio, M: Massive excretion of 2-oxo-glutaric acid and 3-hydroxyisovaleric acid in a patient with a deficiency of 3-methylcrotonyl CoA Carboxylase. Clin. Chim. Acta. 73: 515-519, 1975.
12. Fisher, G.; Byers, V.; Leving, A: Copper and zinc levels in serum from human patients with sarcomas. Cancer 37: 356, 1975.

13. Gartside, J.M; Allen, B.R: Treatment of acrodermatitis enteropathica with zinc sulphate. Brit.Med.J. 3: 521, 1975.
14. Greig, D.; Baker, J: Metabolic effects of total parenteral Nutrition. Ann. Rev. Nutr. 12: 179-199, 1982.
15. Goodridge, A: Regulation of The activity of acetyl coenzyme A carboxylase by palmitoyl CoA and citrate. J. Biol. Chem. 247 (21): 8948-8952, 1972.
16. Goodman, L. Gilman, A: Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 5a ed. México, Edit. Interamericana, 1978.
17. Grover, W: Biochemical studies and therapy in subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh's syndrome). J. Pediatrics. 81 (1): 39-44, 1972.
18. György, P: Attempts to isolate the anti-egg injury factor (vitamin B<sub>12</sub>). J. Biol. Chem. 119, 1937.
19. György, P: The curative factor (vitam. H) for egg white injury, with particular reference to its presence in different foodstuffs and in yeast. J. Biol. Chem. 131: 733-744, 1939.
20. György, P. and Langer, B: The vitamins. 2a. ed. vol. 2. Sebrell and R.S.Harrys (eds.) Academic Press, New York, 261, 1968.
21. György, P. and Zilliken, W: Fermente Hormone, Vitamine. 3a ed., vol. 31. R. Ammann and W. Dirschner (eds.) George Thieme Verlag, Stuttgart. p.776, 1974.
22. Hanaka, L.; Reineke, L. and Martin D: J. Bacteriol. 100: 42, 1969.
23. Hankins, D.; Riella, M.; Scribner, B: Whole blood trace element concentrations during total parenteral nutrition. Surgery. 76: 574, 1974.
24. Harris, S. and Wolf, D: Synthetic biotin. Science 97: 447-448, 1943.
25. Haslsted, J.; Hossain, A.; Abadi, P: Zinc deficiency in man. Amer.J. Med. 53:277, 1972.
26. Haslsted, J.; Hossain, A.; Abadi, P: A conceptus of research on zinc requirements of man. J. Nutriol. 104: 345, 1974.

27. Ize-Lemache, L. Carrasco, A. et al: Alteraciones en el cinc y el cobre en pacientes en ayunas sometidos a nutrición parenteral. Arch. de Invest. Médica. 12(2): 241-251, 1981.
28. Lenhinger, A: Biología. 2a ed. Barcelona, Edit. Omega, 1979.
29. Lowry, D. and Rosenbrough, A: Protein measurements the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265, 1951.
30. Martín, D. Mayes, P: Biología de Harper. 10a ed. México, Edit. El Manual Moderno, 1978.
31. Mystry, S. and Dakshinamurti, K: Vitam. Horm. 22:1, 1964.
32. Mock, D. Delorimer, W. Liebman, L. et al: Biotin Deficiency: An Unusual Complication of Parenteral Alimentation. N. Engl. J. Med 304: B20-B23, 1981.
33. Mock, D. Baswell, D. Baker, H. et al: Biotin Deficiency Complicating Parenteral Alimentation: Diagnosis, Metabolic repercussions, an Treatment. Biotin. Ann. New York Academ. of Sciences 447: 314-334, 1985.
34. Murphy, J: Pyruvate carboxylase deficiency and alleged biochemical-caused Leigh's disease. Pediatrics, 68: 401-404, 1981.
35. Nyhan W: Clinical problems relating to biotin. Ann N.Y. Acad Sci. 447: 222-224, 1985.
36. Robinson, F: The vitamin co-factors of enzyme systems. New York, Pergamon Press, 497-533, 1966.
37. Sahagun, V. Alquicira A: Cuidados intensivos en el enfermo grave. México, Edit. Continental, 1982
38. Sander, J. and Packma, S: Brain pyruvate carboxylase and the pathophysiology of biotin-dependent diseases. Neurology. 32: 878-880, 1982.
39. Saudubray, J: Search for the biochemical basis of biotin dependent multiple carboxylases. Determination of biotin activation in cultured fibroblasts. Clin. Chim. Acta. 122: 241-248, 1981.
40. Sheila, M. Allardyce, D: Possible biotin deficiency in adults receiving long - term total parenteral nutrition. Am. Journal of Clinical Nutrition 37: 185-186, 1983.
41. Siegel: Estadística no paramétrica. México, Edit. Trillas, 1986.

42. Sourmala, T. Wick, H. et al: Rapid differential diagnosis of carboxylase deficiencies and evaluation for biotin responsiveness in a single blood sample. Clin. Chim. Acta. 145: 151-162, 1985.
43. Sydenstricker, V.; Siengal, S.; Briggs, A.; De Vaughn, N. and Isbell H: Observations on the "egg white injury" in man and its cure with a biotin concentrate. JAMA 118: 1199-1200, 1942.
44. Solomon, N: Zinc. Am. J. Clin-Nutr. 35: 1048-1075, 1982.
45. Stokke, O: Beta-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency: a new metabolic error in leucine degradation. Pediatric. 49: 726-735, 1972.
46. Sweetman, L: Clinical and metabolic abnormalities in a boy with dietary deficiency of biotin. Pediatric. 68: 553-558, 1981.
47. Tietz, N: Química Clínica Moderna. Mexico, Edit. Interamericana, 1981.
48. Velázquez, A. Prieto, E. Woratt, E. et al: Piruvato Carboxilasa Deficiencia que responde a biotina. Presentado en la Reunión Reglamentaria de la Asociación de Investigación Pediátrica, AC, Valle de Bravo, México 5 y 6 de Diciembre, 1980.
49. Völker, L. Uebers. Tierernährg. 5: 185, 1977.
50. West, P. Wilson, P: The relation of "coenzyme R" to biotin. Science 89: 607-608, 1939.
51. Whithead, C: Assessment of Biotin Deficiency in Animals. Biotin. Ann. New York Academy of Sciences. 447: 85-96, 1985.
52. Wolf, B. and Fieldman: The Biotin - Dependent Carboxylase. Am. J. Hum. Genet. 34: 699-716, 1982.
53. Wolf, B. Hsia, Y. Sweetman, L. et al: Propionic acidemia: a clinical update. J. Pediatric 68: 113-118, 1981.