

153
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS



**EFFECTO DE LA EDAD SOBRE INDICADORES DEL
ESTADO NUTRICIO DE BIOTINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ROCIO RODRIGUEZ MELENDEZ

MEXICO, D. F.

1993

**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.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	
Aspectos históricos	1
Distribución	4
Biotina y carboxilasas	4
Biotinilación y liberación de biotina	7
Deficiencia de biotina	8
ANTECEDENTES	11
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	
Sujetos	15
Aislamiento de linfocitos	16
Determinación de la concentración de biotina plasmática	17
Determinación de la actividad enzimática de las carboxilasas	22
Determinación de proteínas	24
Determinación de DNA	26
Determinación de la actividad de la biotinidasa	28
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Estructura de la Biotina	2
Fig. 2	Síntesis de Biotina en microorganismos	3
Fig. 3	Estructura de la Biotina unida a la lisina	5
Fig. 4	Vías metabólicas en las que actúan las 4 carboxilasas dependientes de Biotina	6
Fig. 5	Hidrólisis de Biocitina por la biotinidasa	9

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1	Comparación de la concentración de biotina plasmática entre niños y adultos	35
Gráfica 2	Concentración de biotina plasmática en niños de 0 a 73 meses de edad	36
Gráfica 3	Comparación de la actividad enzimática de la PCC de linfocitos entre niños y adultos en función de la concentración de proteínas	37
Gráfica 4	Actividad enzimática de la PCC de linfocitos en niños de 0 a 72 meses de edad en función de la concentración de proteínas	38
Gráfica 5	Actividad enzimática de la PC de linfocitos en niños de 0 a 72 meses de edad en función de la concentración de proteínas	39
Gráfica 6	Actividad enzimática de la PCC de linfocitos en niños de 0 a 72 meses de edad en función de la concentración de ADN	40
Gráfica 7	Actividad enzimática de la PC de linfocitos en niños de 0 a 72 meses de edad en función de la concentración de ADN	41
Gráfica 8	Actividad enzimática de la biotinidasa plasmática en niños de 0 a 73 meses de edad	42

RESUMEN

La biotina pertenece al grupo de las vitaminas hidrosolubles del complejo B. Bioquímicamente actúa como cofactor para las carboxilasas, enzimas que catalizan la incorporación de dióxido de carbono a varios sustratos formando compuestos carboxilados. Estas enzimas son: Piruvato Carboxilasa (PC), Acetil CoA Carboxilasa (ACC), Propionil CoA Carboxilasa y β -Metilcrotonil CoA Carboxilasa. Durante la degradación proteolítica normal de las carboxilasas, se producen péptidos biotinilados y biocitina, de los cuales se libera biotina por la acción de la biotinidasa.

Recientemente la Unidad de Genética de la Nutrición, reportó que los niños desnutridos tienen menor actividad de las carboxilasas mitocondriales en linfocitos y menor concentración de biotina plasmática que los controles sanos; sin embargo, los niños desnutridos tuvieron en promedio menor edad, por lo que decidimos estudiar si dichas diferencias eran debidas exclusivamente al estado nutricional o si también son afectadas por la edad. Adicionalmente consideramos conveniente determinar los valores normales de dichos parámetros en algunos niños y adultos de la población mexicana mismos que servirán como referencia para evaluar el estado funcional de esta vitamina. Para estos propósitos se determinaron los siguientes parámetros: 1) la concentración de biotina plasmática, 2) las actividades específicas de PCC y PC en linfocitos y 3) la actividad de la biotinidasa plasmática.

Los resultados que obtuvimos fueron: a) Los niños tuvieron una mayor concentración de biotina plasmática que los adultos. 2) Entre los niños de 20 meses o menos edad y los de 21 a 80 meses también presentaron diferentes concentraciones de biotina plasmática, aunque no significativas, de tal forma que los primeros tuvieron concentraciones más bajas que los niños de mayor edad. 3) La actividad específica de la PCC también presentó diferencias significativas con relación a la edad y 4) Las actividades enzimáticas de la PC y la biotinidasa no tuvieron diferencias respecto a la edad.

La concentración de la biotina plasmática mostró una gran variedad interindividual, lo cual era de esperarse si se consideran todos los factores que pueden modificar la concentración de la vitamina en plasma.

De las tres enzimas analizadas en este trabajo utilizando las mismas metodologías descritas por los grupos de investigación que también estudian el metabolismo de la biotina, sólo la actividad promedio de la biotinidasa fue diferente a la reportada por el Dr. Wolf (63% mayor). Con relación a las actividades de las carboxilasas en linfocitos se obtuvieron resultados muy semejantes a pesar de tratarse de poblaciones diferentes, de tal manera que la alta actividad de la biotinidasa pudiera reflejar diferencias de tipo étnico.

Dado que la PCC también estuvo afectada por la edad así como la biotina y esta enzima se considera actualmente un buen indicador del estado funcional de la vitamina, posiblemente la significancia de la biotina en plasma tenga un valor específico mayor al de que refleje simplemente los cambios en su ingesta reciente. Esta observación integral refuerza la propuesta sugerida para prolongar este estudio a individuos entre los 6 y 20 años de edad. El significado fisiológico de estas variaciones requiere de estudios más profundos para su explicación ya que pudieran representar mecanismos de regulación variables a la largo del desarrollo y maduración de los individuos.

48. Flotino, M. *et al.* Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. Ann Clin Lab Sci.(1971) 1:31
49. Báez, A. y Velázquez, A. Cuantificación de biotina. Manuscrito en preparación
50. March, S. *et al.* A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Anal. Biochem. (1974) 60:142-152
51. Sweetman, L. :Protocol miniaturized assay. Comunicación personal
52. Lowry, O. H. Protein measurements with folin phenol reagent. J Biol Chem (1951) 193:260.
53. Burton, K. A study of conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem J (1956) 62:315
54. Gilles, K. M. and Myers. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. Nature (1965) 266:4979
55. Schneider, W. C. Phosphorus of deoxypentose nucleic and pentose nucleic acids. J Biol Chem (1945) 161:293.
56. Castilla, S. y Cravioto, J. Pruebas estadísticas no paramétricas en estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud. Edit Trillas, México. (1990) Cap 3 :163-235.
57. Hoel, P. (Estadística elemental) CECSA. México, D.F. (1976) 387p
58. Dancis, J. The role of the placenta in fetal survival. Pediatr Clin N Am (1965) 12:447
59. Burry, B.J., Sweetman, L. and Nyhan, L. Mutant holocarboxilase syntetase: evidence for the enzyme defect in early infantile biotin-responsive multiple carboxilase deficiency. Am J Hum Genet. (1981) 34:590-601.
60. Gregory, S. *et al.* Effects of age and Biotin Status on postnatal development of plasma biotinidase activity in rats. Bioche Med Met Bio (1991).45:92-100.
61. Heard, G. ; B. Wolf *et al.* Neonatal screening for biotinidase deficiency: results of a 1 year pilot study. J Pediatr (1989) 108:40.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la biotina y la elucidación de su estructura, así como su papel en el metabolismo, comprende extensas investigaciones durante varias décadas. (1)

La historia se remonta hasta 1901 con algunos experimentos del microbiólogo belga E. Wildiers sobre el cultivo de levaduras, quien observó que estas células no solo requerían de sales y glucosa para su crecimiento, sino también de un factor esencial que provenía del mosto de cerveza. Este factor fue llamado "Bios" e inmediatamente empezaron los esfuerzos para su aislamiento. (2). En los siguientes 30 años, se encontró que bios era una mezcla de diferentes compuestos; el primero llamado bios I, fue más tarde identificado como meso-inositol; posteriormente se aisló el bios IIA que resultó ser ácido pantoténico y el tercer componente de la mezcla, el bios IIB, fue aislado por F. Kogl y B. Tonnis en 1936 a partir de yema de huevo, levaduras autolizadas y preparaciones de hígado. Este último aislamiento condujo a la primera cristalización de un nuevo factor al cual llamaron biotina. (3)

Las observaciones más notables que permitieron el descubrimiento de la biotina fueron: a) en 1898 F. Sternitz reportó la aparición de lesiones en la piel al alimentar ratas con huevos crudos, observó que este efecto desaparecía con un factor estable presente en el hígado y en las levaduras, el cual fue llamado vitamina H (por Hautt, que en alemán significa piel). b) en 1939, Gyorgy encontró que la vitamina H, era en realidad biotina (4). Poco después en 1941 E. Snell descubrió que la avidina era un inhibidor de la biotina y que ésta era la causante de la toxicidad de los huevos crudos.

La estructura de la biotina fue determinada en 1942 por Du Vigneaud y colaboradores (5) y confirmada en 1943 por S. Harris mediante experimentos de síntesis total y análisis de rayos X (6). Gracias a estos estudios se demostró que la biotina es el ácido (+)cis-hexahidro-2-oxo-1H-tieno (3,4)imidazol-4-valérico (Fig. 1)

Los primeros estudios sobre la biosíntesis de biotina fueron realizados en bacterias también por Du Vigneaud, quien mostró que en "*Corynebacterium diphtheriae*", la biotina puede ser reemplazada como factor de crecimiento por el ácido pimélico (7). Al mismo tiempo se encontró que la síntesis de biotina en "*Aspergillus niger*" es frecuentemente estimulada por el ácido pimélico. Desde entonces se postuló que este ácido participa en la biosíntesis de biotina en microorganismos. En la actualidad se sabe que los mamíferos no la biosintetizan (Fig. 2).

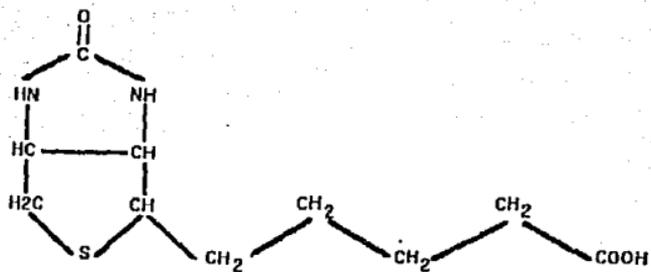


Figura 1. Estructura de la biotina

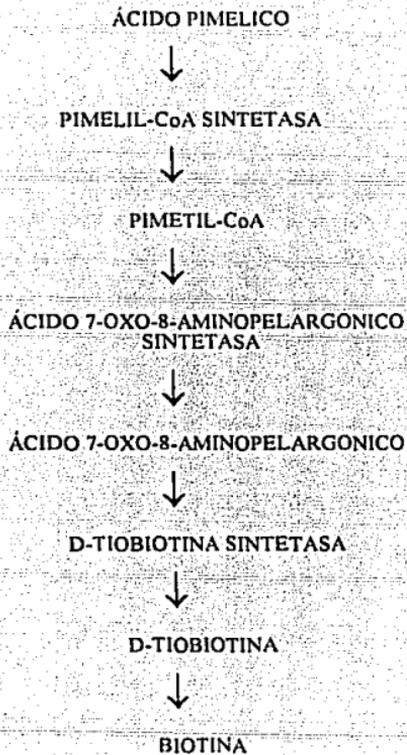


FIG. 2. BIOSÍNTESIS DE BIOTINA EN MICROORGANISMOS

DISTRIBUCIÓN

La biotina es un importante factor nutricional. Se han encontrado bajas concentraciones de esta vitamina respecto a las otras en plantas y tejidos animales y puede ser sintetizada por una amplia variedad de bacterias, incluyendo algunas del tracto gastrointestinal humano y de otras especies animales.

Se encuentra en forma libre en la leche, las frutas, la yema de huevo y algunas verduras; y unida a proteínas en tejidos animales como hígado, riñón, así como en cereales y levaduras, (8). Esta unión a proteínas es por medio de un enlace covalente entre el grupo carboxilo de la porción alifática de la biotina y el grupo épsilon-amino de la lisina; y el sitio de biotilación es altamente conservado con respecto a especies y enzimas. (9) (Fig 3). Esta unión requiere de una enzima llamada holocarboxilasa sintetasa (HS). La biotilación de las apocarboxilasas comprende al intermediario de biotinil adenilato seguido por la transferencia de biotina a la apocarboxilasa para producir la holocarboxilasa (10).

BIOTINA Y CARBOXILASAS

El papel más importante de la biotina es el de actuar como grupo prostético de diferentes enzimas. Las cuatro principales enzimas que contienen biotina son: Propionil Coenzima A carboxilasa (PCC), Piruvato carboxilasa (PC), β -Metilcrotonil-Coenzima A carboxilasa (MCC) y Acetil Coenzima A carboxilasa (ACC) (FIG. 4). La ACC es una enzima citosólica, mientras que las otras tres son mitocondriales. La biotina participa en el sitio activo de estas carboxilasas (9) funcionando como un acarreador de CO₂ que incorpora a los diferentes sustratos, siendo dicha incorporación dependiente de ATP (11).

La ACC cataliza la carboxilación de Acetil-CoA, que lleva a la formación de Malonil-CoA la cual es reconocida como intermediario en la fase reguladora de la lipogénesis y de la β -oxidación; por lo tanto también interviene en la génesis de la membrana celular. La ACC tiene una estructura compleja, sujeta a regulación alostérica, particularmente por el citrato; puede encontrarse en un estado protomérico, catalíticamente inactiva, y en estado polimérico, el cual es el estado activo de la enzima (12).

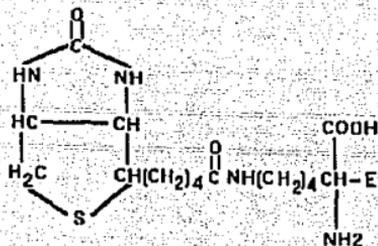


Figura 3. Estructura de la biotina unida covalentemente a un residuo de lisina de una carboxilasa (biocitina)

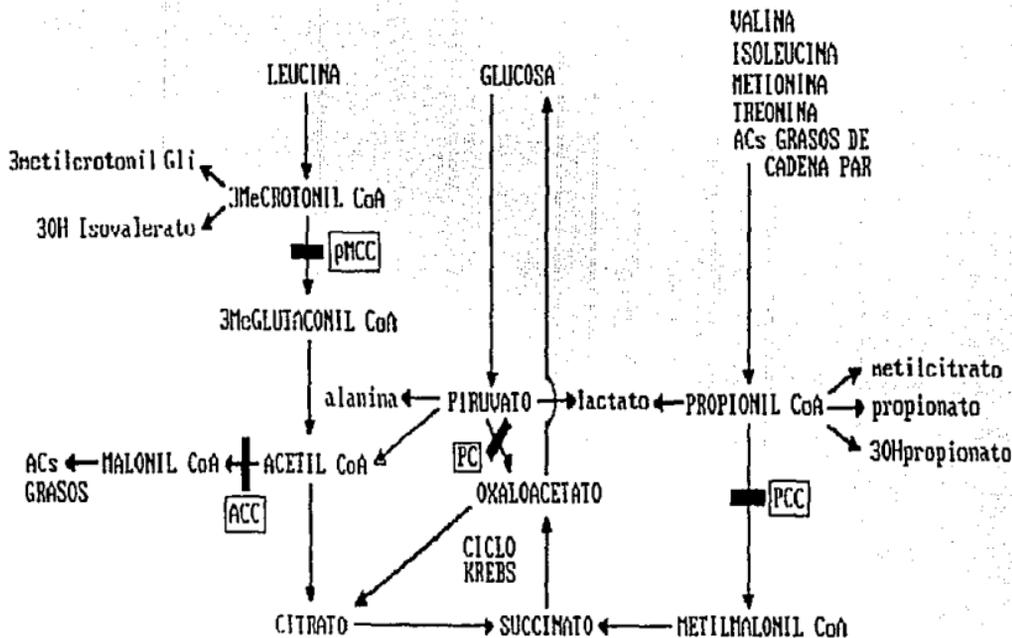


FIG. 4 VIAS METABOLICAS EN LAS QUE ACTUAN LAS 4 CARBOXILASAS DEPENDIENTES DE BIOTINA.

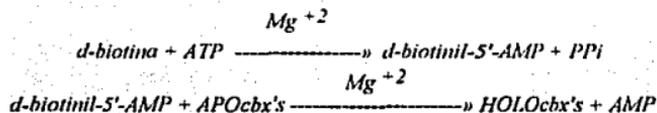
La PC es una enzima clave de la gluconeogénesis en el hígado y en el riñón, donde cataliza el primer paso de esta vía metabólica. Está también presente en tejidos lipogénicos (hígado, tejido adiposo, glándula mamaria y suprarrenal) en los que actúa en la síntesis de ácidos grasos participando en el transporte de la mitocondria al citosol de grupos acetilo vía citrato y de equivalentes reducidos vía malato (13). En todos los tejidos tiene un papel anaplerótico del ciclo de los ácidos tricarbóxicos al catalizar la formación de oxaloacetato. (14). Es una enzima tetramérica, compuesta de subunidades idénticas y cada polipéptido contiene una molécula de biotina.

La PCC cataliza la conversión de la propionil CoA a metilmalonil CoA, en la vía catabólica de los ácidos grasos de cadena impar, de los aminoácidos isoleucina, treonina, metionina y valina y del colesterol (15). En esta forma estos compuestos ingresan al ciclo de los ácidos tricarbóxicos vía succinil CoA. Ha sido aislada y purificada a partir de mitocondrias de riñón de res y de hígado humano. Es un tetrámero compuesto por dos subunidades no idénticas; la que tiene el peso molecular más elevado es la que tiene la molécula de biotina.

La MCC cataliza la conversión de la β-metilcrotonil-CoA a β-metilglutaconil-CoA, en la vía degradativa de leucina. La MCC está compuesta de dos subunidades no idénticas y al igual que la PCC, la subunidad mayor es la que está unida a la biotina (1).

BIOTINILACION Y LIBERACION DE LA BIOTINA

Las carboxilasas aquí arriba descritas son sintetizadas como apocarboxilasas, que carecen de actividad enzimática. Cada enzima es activa sólo cuando se encuentra unida covalentemente a la biotina y entonces es llamada holocarboxilasa. Este proceso llamado biotinilación requiere de una enzima que una la biotina a la apocarboxilasa y es conocida como holocarboxilasa sintetasa. Su mecanismo de reacción es el siguiente:



En el primer paso se lleva a cabo la formación de un intermediario de alta energía a partir de biotina, ATP y Mg^{+2} y después la transferencia del grupo biotínico a la apocarboxilasa formando la holocarboxilasa. (16)

Parece existir una sola holocarboxilasa sintetasa para todas las carboxilasas. Chiang y Mistry (17) fueron los primeros en demostrar que la sintetasa localizada en el citosol puede activar tanto a la apopiruvato carboxilasa (enzima mitocondrial) como a la apacetil CoA carboxilasa (enzima citosólica), sugiriendo que quizá pueda activar a todas las apocarboxilasas. Posteriormente se observó que en humanos, un defecto genético en la sintetasa resulta en deficiencia de todas las carboxilasas. (18)

La biotinidasa (biotina-amida aminohidrolasa) es la enzima que cataliza la hidrólisis del producto de degradación de las carboxilasas llamado biocitina (épsilon-n-biotinilisina); los productos de esta reacción son biotina y lisina (Fig 5). La biotina liberada de la biocitina es reutilizada por el organismo. Además, la biotinidasa participa en el aprovechamiento de la biotina proveniente de la dieta que, como se señaló anteriormente, en su mayor parte se encuentra unida a proteínas. Esta enzima fue descubierta en hígado de cerdo por Thomas y Peterson en 1954 (19). En el mismo año Wright (20) describió una enzima en plasma sanguíneo humano que hidrolizaba la biocitina y en 1963, Koivusalo y colaboradores purificaron la biotinidasa de "*Streptococcus faecalis*" (21). Más recientemente la biotinidasa ha sido purificada del plasma y suero humano, que es en donde se encuentra en mayor cantidad (22,23). La biotinidasa es una glicoproteína que contiene residuos de ácido siálico (23).

DEFICIENCIA DE BIOTINA

Se han descrito casos aislados de deficiencia en esta vitamina, a saber: 1) asociados a la ingesta de grandes cantidades de clara de huevo, la cual contiene avidina; 2) en humanos sometidos a alimentación parenteral total por tiempo prolongado, 3) humanos en hemodiálisis crónica (24) y 4) en personas afectadas por algunos errores innatos del metabolismo (25,26,27).

Cuando hay carencia de esta vitamina se establece una deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC), resultando bloqueos en la gluconeogénesis, anaplerosis del ciclo de Krebs, de la síntesis y elongación de los ácidos grasos y el catabolismo de varios aminoácidos y lípidos. Todos estos complejos trastornos metabólicos ocasionan manifestaciones clínicas graves que pueden llevar a la muerte.

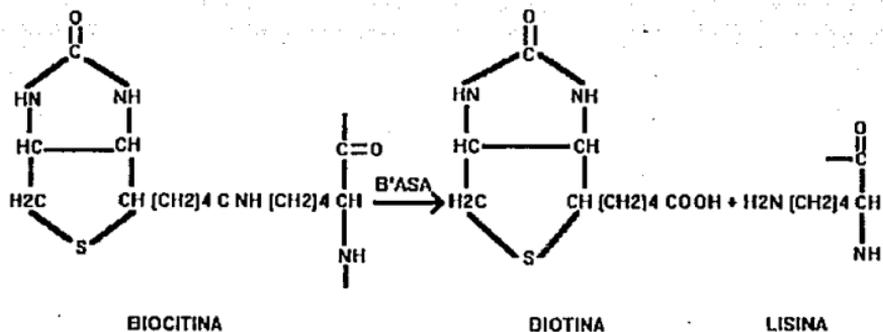


Figura 5. Hidrólisis de biocitina por biotinidasa

En el caso de humanos con deficiencia múltiple de carboxilas determinada genéticamente, se han descubierto dos clases de mutaciones: (25) en el gen de la holocarboxilasa sintetasa y en el de la biotinidasa. Estas mutaciones muestran una correlación del cuadro clínico según la edad en que se inicia, cerca del nacimiento, muy agudo y grave en la primera y de aparición más tardía y curso más crónico en la segunda (18,28,29,30). Los pacientes con deficiencia de biotinidasa no son capaces de reciclar la biotina endógena y degradar completamente las holocarboxilasas, acumulándose la biocitina (30). La sintomatología es muy similar a la que se observa en la deficiencia nutricional de biotina. En la deficiencia de holocarboxilasa sintetasa, de aparición generalmente neonatal, lo que predomina es una grave acidosis metabólica, rápido deterioro neurológico y frecuentemente la muerte en unos pocos días. Ambos tipos de DMC responden satisfactoriamente a la administración de grandes cantidades de biotina oral, con lo que desaparecen los síntomas clínicos. Se han descrito también deficiencias aisladas de cada una de las carboxilasas y para cada caso existen síntomas específicos. (25)

Recientemente en la Unidad de Genética de la Nutrición se estudiaron los trastornos metabólicos de niños con desnutrición energético-proteínica grave y se descubrió que muchos de estos pacientes tienen patrones metabólicos anormales, similares a los que se observan en enfermos con errores innatos del metabolismo por lo cual se propuso que la desnutrición es considerada como una fenocopia de algunos errores innatos del metabolismo. (31)

ANTECEDENTES

En los últimos años ha sido de gran importancia para la Unidad de Genética de la Nutrición, el estudio del metabolismo de la biotina en diversos estados nutricionales (desnutrición energético-proteínica, alimentación parenteral, mecanismos de su absorción intestinal, etc.).

En uno de estos estudios (32), se encontró menor actividad de las carboxilasas mitocondriales en linfocitos y menor concentración de biotina plasmática en niños desnutridos que en controles sanos, pero debido a que los desnutridos tuvieron en promedio menor edad que los controles se trató de determinar si estas diferencias eran debidas al estado nutricio o a la edad.

El indicador utilizado más comúnmente para conocer el estado nutricio de biotina en un individuo es su concentración en suero o en plasma (33,39), sin embargo esta concentración refleja solamente la ingesta más reciente de la vitamina (2), por lo que en animales se han utilizado las actividades de las carboxilasas hepáticas como indicadores más exactos de su estado funcional y en humanos las actividades de las carboxilasas en linfocitos periféricos (43).

Existen diferentes metodologías en la literatura (bioquímicas y microbiológicas) que se han utilizado para determinar la concentración de biotina; los valores reportados son diferentes, dependiendo del método de medición utilizado. Dentro de los ensayos microbiológicos, se emplean distintos microorganismos que utilizan únicamente biotina o además otros derivados de ella, como la biocitina, lo cual agrega otro factor de variación.

Cuadro I

INDIVIDUOS	[BIOTINA] nM	MICROORGANISMO
12 adultos	1.28 suero	<i>Ochromonas danica</i> (34)
89 adultos	1.58 plasma	<i>Lactobacillus plantarum</i> (35)
10 niños	2.86 plasma	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (36)
25 niños (< 5 meses)	4.78 suero	<i>Lactobacillus plantarum</i> (37)
Infantes	1.32 sangre completa	(38)
Adultos	1.05 sangre completa	(38)

Como puede observarse, las concentraciones normales de biotina en plasma varían mucho dependiendo del método de análisis empleado y del investigador. Esto es explicable, en parte, porque además de medir biotina, distintos microorganismos pueden reproducirse también con biocitina. En el caso de algunos ensayos microbiológicos, hay también compuestos potencialmente presentes que interfieren con la determinación, por ejemplo ácidos grasos.

Por otra parte, se reportaron dos trabajos en los que se cuantifican vitaminas (incluyendo biotina) en recién nacidos y en fetos (40,41). Ambos describen concentraciones plasmáticas de biotina mayores en los fetos y en los neonatos que en sus madres (cuadro 2).

Cuadro 2
Concentración de biotina plasmática

	Estudio 1	Estudio 2
Madres	1.82 nM	1.7nM
Fetos	2.58 nM	---
Neonatos	—	3.3 nM
Ref.	(41)	(40)

Finalmente Baker y colaboradores compararon la concentración sérica de varias vitaminas en niños de diferentes razas (42) habiendo encontrado que los de raza negra tienen un promedio más bajo de concentración de biotina, comparandola con los demás.

En la Unidad de Genética de la Nutrición se efectuó un estudio que mostró que en humanos la actividad de la PCC en los linfocitos es un indicador más sensible (y temprano) de deficiencia de biotina, que su concentración plasmática (43).

Las actividades de las carboxilasas en general se reportan en función de la cantidad de proteínas, sin embargo éstas podrían variar en diferentes condiciones nutricias por lo cual en este trabajo se determinarán en función a la concentración de ADN.

Otro parámetro determinado en plasma es la actividad de la biotinidasa que, como ya se describió, juega un papel fundamental en la disponibilidad de la biotina que se ingiere y se recicla como consecuencia del recambio de las carboxilasas. Las actividades de la biotinidasa que se han reportado, son constantes en individuos de diferentes edades y han utilizado diferentes métodos (cuadro 3)

Cuadro 3

MÉTODO	SUJETOS	PROMEDIO±D.E.	REFERENCIA
HPLC	niños (1-4años)	6.59±1.18*	(44)
Colorimétrico	niños	6.24±0.92	(29)
Colorimétrico	niños	5.80±0.89	(45)
Radioensayo	niños	5.50±0.90	(46)
Radioensayo	adultos	6.00±0.80	(46)

*nmol.

OBJETIVOS

1. DETERMINAR EL EFECTO QUE TIENE LA EDAD DE NIÑOS Y ADULTOS SANOS EN A) LA CONCENTRACIÓN DE BIOTINA LIBRE PLASMÁTICA; B) LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS ENZIMAS PROPIONIL CoA CARBOXILASA Y PIRUVATO CARBOXILASA EN LINFOCITOS Y C) LA ACTIVIDAD DE LA BIOTINIDASA PLASMÁTICA
2. CONOCER LOS VALORES NORMALES DE ESTOS PARÁMETROS EN LA POBLACIÓN MEXICANA

MATERIAL Y MÉTODOS

I. SUJETOS

El estudio se realizó en niños metabólicamente normales y bien nutridos, que acudieron al Instituto Nacional de Pediatría para cirugía electiva. El número total de niños fue de 40, cuyas edades fluctuaron entre 1 y 72 meses; 14 del sexo femenino y 26 del sexo masculino (ver sección de resultados). A cada uno se le extrajeron 4 ml de sangre periférica para realizar los ensayos enzimáticos y determinar la concentración de biotina. Estos niños fueron seleccionados por un médico de la especialidad de Pediatría en el Instituto Nacional de Pediatría. También se estudiaron 14 adultos sanos, trabajadores y estudiantes de la Unidad de Genética de la Nutrición, con edades de 21-30 años, 5 hombres y 9 mujeres. Para todas las determinaciones aquí realizadas, los sujetos se encontraban en ayuno de aproximadamente 8 horas en el momento de tomar la muestra.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Niños con algún padecimiento que requiere de cirugía electiva pero que no cause alteraciones metabólicas, en particular sobre biotina y cuyo peso corporal no sea menor del 90% del promedio para niños mexicanos de edad semejante. (47)

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Niños con cualquier enfermedad intercurrente y en especial aquellas en las que exista vómito, diarrea o fiebre.
- Niños que hayan ingerido preparaciones vitamínicas que contengan biotina en los últimos 3 meses.
- Aquellos niños que hubieran recibido transfusiones de sangre, plasma o paquete globular en los tres meses anteriores a la toma de la muestra.

2. EXTRACCIÓN DE PLASMA Y AISLAMIENTO DE LINFOCITOS A PARTIR DE SANGRE COMPLETA

Esta técnica fue necesaria para determinar la concentración de biotina, la actividad enzimática de la biotinidasa en plasma, y las actividades enzimáticas de las carboxilasas en células linfocitarias.

2.1 Reactivos

2.1.1 Anticoagulante (ACD) pH=5

Citrato trisódico (J.T.Baker)

Ácido cítrico (J.T.Baker)

Dextrosa anhidra (J.T.Baker)

Cloruro de Sodio (J.T.Baker)

2.1.2. Solución salina amortiguada con tris (TBS)

Tris-HCl (Sigma)

NaCl (J.T.Baker)

EDTA (J.T.Baker)

2.1.3. Ficoll-Hipaque

Diatrizoato de sodio (Sigma)

Ficoll F400 (Sigma)

2.2 Técnica

Los linfocitos se aislaron a partir de 3 ml de sangre venosa la cual se colocó en tubos de centrifuga de 15 ml con 380 μ l de anticoagulante (ACD), mezclándose suavemente. La muestra se centrifugó durante 10 min. a 1700 g, al término de ésta se retiró el plasma y se congeló en alícuotas para posteriores determinaciones de biotina y biotinidasa. Al paquete globular que quedó en el tubo se le adicionaron 45 ml de TBS a temperatura ambiente, evitando producir hemólisis.

En tubos de centrifuga de 15ml. se colocaron 4ml de Ficoll-Hipaque F400 (48) y sobre él se agregó lentamente la sangre diluida evitándose la mezcla. Al terminar de agregar la mezcla, se observaron dos fases, la inferior incolora (Ficoll) y la superior roja (sangre), se centrifugó durante 30 minutos. a 700 g.

Al término de la centrifugación se observaron en los tubos 4 fases, que en orden descendente fueron: a) TBS, linfocitos, Ficoll y eritrocitos. Posteriormente con una pipeta pasteur se retiró y desechó el TBS, hasta aproximadamente 0.5cm de la banda opaca de linfocitos, la cual se colectó y se transfirió a un tubo de centrifuga de 15 ml y se le agregó 10 ml de TBS, se mezcló suavemente y se centrifugó a 1700 g con el fin de concentrar en el fondo los linfocitos retirando después el sobrenadante, decantándolo y dejándolo escurrir 5 minutos sobre papel secante.

Una vez retirado el sobrenadante se adicionaron 300 μ l de agua helada para producir un choque hipotónico e hipotérmico y de esta manera lizar los eritrocitos remanentes, agitándose en vortex durante 30seg. Se agregaron 10ml. de TBS para seguir lavando y se centrifugó a 1700 g durante 10min.

Se retiró el sobrenadante y se recuperaron los linfocitos, se colocaron en tubos eppendorf y se centrifugaron. Se desechó el sobrenadante secándose posteriormente las paredes del tubo y con la boca del mismo hacia abajo. Se congelaron a -70°C en el ultracongelador hasta el día del ensayo enzimático.

3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOTINA PLASMÁTICA

Para medir la concentración de biotina plasmática se utilizó un método desarrollado en el laboratorio de Metabolismo y Requerimientos Nutricios de la Unidad de Genética de la Nutrición que se fundamenta en la competencia entre la biotina fría (¹HB) y biotina tritiada (³HB) por su unión a la avidina (49). Para separar la biotina radiactiva libre de la unida, se utilizó un anticuerpo anti-avidina acoplado a sepharosa.

3.1 Preparación de muestras

3.1.1 Reactivos

Alcohol etílico absoluto (J.T. Baker)

Amortiguador Tris-ácido bórico-EDTA-manitol pH=8 0.09 M (TBEM)

-Tris (Merk) 44.5 mM

-Ácido bórico 44.5 mM

-EDTA 1.0 mM

- Manitol 100 mM
- Azida de sodio 0.02%

3.1.2 Técnica

A las alícuotas de los plasmas por cuantificar se les agregaron 4 volúmenes de etanol absoluto, se mezclaron con vortex y se guardaron a -15°C por 24-48 hrs. Después de este tiempo, las muestras con etanol se centrifugaron a 6°C y 1500 rpm por 10min. Las fases etanólicas se decantaron a tubos de vidrio y se evaporaron hasta sequedad en un evaporador Savant. Los extractos secos se taparon con parafilm y se almacenaron a 6°C hasta el momento de su análisis.

Antes del ensayo, estos extractos se resuspendieron en un volumen de TBEM correspondiente al volumen original de la muestra.

3.2 Reactivos

3.2.1. Biotina tritiada (^3HB) 45 Ci/mmol, 1.0 mCi/mL (New England Nuclear Co.)

Con el propósito de trabajar con un material de pureza radioquímica elevada, cada vez que fue necesario, se purificaron alícuotas de $70\mu\text{Ci}$ de reactivo por cromatografía en placa fina de alta eficiencia, (Whatman LHP-KF cat. 4806-410) con el sistema benceno-metanol-acetona-ácido acético (70:20:5:5). Los eluados obtenidos se evaporaron a sequedad bajo corrientes de nitrógeno. Estos extractos secos de ^3HB se almacenaron a -10°C , y para el ensayo se resuspenden en 10 ml de TBEM para obtener 13,000 dpm/ $10\mu\text{l}$ (36pg de biotina).

3.2.2. Anticuerpo anti-avidina acoplado a sepharosa (Ab-Av-Sp)

La sepharosa 6B sin uniones cruzadas (Pharmacia fine chemicals) se activó con bromuro de cianógeno y se le acopló el anticuerpo anti-avidina según el método descrito por March *et al.* (50). La proteína acoplada a la sepharosa se almacenó en suspensión 1:1 (v/v) con NaCl 0.15 M y azida de sodio al 0.02 %.

3.2.3. Amortiguador Tris-ácido bórico-EDTA-manitol 0.09M (TBEM) (ver secc. 3.1.1.)

3.2.4. Avidina 40 μM (2.68 mg/7ml) en TBEM, Solución A concentrada se almacenó en alícuotas de 10 μl a -15°C . En el momento del ensayo se hizo una dilución 1:100 de la solución A en TBEM para obtener una concentración 400 nM (solución B), y por último se hizo una disolución 1:30 para obtener una concentración 13 nM (solución C).

3.2.5. Solución concentrada de biotina (^1HB) en TBEM 5mg/dl (solución A), de esta solución se partió para preparar la solución B, por una dilución 1:100 en TBEM, quedando de 500 ng/ml, la cual a su vez se diluyó 1:10 en TBEM para obtener una concentración 5ng/ml (solución C), por último se partió de la solución C para que por una dilución 1:5 en TBEM, se obtuviera la solución D, que contiene 1 pg de $^1\text{HB}/\mu\text{l}$. La solución A se almacenó a -10°C , mientras que la B,C,D, se almacenaron a 6°C .

3.2.6. Solución de Bray para centelleo líquido

- Naftaleno (J.T.Baker) 180g
- PPO (difeniloxazol) (New England) 12g
- Etilenglicol (Sigma) 60ml
- Metanol (J.T.Baker) 300ml
- Dioxano (J.T.Baker) cbp 3000ml

3.3 Técnica

Para la curva estandar, se agregaron diferentes volúmenes de las soluciones de trabajo de biotina fría, equivalentes a 10, 20, 40, 80, 160, y 320 pg (10, 20, 40, 80, 160 μl de solución D y 64 μl de solución C respectivamente), los que se ajustaron a 210 μl con TBEM. A este volumen se le agregó también un volumen de TBEM para alcanzar los 210 μl . Posteriormente a todos los tubos del ensayo se les adicionaron 10 μl de ^3HB y se agitaron perfectamente. De este modo se obtuvo una mezcla homogénea de las dos biotinas (^1HB y ^3HB) y cuando se inició la competencia, al agregar la avidina (solución C), no hubo gradientes de concentración que interfirieran con los resultados (Cuadro 4).

Cuadro 4

Tubos		B(μ l)	Muestra (μ l)	TBEM (μ l)	³ HB (μ l)	Avidina (μ l)
1,2	unión inespecífica	0(D)	0	220	10	0
3,4	unión máxima	0(D)	0	210	10	10
5,6	10pg ¹ HB	10(D)	0	200	10	10
7,8	20pg ¹ HB	20(D)	0	190	10	10
9,10	40pg ¹ HB	40(D)	0	170	10	1
11,12	80pg ¹ HB	80(D)	0	150	10	10
13,14	160pg ¹ HB	160(D)	0	130	10	10
15,16	320pg ¹ HB	64(C)	0	146	10	10
17.....	-----	0	variable	variable	10	10
.....	unión inespecífica muestras	0	variable	variable	10	0

(D) solución D de biotina fría

(C) solución C de biotina fría

El ensayo requirió que se midiera la unión inespecífica por lo que se prepararon tubos con muestra a los que no se les adicionó avidina, de tal modo que se permitiera determinar la cantidad de Ab-Av-Sp que se pegaba a moléculas diferentes a la avidina. Por otra parte también se midió la unión máxima que corresponde a los tubos a los que no se les agregó biotina fría pues se observó la cantidad máxima de ³HB que se pega a la avidina (Cuadro 4).

Una vez terminado este proceso, los tubos del ensayo se taparon e incubaron a 4° C (cuarto frío) con agitación (200rpm) por 24 hrs. Transcurrida la primera incubación se sacaron los tubos del cuarto frío, se destaparon y se les agregaron 60 μ l del anticuerpo anti-avidina acoplado a sepharosa (Ab-Av-Sp).

Este procedimiento se realizó con precaución, no se escurrió el Ab-Av.Sp por las paredes ya que se quedaban adheridas a éstas las esferas de sepharosa. Una vez agregado el complejo se incubó en las mismas condiciones anteriores.

Terminado el tiempo de la segunda incubación los tubos se centrifugaron a 150g por 5 min. Se tomó una alicuota de 150µl del sobrenadante y se colocó en 2.5ml de solución de Bray contenida en un vial. Posteriormente se pusieron a contar las muestras en un contador de centelleo líquido por 5 min.

3.4 Cálculos

Las desintegraciones por minuto (dpm) obtenidas correspondieron a la cantidad de ^3HB que no se unió a la avidina (biotina libre). Se graficó en papel "logit-log" colocando en el eje de las abscisas los pg de biotina fría y en el de las ordenadas el porcentaje de unión al que corresponden. La cantidad de ^3HB unida fue inversamente proporcional a la cantidad de biotina fría existente en la muestra.

Los valores obtenidos fueron corregidos por los valores de unión inespecífica y de unión máxima.

Procedimiento: Tubos 1,2

$$dpm\ 1,2 \times \text{volumen total alicuota contada} = dpm/13,000 \times 100 = \% \text{ de unión inespecífica}$$

$$\begin{aligned} \text{Tubos 3,4} \quad dpm\ 3,4 \cdot dpm\ 1,2 \times 100 &= \% \text{ de biotina libre} \\ \% \text{ de biotina libre} - 100 &= \% \text{ máximo de } ^3\text{HB unida} \end{aligned}$$

$$dpm\ C \text{ ó } M : dpm\ 1,2 \times 100 = \% \text{ } ^3\text{HB unida procedente de la muestra}$$

Curva Estandar (C) y muestras (M)

$$\begin{aligned} \text{cantidad máxima de } ^3\text{HB unida} & \frac{\quad}{\quad} 100\% \\ \text{cantidad de } ^3\text{HB de la muestra} & \frac{\quad}{\quad} X \end{aligned}$$

$X = \% \text{ corregido de } ^3\text{HB unida (cantidad a interpolar en la gráfica)}$

4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PCC Y PC

Para la medición de la actividad de las carboxilasas se utilizó el método reportado por Sweetman (51), por el cual se determina la incorporación de radiactividad proveniente de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ al sustrato de la enzima en estudio. De este modo, al actuar la PCC sobre la propionil CoA el producto será ^{14}C -metilmalonil CoA. El producto de la PC al actuar sobre piruvato es el ácido ^{14}C -oxaloacético el cual es inestable y es transformado al ácido ^{14}C -citrónico por la intervención de la citrato sintetasa añadida a la mezcla de reacción. El producto radiactivo es cuantificado en un contador de centelleo líquido, mientras que el bicarbonato radiactivo que no reaccionó es eliminado como $^{14}\text{CO}_2$

4.1 Reactivos

4.1.1 Solución amortiguadora concentrada de Tris 8X pH=8, 1,614 M

a. Tris (Sigma)	1M
b. MgCl_2 (J.T.Baker)	8mM
c. KCl (J.T.Baker)	600mM
d. EDTA (J.T.Baker)	6mM

4.1.2. N-propionil Coenzima A (PCoA) 40 mM

4.1.3. Acetil Coenzima A (AcCoA) 40mM

4.1.4. Solución concentrada TRIS + ATP + Glutatió reducido (GSH)

a. ATP (Sigma)	28.5 mM
b. GSH (Sigma)	20 mM
c. Tris 8X pH=8	

4.1.5. Piruvato de Sodio (Sigma) 40 mM

4.1.6. Citrato sintetasa (CS)(Sigma) 18.6 unidades/ml de piruvato de sodio

4.1.7. Ácido fórmico (Merck) 15% (v/v)

4.1.8. Bicarbonato de sodio radiactivo ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) (Amersham)

Actividad específica: 3.81 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.

Concentración: 0.12 M

4.1.9. Solución de Centelleo (Solución de Bray) Ver sección 3.2.6.

4.2 Técnica

El ensayo se realizó en tubos eppendorf previamente marcados para reconocer blancos y muestras de cada enzima, se les adicionó a cada tubo 10 μ l de la muestra de reacción correspondiente, manteniendo los tubos y las mezclas de reacción en hielo.

Las mezclas de reacción contienen los siguientes reactivos:

Cuadro 5

Reactivos	Blanco PCC(μ l)	PCC(μ l)	Blanco PC(μ l)	PC(μ l)
H ₂ O	20	65	10	--
ATP+GSH	10	65	10	65
CoA	--	65 PCoA	--	65 ACoA
C.S.	--	--	10	65
NaH*CO ₃	10	65	10	65
Vol. Total	40	260	40	260

Por otra parte, se descongelaron los linfocitos y se colocaron en hielo, se les agregaron 300 μ l de buffer de lisis y se resuspendieron con una pipeta pasteur. Para la liberación de las carboxilasas mitocondriales se procedió a romper los linfocitos por medio de sonicaciones descargando en cada tubo 30 pulsos de 1 segundo con un descanso intermedio. Se mantienen los tubos en hielo durante la sonicación.

Una vez que se tuvieron los tubos que contienen las mezclas de reacción, se les agregó 10 μ l del homogenado celular (linfocitos) sonificado a cada tubo, se mezclaron bien y se taparon para evitar la evaporación del bicarbonato. Se incubó en baño maria durante una hora a 30°C con agitación constante.

Posteriormente la reacción enzimática se detuvo incorporando los tubos en agua helada y añadiendo 10 μ l de ácido fórmico al 15%, se mezclaron bien y se dejaron reposar 15 minutos destapados. Mientras tanto se recortó papel whatman de 3 mm en tiras previamente divididas en cuadros de 2.5 cm x 2.0 cm y se marcaron con el número de cada tubo; se tomaron 30 μ l de la mezcla que hay en cada tubo y se depositaron en el centro de cada cuadro correspondiente a su mezcla.

Se secaron perfectamente con la ayuda de una pistola de aire durante 20 minutos aproximadamente y se le adicionaron 30 μ l de ácido fórmico al 15% a cada muestra y nuevamente se secó perfectamente durante 30 minutos.

Posteriormente se cortó el papel whatman dividiendo cada cuadro que corresponde a una muestra en 9 partes y se depositan en viales de vidrio que contienen un ml de metanol en dilución 1:1 con agua destilada para eluir la muestra y 7 ml de solución de Bray. Se agitó rigurosamente y enseguida se llevó a cabo la cuantificación. Se llevaron los viales al contador de centelleo líquido y se contaron 10 minutos con estandar externo.

La actividad específica de las carboxilasas se reportaron por mg de proteína y mg de ADN, por lo cual fué necesario medir estos dos parámetros en las células sonicadas.

5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de proteínas se hizo por el método descrito por Lowry (52), con el que se mide colorimétricamente la concentración de proteínas en el homogenado celular.

5.1 Reactivos

5.1.1. Carbonato de Sodio (J.T.Baker)	2.0% en NaOH 0.01N
5.1.2. Sulfato cúprico (J.T.Baker)	1.0%
5.1.3. Tartrato de Sodio y Potasio	2.0%
5.1.4. Albúmina Sérica Bovina	0.1% (se guarda en alícuotas a -70°C)

5.2 Técnica

5.2.1. Solución A

Carbonato de Sodio	2% en NaOH, 0.1 N	100 partes
Sulfato Cúprico	1%	1 parte
Tartrato de Sodio y Potasio	2%	1 parte

5.2.2 Solución B

Folin (Sigma)	50%
---------------	-----

Curva estandar

Cuadro 6

Tubos	Albúmina	Buffer	H ₂ O	Sol. A
B,B	0 (μl)	0 (μl)	500 (μl)	2.5 ml
1,1	10	30	460	2.5
2,2	20	30	450	2.5
3,3	25	30	445	2.5
4,4	30	30	440	2.5
5,5	40	30	430	2.5
6,6	45	30	425	2.5

MUESTRA EXPERIMENTAL

7,7	30 (M)	--	470	2.5
8,8	30	--	470	2.5
etc.				
.....	--	30	470	2.5

M=muestra

Para obtener la coloración que es proporcional a la cantidad de proteínas, después de 10 minutos se agregaron 250 μl de la solución B a todos los tubos, se dejaron reposando 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se leyó en el espectrofotómetro a 700 nm. El color es estable hasta por 2 horas.

Se graficó colocando en el eje de las abscisas los μg de albúmina (proteína) y en el eje de las ordenadas las lecturas de la densidad óptica. Se trazó la mejor recta con respecto a los puntos obtenidos y se interpolan las lecturas de las muestras.

6. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE ADN

Para cuantificar el ADN se siguió el método espectrofotométrico descrito por Burton (53) y modificado por Gilles y Myer (54) que consiste en romper en un medio ácido la unión entre purinas y desoxirribosa; esta última se hace reaccionar con la difenilamina que posteriormente puede ser cuantificable

6.1 Reactivos

6.1.1. Solución de ADN de Timo de Ternera (Merck) 250 µg/ml

6.1.2. Acido Perclórico (PCA) (J.T.Baker) 1 N

6.1.3. Difenilamina (Mallinckrodt) 4 % en ácido acético glacial (J.T.Baker)

6.2 Técnica

6.2.1. Extracción de ácidos nucleicos del homogenado celular

La técnica de extracción es una modificación hecha a la técnica de Schneider (55); se midió el volúmen total del homogenado celular con el que se disponía, se le añadió un onceavo de ácido perclórico absoluto, se mezcló bien y se incubó a 70°C durante 20 minutos. Una vez terminada la incubación se dejaron los tubos a temperatura ambiente hasta que se enfriaron y se centrifugaron 10 minutos a 1700 g. Se recuperó el volúmen máximo del sobrenadante el cuál contenía los ácidos nucleicos. Posteriormente se realizó la curva estandar (cuadro 7)

Curva estandar

Cuadro 7

Tubo	PCA 1N	ADN (250µg/ml)	Difenilamina
B,B	500 (µl)	0 (µl)	500 (µl)
1,1	490	10	500
2,2	480	20	500
3,3	470	30	500
4,4	460	40	500
5,5	450	50	500
6,6	440	60	500
7,7	430	70	500

MUESTRA EXPERIMENTAL

8,8	400	100 (MUESTRA)	500
9,9	40	100	500
.....			

Una vez que se agregó a cada tubo lo indicado aquí arriba, se colocaron bajo 3 lámparas de luz fluorescente de 20 watts (Solar TR/SD/LD). La exposición de los tubos a la luz se efectuó durante 4 horas a temperatura ambiente y a una distancia de 15 cm de las lámparas. Posteriormente se leyó en el espectrofotómetro de absorción a 595 y a 700 nm.

La razón por la cual se leyó a dos longitudes de onda es que el complejo que se forma en la reacción de la difenilamina tiene su máximo de absorción a 595-600 nm, careciendo de otra banda de absorción, y la absorción obtenida a 700 nm se estima que es debida a las impurezas presentes en la muestra. Por lo tanto, para corregir el valor de ADN obtenido para cada lectura, es necesario restarle el valor obtenido a 700 nm.

6.2.2. Cálculo para determinar la cantidad de ADN en homogenado celular.

Se graficaron en papel milimétrico los puntos obtenidos para la curva patrón colocando en el eje de las abscisas μg de ADN y en el eje de las ordenadas la absorbancia a 595 nm.

Se trazó la mejor recta respecto a los puntos obtenidos, se interpolaron las densidades ópticas obtenidas de cada muestra y se calculó la concentración de ADN. Una vez calculada esta cantidad, se dividió entre el volúmen del homogenado analizado y se calculó su concentración en mg de ADN por ml de homogenado.

7. CÁLCULOS DE LAS ACTIVIDADES ESPECÍFICAS DE LAS CARBOXILASAS

Con las concentraciones de proteínas y las concentraciones de ADN, las actividades específicas de las enzimas se calcularon de la siguiente manera:

$$\frac{\text{dpm} - \text{dpm blanco}}{60\text{min} \times 10 \mu\text{l homogenado}} \times \frac{1 \mu\text{C}}{2.22\text{E}6\text{dpm}} \times \frac{10 \mu\text{l homogenado}}{\text{mg proteina}} \times \frac{1000 \mu\text{g prot.}}{1 \text{mg prot.}} \times$$

$$\frac{1 \mu\text{mol}}{3.81 \mu\text{Ci}} \times \frac{1 \mu\text{mol}}{1\text{E}-6 \mu\text{mol}} = \text{pmol } ^{14}\text{CO}_2 \text{ fijadas/min} \times \text{mg de proteina}$$

El mismo procedimiento se sigue para calcular las actividades enzimáticas en función de ADN

8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA BIOTINIDASA

Para la determinación de la actividad de la biotinidasa se utilizó el método descrito por Wolf (29), con el que se mide espectrofotométricamente el ρ -aminobenzoato producido por el efecto de la biotinidasa del plasma sobre su sustrato artificial η -biotinil- ρ -aminobenzoato

8.1 Reactivos

8.1.1. Solución amortiguadora de Fosfato de Potasio	1M
8.1.2. Fosfato de Potasio Monobásico (J.T.Baker)	1M
8.1.3. Fosfato de Potasio Dibásico (J.T.Baker)	1M
8.1.4. Ácido etilendinitrotetracético (EDTA)	0.1M
8.1.5. Albúmina bovina (Sigma)	2.5 mg/ml
8.1.6. ρ -aminobenzoato (PAB)	1.5 mM
8.1.7. Ácido Tricloroacético (TCA) (J.T.baker)	30%
8.1.8. Ácido η -biotinil- ρ -aminobenzoato (Sigma)	0.3 μ M

8.2 Reacción de formación de color

8.2.1. Nitrito de Sodio	0.1 %
8.2.2. Sulfamato de amonio	0.5 %
8.2.3. Solución de hidroclorehidro-n-1-naftiletildiamino (HNED)	0.1%

8.3 Técnica

Curva estandar

Cuadro 8

Tubo	Amortiguador	EDTA	BSA	PAB	H2O
B,B	100 μ l	100 μ l	100 μ l	0 μ l	700 μ l
1,1	100	100	100	20	680
2,2	100	100	100	40	660
3,3	100	100	100	80	620
4,4	100	100	100	160	540

Después de adicionar a cada tubo lo indicado en el cuadro 8, se incubó por media hora a 37°C, enseguida se agregaron 100 µl de TCA al 30%; se mezcló y centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Del sobrenadante se tomaron 770 µl y se mezclaron con 230 µl de agua destilada, posteriormente se hizo la reacción para desarrollar color.

Reacción para formar color

1. Se agregó a cada tubo de ensayo 100 µl de solución de nitrato de sodio, se agitó y se dejó reposar 3 minutos.
2. Se agregó 100 µl de sulfamato de amonio a cada tubo. también se agitó y se esperó 3 minutos.
3. Finalmente se añadieron 100 µl de HNED, se agitó y esperó 10 minutos.
4. Se procedió posteriormente a la medición colorimétrica del *p* aminobenzoato liberado (546 nm)

Procesamiento de las muestras

Cuadro 9

Tubo	Amortiguador	EDTA	BSA	Sustrato	H2O
5,5	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	550 µl
6,6	"	"	"	"	"
7,7	"	"	"	"	"
.....	"	"	"	"	"

Después de adicionar lo indicado a cada tubo, se preincubó con agitación por 10 minutos a 37°C. Posteriormente se añadieron las diferentes muestras a cada tubo (50 µl de plasma) y se incubó por 30 minutos a 37°C. Se detuvo la reacción en agua helada y se añadió a cada tubo 100 µl de TCA, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Se tomaron 770 µl del sobrenadante y se mezcló con 230 µl de agua destilada. Se realizó la reacción para desarrollar color y se leyó en el espectrofotómetro a 546 nm.

Se graficó en papel milimétrico los puntos obtenidos para la curva patrón, colocando en el eje de las abscisas los nanomoles de PAB y en el eje de las ordenadas la absorbancia a 546 nm, se trazó la mejor recta respecto a los puntos obtenidos y se interpolaron las absorbancias de las muestras problema.

8.4 Cálculos para determinar la actividad específica de la biotinidasa

La actividad de la biotinidasa se reporta en nmol por minuto y por mililitro de plasma. Para obtener las nmol se interpola la lectura de la muestra en la gráfica de la curva estandar. Para obtener los minutos se divide entre el tiempo de incubación; y finalmente para obtener los ml se calcula por la cantidad de muestra que se adicionó.

$$\frac{\text{nmoles de PAB (muestra)}}{30 \text{ min} \times 50 \mu\text{l (plasma)}} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} = \frac{\text{nmoles de PAB (liberado)}}{\text{min} \times \text{ml de plasma}}$$

RESULTADOS

I. Datos de los sujetos participantes en este estudio en los cuales se aplicaron los criterios de inclusión y exclusión.

Cuadro 10

PACIENTE	EDAD (meses)	SEXO	DIAGNOSTICO
D.O.J.	03	M	Cirugía plástica
C.G.A.	03	F	Cardiopatía congénita
Z.A.I.	03	M	Hernia inguinal
E.P.A.	04	F	Cirugía plástica
A.G.R.	05	F	Labio paladar hendido
M.C.O.	06	M	Enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE)
P.S.A.	08	M	Reflujo vesico-uretral
F.M.F.	08	M	Labio y paladar hendido
P.M.O.	08	F	Hernia inguinal
C.M.S.	13	M	Ortopedia
M.S.E.	1184	F	Paladar hendido
M.P.L.	18	M	Malformación ano-rectal
A.P.O.	20	M	Catarata congénita
C.G.A.	23	F	Estrabismo
N.L.	25	M	Paladar hendido
H.R.I.	36	F	Circuncisión
C.G.I.	36	M	ERGE
M.C.M.	36	M	Estrabismo
L.G.	36	F	Hernia inguinal
H.R.F.	36	M	Hernia inguinal
L.J.J.	36	M	Quiptorquidia bilateral
Z.A.C.	43	M	Balanopostitis
O.G.O.	48	M	Hernia inguinal der.
M.L.A.	48	M	Otitis media serosa
R.P.I.	52	F	Paladar hendido
J.P.M.	54	M	Infección en vías urinarias de repetición
B.H.E.	72	F	Hipertrofia amigdalina
M.F.I.	08	F	Alteración en la deglución

2. CONCENTRACIÓN DE BIOTINA PLASMÁTICA EN LOS SUJETOS ESTUDIADOS

La concentración de biotina plasmática en los niños y adultos estudiados se encuentra en el cuadro 11. La concentración de biotina está expresada como nM \pm desviación estandar.

Cuadro 11

Sujetos	[Biotina]	Intervalo
Niños n=31	3.95 \pm 1.34 (34%)	2.0-7.2
Adultos n=14	2.16 \pm 0.80 (37%)	0.81-3.8

Como puede observarse, la biotina en el plasma de los adultos es menor que en el de los niños siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (gráfica 1). Adicionalmente los niños de 20 meses o menos tuvieron menor concentración de biotina (3.42 ± 1.01) que los de 21 a 80 meses (4.4 ± 1.5) (gráfica 2) y se observa que aunque hay correlación de 0.52 entre ambas variables existe una gran dispersión de los valores.

2.1 Análisis estadístico.

Por los valores obtenidos de sesgo y curtosis se pudo comprobar que los datos presentaban una distribución normal por lo cual se recurrió a pruebas paramétricas para su análisis. Para comprobar si en los dos grupos de estudio existían diferencias estadísticamente significativas en el parámetro aquí determinado se utilizó inicialmente la prueba F de fisher para confirmar la homogeneidad de varianzas; posteriormente se procesaron los datos con la prueba T de student y se obtuvo que sí existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel de significancia del 95%. (56,57)

3. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS CARBOXILASAS MITOCONDRIALES

En los cuadros 12 y 13 se presentan los resúmenes de las actividades específicas de la PCC y PC.

**Actividades específicas de las enzimas
(pmol de CO₂ fijadas por min⁻¹ por mg⁻¹ de proteína)**

Cuadro 12

Sujetos	PCC	Intervalo	PC	Intervalo
Adultos	254 ± 60 (23%) n=11	199-396	31.6 ± 9.2 (29%) n=10	22.5-48
Niños	325 ± 110 (34%) n=32	161-611	33.4 ± 12 (37%) n=29	19.8-65

**Actividades específicas de las enzimas
(pmol de CO₂ fijado por min⁻¹ por mg⁻¹ de ADN)**

Cuadro 13

Sujetos	PCC	Intervalo	PC	Intervalo
Adultos	1992 ± 741 (37%) n=13	1230-3369	407 ± 187 (46%) n=12	177-709
Niños	2014 ± 762 (38%) n=28	1001-3500	242 ± 103 (42%) n=26	133-486

En ambos cuadros se presenta el promedio de las actividades específicas de cada enzima ± la desviación estandar, el coeficiente de variación y el número de individuos.

Como puede observarse existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados para la actividad de la PCC expresada en función de proteínas; encontramos una mayor actividad en el grupo de niños que en el de adultos (gráfica 3). Dentro del grupo de los niños no hubieron diferencias significativas de la PCC (gráfica 4). La actividad específica de la PC no mostró un coeficiente de correlación (actividad expresada en proteínas) con respecto a la edad (gráfica 5). En ninguna de las dos enzimas se observaron diferencias significativas en función de ADN (gráfica 6 y 7).

Se reportan también las concentraciones de proteínas y ADN (Cuadro 14) en los homogenados de linfocitos y se puede observar que la proporción de ambos parámetros permanece constante en todos los sujetos estudiados.

Cuadro 14

Sujetos	[Proteínas]	[ADN]
Niños	1045 ± 330 (31%)	167 ± 56.8 (34%)
Adultos	925 ± 310 (33%)	189 ± 105 (56%)

En este cuadro se presenta el promedio \pm la desviación estandar y el coeficiente de variación. Ambas concentraciones se reportan en μg por mililitro de homogenado.

3.1 Análisis estadístico

Igualmente para este parámetro se pudo comprobar que sus valores se distribuían normalmente y por lo tanto también se utilizó la prueba de T de student una vez que se comprobó la homogeneidad de las varianzas. Solo para la PCC existió diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de estudio ($p < 0.05$), lo que para la PC no se observó.

4. ACTIVIDAD DE LA BIOTINIDASA PLASMÁTICA EN LOS SUJETOS ESTUDIADOS

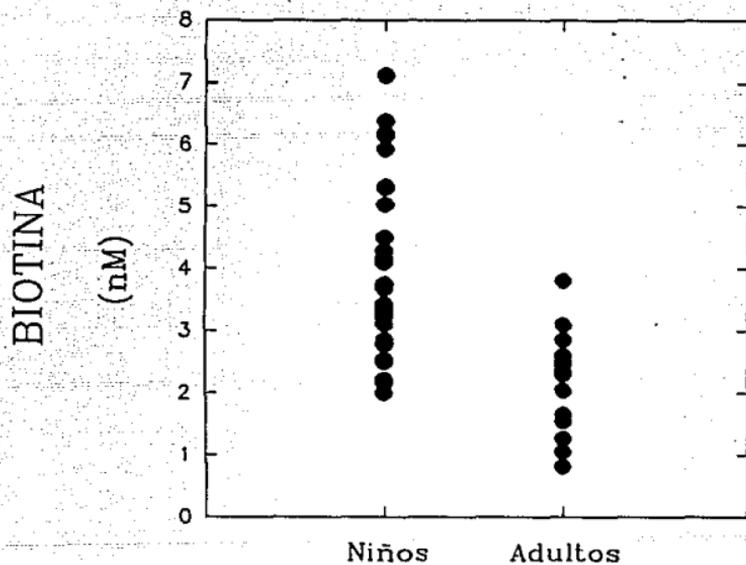
Los resultados obtenidos de la actividad de esta enzima en los grupos estudiados se presentan en el cuadro 15, donde la actividad específica de la enzima está expresada como nmol de producto formado por minuto y por ml de plasma.

Cuadro 15

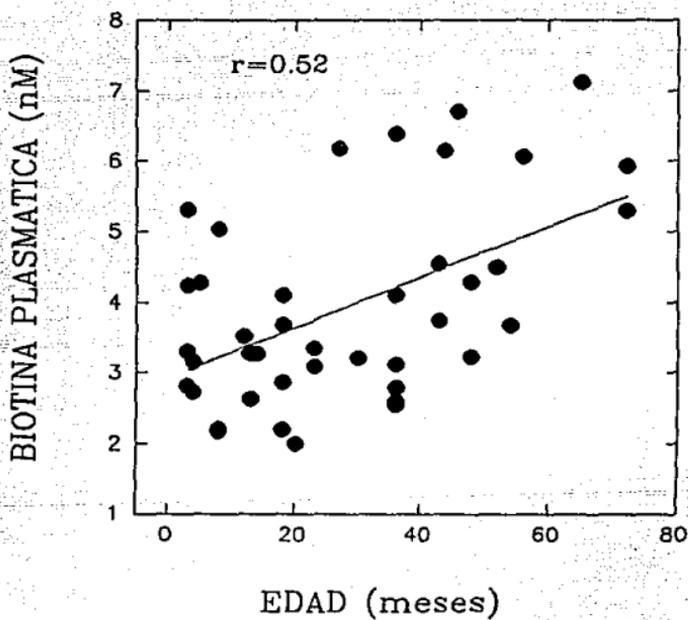
Sujetos	Actividad de la Biotinidasa	Intervalo
Niños n=32	9.78 ± 1.36 (14%)	7.40 -12.20
Adultos n=16	9.83 ± 1.28 (13%)	7.80-11.7

En el cuadro se presenta el promedio de la actividad de la biotinidasa \pm desviación estandar.

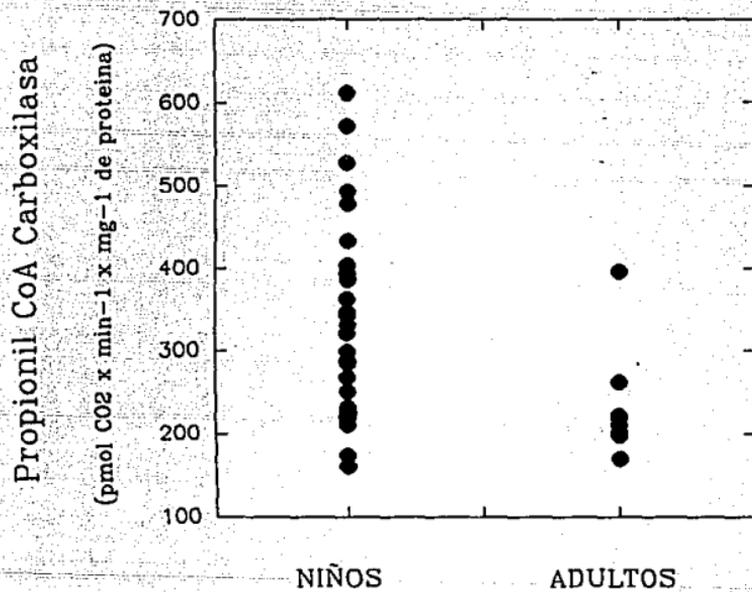
La actividad de la biotinidasa plasmática no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el grupo de niños y el de adultos así como tampoco en los niños no hubo una alta correlación con respecto a la edad (gráfica 8).



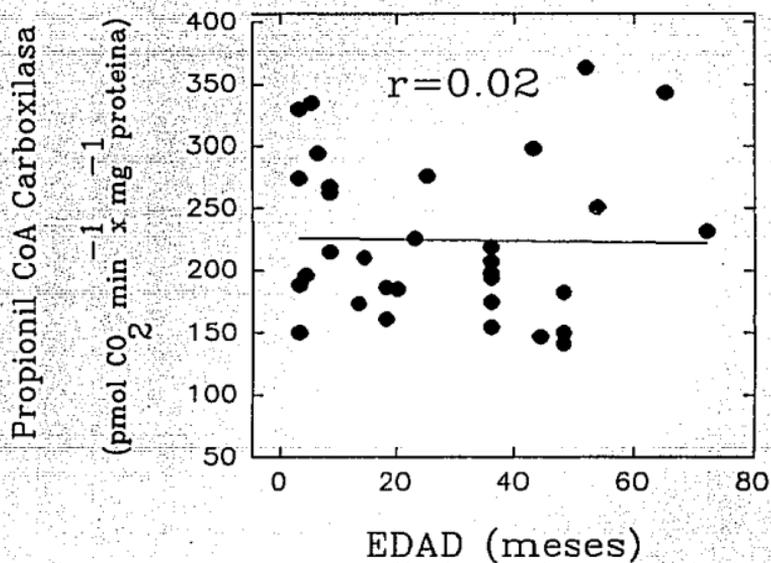
Gráfica 1. Comparación de la concentración de biotina plasmática en niños y adultos



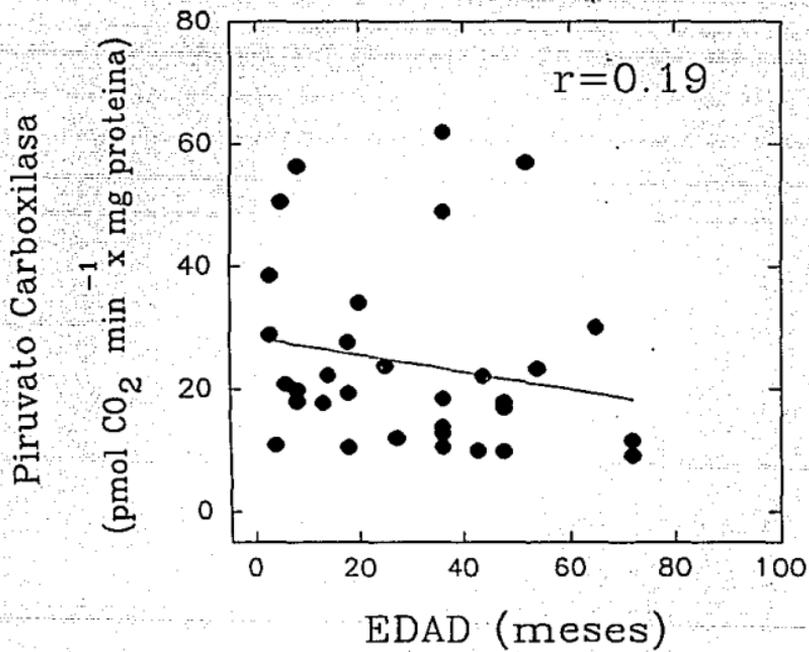
Gráfica 2. Concentración de biotina plasmática en niños de 0 a 72 meses



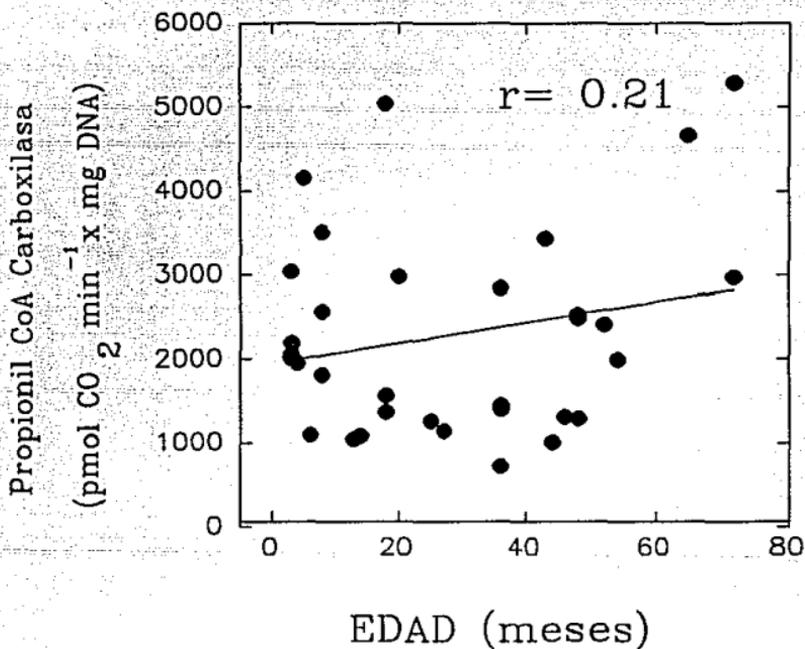
Gráfica 3. Comparación de la actividad enzimática de la PCC entre niños y adultos en función de la concentración de proteínas



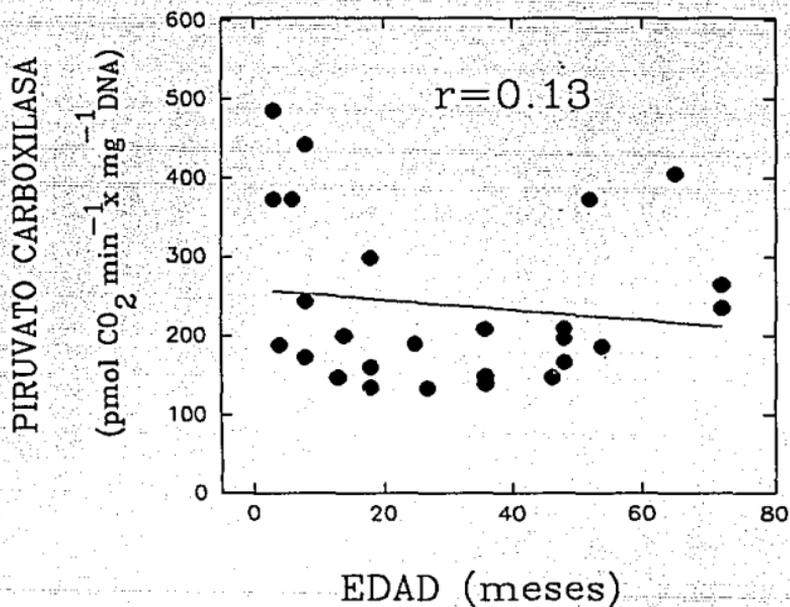
Gráfica 4. Actividad enzimática de la PCC en niños de 0 a 72 meses en función de proteína



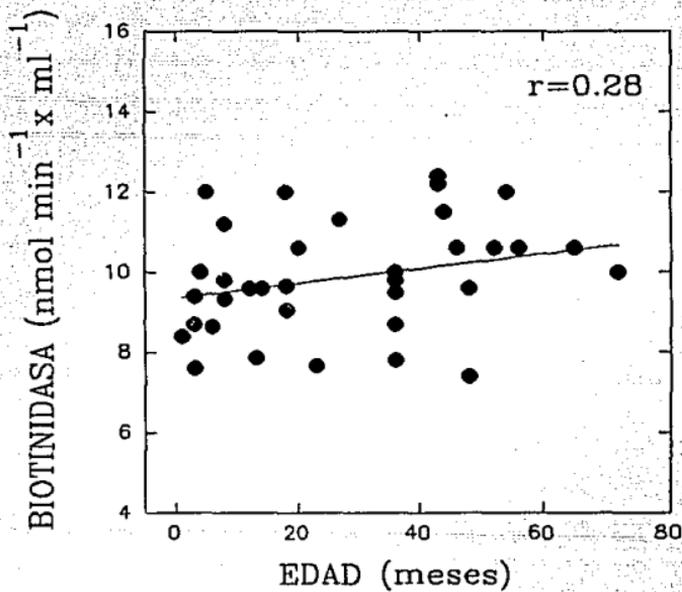
Gráfica 5. Actividad enzimática de la PC en niños de 0 a 72 meses de edad en función de la concentración de proteínas



Gráfica 6. Actividad enzimática de la PCC en niños de 0 a 72 meses de edad en función de la concentración de ADN



Gráfica 7. Actividad enzimática de la PC en niños de 0 a 72 meses de edad en función de la concentración de ADN



Gráfica 8. Actividad de la biotinidasa plasmática en niños de 0 a 72 meses de edad.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se muestra que de los parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo de biotina y estudiados en este trabajo, solo su concentración en el plasma y la actividad de la PCC en linfocitos están afectados por la edad. Adicionalmente se presentan los valores de dichos parámetros obtenidos en algunos individuos sanos mexicanos, lo cual nos servirá de utilidad como punto de referencia propio para evaluar el estado funcional de esta vitamina en sujetos con diferentes hábitos alimenticios.

Como puede verse en el cuadro 11, los niños tuvieron una concentración plasmática de biotina mayor que los adultos. Adicionalmente, entre los niños de 20 meses o menos edad y los de 21 a 80 meses también observamos diferencias; de tal forma que los primeros tuvieron una concentración más baja que los niños de mayor edad (gráfica 2). Pudiera ser que durante el desarrollo del individuo esta tendencia continúe y posteriormente se invierta en la edad adulta, lo cual sugiere la necesidad de estudiar también a sujetos de 6 a 20 años. Se observó también una gran variabilidad interindividual, lo cual era de esperarse si se consideraban todos los factores que pueden modificar la concentración de la vitamina en plasma (tipo de dieta en los días previos a la toma de sangre, condición del aparato digestivo, factores que influyen en la absorción intestinal, extracción de la biotina de la sangre por los tejidos, función renal, posibles proteínas transportadoras en la sangre, etc.).

Aunque la tendencia es, que en los niños la concentración de biotina en plasma sea mayor conforme mayor es la edad creemos que esto no invalida el resultado de nuestro trabajo previo (32), en el que encontramos que los desnutridos de 20 a 73 meses tenían un promedio de 57% más bajo que sus controles normales. Aunque estos últimos eran de mayor edad, la diferencia en la concentración de biotina entre ambos grupos fue mucho más grande que la observada en este trabajo (22% menor en los niños de 20 meses o menos).

Cabe aclarar que en el trabajo anterior ya mencionado (32), el método de análisis utilizado estaba basado en una comunicación personal (Thuy Le) que es muy diferente al método que actualmente describimos en este trabajo. En nuestros ensayos el método de Le no presentó linealidad con relación al volumen de plasma y por esta razón tuvimos la necesidad de implementar un método que sí pudiéramos validar.

El intervalo de concentración de biotina concuerda con las concentraciones reportadas por otros grupos de investigación ya mencionados en los antecedentes (ver pag.11). De la misma manera existen otros reportes (37,40,41) en los que consistentemente se observaron concentraciones más altas de biotina en fetos, neonatos e infantes (<5 meses) que en sus madres también estudiadas, no obstante que nuestro método de análisis no es microbiológico como en dichos trabajos.

El fenómeno de mayor concentración de nutrientes en el feto como consecuencia de transferencia placentaria, es bien conocido (58) y muestra la prioridad que en el binomio madre-feto tiene este último. De igual forma se ha reportado que muchas otras vitaminas cruzan la placenta y se acumulan en el feto en grandes concentraciones y por lo tanto en el momento del nacimiento los niños presentan una mayor concentración de vitaminas que la madre (41). esto ayuda a preparar al neonato para el proceso de desarrollo muy acelerado que tendrá en los primeros meses de vida.

Como anteriormente se mencionó, aunque durante muchos años se han considerado las concentraciones de vitaminas circulantes en la sangre como indicadores de su estado funcional, recientemente se ha reconocido que este parámetro refleja mas bien la ingesta reciente de la vitamina, (2) de tal forma que las diferencias observadas aquí pudieran no reflejar mecanismos de control diferentes.

La actividad de la PCC linfocitaria tuvo diferencias significativas respecto a la edad; sin embargo, esta diferencia no se observó para la PC de linfocitos ($p < 0.05$). Ver cuadro 12.

Con el propósito de evitar posibles variaciones de origen nutricional en la concentración de proteínas, las actividades específicas de las carboxilasas también las determinamos en función de la concentración de ADN. En nuestra investigación observamos que no hay diferencias en dichos parámetros de los homogenados linfocitarios en los dos grupos estudiados (cuadro 14).

La amplia dispersión en las actividades de las carboxilasas de los individuos estudiados es debido a la suma de las variabilidades que existen entre ellas y las metodologías.

Al igual que para la biotina plasmática, hasta donde nosotros sabemos no se han reportados en la literatura trabajos en los que se comparen las actividades de las carboxilasas en niños y adultos. Los valores que nosotros encontramos para estas enzimas utilizando el método de Sweetman (59) concuerda con los resultados arriba mencionados.

Sweetman, en comunicación personal (51) menciona que sus valores normales para adultos oscilan entre 156 y 348 pmol por min por mg de proteína para la PCC, con un promedio de 284 ± 61 (21%) y una $n=15$. Para la PC reporta un intervalo de 10 a 42 pmol por min por mg de proteína, con un promedio de 26 ± 8 y una $n=15$ (31%). Como se puede observar (cuadro 12) en este caso no existen diferencias de magnitud considerables a pesar de las diferencias étnicas.

La actividad de la biotinidasa no presentó diferencias significativas respecto a la edad ($p < 0.05$) en el grupo de niños, ni entre ellos y los adultos (cuadro 15). Hasta donde nosotros pudimos investigar no encontramos ningún reporte relacionado con la actividad de la biotinidasa sérica y la edad.

A diferencia de la concentración de biotina, la actividad de la biotinidasa es prácticamente igual en niños y adultos (cuadro 15). Cabe aclarar que aunque nosotros utilizamos el mismo método colorimétrico de Wolf, las actividades que encontramos en los individuos aquí estudiados tienen un valor promedio mayor (9.8 nmol/min/ml) que los reportados por el mismo investigador (29,56,57) usando igual o diferente metodología a la nuestra (6 nmol/min/ml)(cuadro 3). Estas diferencias pueden deberse a características propias de nuestra raza. No obstante que las actividades de la enzima reportadas para otras poblaciones sean menores que las que nosotros aquí presentamos, no existen diferencias en las actividades de niños o adultos. Sin embargo, en ratas se ha reportado que la actividad de la biotinidasa plasmática si cambia con la edad, se incrementa un poco después del nacimiento, con un pico alrededor del día 14 y disminuye después del día 21 a los niveles de las ratas adultas (60). Por otra parte, la actividad de la biotinidasa se incrementa de manera notoria desde el final de la gestación y el periodo neonatal hasta aproximadamente los dos primeros meses de vida en humanos. A partir de entonces alcanza los valores promedio de los niveles de los adultos (61), lo que concuerda con la gran constancia que nosotros observamos a edades más tardías. Se han reportado en la literatura diversos métodos para cuantificar biotinidasa, utilizando como controles a individuos de diferentes edades y obteniendo resultados similares a los nuestros. (cuadro 3).

De las tres enzimas estudiadas en este trabajo, utilizando las mismas metodologías descritas por los grupos de investigación que también estudian el metabolismo de biotina, solo la actividad de la biotinidasa fue diferente a la reportada en los trabajos del Dr. Wolf, como se mencionó previamente, el promedio de las actividades de la biotinidasa en nuestra población es 63% más alta que la de ellos. Con relación a las actividades en linfocitos se tuvieron resultados muy semejante a pesar de tratarse de poblaciones diferentes. Nosotros creemos que la diferencia en la actividad de la biotinidasa es de origen étnico y sería interesante estudiar las causas que la originan.

Con relación a la concentración de biotina plasmática, aunque nosotros utilizamos un método de competencia, nuestros valores se encuentran dentro de los intervalos de otros grupos que utilizan métodos microbiológicos (cuadro 1). Cabe aclarar que aunque el propósito de este trabajo no era estudiar diferencias con respecto al sexo, se efectuaron las pruebas estadísticas para este propósito, y aunque el número de individuos es muy pequeño no detectamos diferencias en ninguno de los parámetros.

Dado que la PCC también está afectada por la edad como la biotina, y esta enzima se considera actualmente como un mejor indicador del estado funcional de la vitamina, (43) posiblemente la significancia de la biotina en plasma tenga un valor específico mayor al de que refleje simplemente los cambios en su ingesta reciente. Esta observación integral refuerza la propuesta sugerida para prolongar este estudio a individuos entre los 6 y 20 años de edad.

El significado fisiológico de estas variaciones requiere de estudios más profundos para su explicación ya que pudieran representar mecanismos de regulación variables a lo largo del desarrollo y maduración de los individuos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dakshinamurti, K. and Chahuan J. Biotin Vitamins and hormones. (1989) 45:338.
2. Friedrich, W. Vitamins (Biotin). Walter de Gruyter. Berlin (1988) 753-805.
3. Kogl, F., Tonnis, B. Plant growth substance XX. The bios problem. Isolation of crystalline biotin from egg yolk. Physiol Chem (1936) 242:43-73.
4. Gyorgy, P. The curative factor (vit H) for egg withe injury, with particular reference to its presence in different foodstuffs and in yeast. J Biol Chem (1939) 131:733-744.
5. Du Vigneaud, V. *et al* On the structure of biotin. J Am Chem Soc (1942) 64:188-189.
6. Harris, S. and Wolf, D. Synthetic biotin. Science (1943) 97:447-448.
7. Du Vigneaud, V. *et al* Growth stimulating effect of biotin for dipteria bacillus in absence of pimelic acid. Science (1942) 96:183-187.
8. Hoffmann, La Roche. Vitamin Compendium (1980).
9. Moss, J. and M. Lane. The biotin-dependent enzymes. Adv Enzymol (1971) 35:321-441
10. Siegel, L. *et al* . Propionyl-CoA holocarboxilase synthesis from biotinyl adenylate and the apocarboxylase in the presence of an activating enzyme. Biochem Biophys Res Common (1965) 13:307-312
11. Bartlett, K. *et al* Enzyme studies in biotin-responsive disorders. J Inher Metab Dis 8 suppl (1985) 1:46-52.
12. Guckhait, R. , *et al* Acetyl coenzyme A carboxilase. Subunit structure of the protomeric form of the avian liver enzyme. J Biol Chem (1974) 249:4776-4780.
13. Ballard, F. and Hanson, R. The citrate cleavage pathway and lipogenesis in rat adipose tissue: replenishment of oxaloacetate. J Lipid Res (1967) 8:73-79.
14. Nakano, E. *et al* The identification of a serum viability factor for SV3T3 cells as biotin and its possible relationships to the maintenance of krebs cycle activity. Arch Biochem Biophys (1982) 215:556-563.
15. Rosenberg, L.E. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. 5th ed., Mc Graw Hill. New York. (1983) 474-479.
16. Achuta, M. and Mistry, S. Some aspects of biotin binding to protein catalized by biotin deficient chicken liver preparations. Proc Soc Exp Biol Med (1974) 145:564-570.

17. Chiang, G. S. and Mistry, S.D. A comparative study of pyruvate holocarboxylase synthesis in rat liver and kidney preparation. Int J Biochem (1975) 6:527-5531.
18. Saunders, M. E. and Sherwood, W.G. Evidence for a defect of holocarboxylase synthetase activity in cultured lymphoblasts from a patient with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. J Clin Invest. (1981) 68:1491-1495.
19. Thoma, R. W. and Peterson, W. H. The enzymatic degradation of soluble bound biotin. J Biol Chem (1954) 210:569-579.
20. Wright, L. *et al* Byocitinase, an enzyme concerned with hydrolytic cleavage of byocitin. Proc Soc Exp Biol Med (1954) 86:335-337.
21. Koivusalo, *et al* Bacterial biotinidase. J Biol Chem (1963) 238:1038-1042.
22. Craft, D. V.; Gross, N. H.; Chandramouli, N. Wood, H. G. Purification of biotinidase from human plasma and its activity on biotinyl peptides. Biochem (1985) 24:2471-2476.
23. Chauhan, J.; Dakshinamurti, K. Purification and characterization of human serum biotinidase. J Biol Chem (1986) 261:4268-4276.
24. Yatsidis, H. *et al* Biotin in the management of uremic neurologic disorders. Nephron (1984) 36:183-185
25. Nyhan, M. Inborn Errors of biotin metabolism. Arch Dermatol (1987) 123:1696-1698a.
26. Wolf, B.; Feldman, G. The biotin dependent carboxylase deficiencies. Am J Hum Genet. (1982) 34:699-716.
27. Sweetman, L. Two forms of biotin responsive multiple carboxylase deficiency. J Inher Metab Dis. (1981) 4:53-54.
28. Burry, B. J.; Sweetman, L.; Nyhan, W. Heterogeneity of holocarboxylase synthetase in patients with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. Am J. Hum Genet. (1985) 37:326-337.
29. Wolf, B.; Grier, R. E.; Parker, W. D. *et al* Biotinidase deficiency: The enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. Clin Chim Acta. (1983) 131:273-281.
30. Wolf, B. *et al* Deficient biotinidase activity in late onset multiple carboxylase deficiency. N Engl J Med. (1983) 308:161.
31. Velázquez A, Báez A, Gutierrez J, Terán M, Rodríguez R, Pérez Ortiz B. Metabolic and clinical consequences of biotin deficiency in protein-energy malnutrition. Eur J Clin Nutr Sometido a publicación.

32. Velázquez, A. *et al.* Biotin deficiency in protein-energy malnutrition. Eur J Clin Nutr (1988) 43:169-173.
33. Ping Wai Chan and K Bartlett. A new solid-phase assay for biotin and biocytin and its application to the study of patients with biotinidase deficiency. Clin Chim Acta (1986) 8:185-198.
34. Baker O, V. Frank, B. Matovitch, I. Pasher, A. Aaronson, S. H. Hutner, and H. Sobotka. Anal Biochem (1962) 3:31.
35. Bonjour, J. P. Int J Vitam Nutr Res (1977) 47:107.
36. Svecar J. and J. Homolka. Ann Pediatr (1950) 174:175.
37. Nisenson A. and Sherwin, J. Normal serum biotin levels in infants and adults: A modified assay method. Pediatr (1966) 69:134.
38. Bhagavan H. and D. Coursin. Biotin content of blood in normal infants and adults. Am J Clin Nutr (1967) 30:903-906.
39. Baker, H.; O. Frank, V. and B. Matovitch. A new assay method for biotin in blood, serum, urine and tissues. Anna Biochem (1962) 3:31.
40. Baker H. *et al* Vitamin profile of 174 mothers and newborns at parturition. Am J Clin Nutr (1975) 28:56-68.
41. Frank O. *et al* . Placental transfer: fetal retention of some vitamins. Am J Clin Nutr (1970) 23:659.
42. Baker, H. *et al.* Vitamins, Total cholesterol, and triglycerides in 642 New York City school children. Am J Clin Nutr (1967) 20:850-857.
43. Velázquez A, Zamudio S, Báez A, Munguía-Corral R, Rangel-Peniche B, Carrasco A. Indicators of biotin status: a study of patients on prolonged total parenteral nutrition. Eur J Clin Nutr (1990) 44_11-16.
44. Wolf, B. *et al.* Immunological comparison of biotinidase in serum from normal and biotinidase-deficient individuals. Clin Chim Acta (1989) 164:27-32.
45. Wolf, B. *et al.* Biotinidase deficiency: A novel vitamin recycling defect. J Inher Metab Dis (1985) 1:53-58.
46. Wolf, B. and J. Secor. A sensitive radioassay for biotinidase activity: deficient activity in tissues of serum biotinidase-deficient individuals. Clin Chim Acta (1983) 135:281.
47. Ramos-Galvan, R. *et al.* (Desnutrición en el niño) Hospital Infantil de México. Mex. D.F (1969) 610 p.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

48. Flotino, M. *et al.* Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. Ann Clin Lab Sci. (1971) 1:31
49. Báez, A. y Velázquez, A. Quantificación de biotina. Manuscrito en preparación
50. March, S. *et al.* A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Anal. Biochem. (1974) 60:142-152
51. Sweetman, L. :Protocol miniaturized assay. Comunicación personal
52. Lowry, O. H. Protein measurements with folin phenol reagent. J Biol Chem (1951) 193:260.
53. Burton, K. A study of conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem J (1956) 62:315
54. Gilles, K. M. and Myers. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. Nature (1965) 266:4979
55. Schneider, W. C. Phosphorus of deoxypentose nucleic and pentose nucleic acids. J Biol Chem (1945) 161:293.
56. Castilla, S. y Cravioto, J. Pruebas estadísticas no paramétricas en estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud. Edit Trillas, México. (1990) Cap 3 :163-235.
57. Hoel, P. (Estadística elemental) CECSA. México, D.F. (1976) 387p
58. Dancis, J. The role of the placenta in fetal survival. Pediatr Clin N Am (1965) 12:447
59. Burry, B.J., Sweetman, L. and Nyhan, L. Mutant holocarboxilase synthetase: evidence for the enzyme defect in early infantile biotin-responsive multiple carboxilase deficiency. Am J Hum Genet. (1981) 34:590-601.
60. Gregory, S. *et al.* Effects of age and Biotin Status on postnatal development of plasma biotinidase activity in rats. Bioche Med Met Bio (1991).45:92-100.
61. Heard, G. ; B. Wolf *et al.* Neonatal screening for biotinidase deficiency: results of a 1 year pilot study. J Pediatr (1989) 108:40.