

00562



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

7

CARBOXILASAS HUMANAS: ASPECTOS DE REGULACION  
ENZIMATICA Y GENETICA

EJEMPLAR UNICO

T E S I S

Que para obtener el grado de:  
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS  
(BIOQUIMICA)

P r e s e n t a :

RICARDO ORTIZ FREYRE

México, D. F.

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

**Jurado Asignado:**

Presidente : Dra. Estela Sánchez de Jiménez.  
Primer Vocal : Dra. Victoria Chagoya de Sánchez.  
Secretario : Dra. Rosario Muñoz Clares  
Suplente : Dr. Jorge Vázquez.  
Suplente : Dr. Antonio Velázquez Arellano.

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la supervisión de los Dres.- Alfonso González-Noriega y Antonio Velázquez Arellano.

A la memoria de mis padres:

**Gral. de Div. y Lic. Salvador Ortíz Melendez.**  
**Sra. Graciela Freyre de Ortíz**

A mis hermanos:

Salvador  
Raúl y  
Graciela

A la memoria de la niña:

Sonia Miranda López

Agradecimientos:

A los doctores Alfonso González-Noriega y  
Antonio Velázquez Arellano

Al personal de la Unidad de Genética de la  
Nutrición, particularmente al Sr. Carmelo-  
López.

**CARBOXILASAS HUMANAS: ASPECTOS DE REGULACION  
ENZIMATICA Y GENETICA**

Ricardo Ortíz Freyre

Unidad de Genética de la Nutrición

Instituto de Investigaciones Biomédicas

U.N.A.M., 1985.

## INDICE GENERAL

Pag.

### RESUMEN

### INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

- Carboxilasas Dependientes de Biotina.....	1
- Mecanismos de Carboxilación.....	5
- Síntesis de Holocarboxilasas.....	9
- Piruvato Carboxilasa.....	13
- Propionil CoA Carboxilasa.....	15
- $\beta$ -Metil Crotonil CoA Carboxilasa.....	15
- Acetil CoA Carboxilasa.....	16
- Deficiencia de Piruvato Carboxilasa.....	19
- Deficiencia de Propionil CoA Carboxilasa.....	21
- Deficiencia de $\beta$ -Metilcrotonil CoA Carboxilasa....	22
- Deficiencia de Acetil CoA Carboxilasa.....	23
- Deficiencia Múltiple de Carboxilasas.....	24
- Errores Innatos del Metabolismo.....	29
- Antecedentes de la Paciente y Estudios Preliminares..	33

### MATERIAL Y METODOS

- Cultivo de Fibroblastos.....	41
- Obtención de Células Sanguíneas Mononucleares.....	45
- Ensayos Enzimáticos.....	47
- Piruvato Carboxilasa.....	47
- Propionil CoA y Beta-Metil Crotonil CoA Carboxi- lasas.....	48
- Sintetasa de Holocarboxilasas.....	49
- Determinaciones de Metabolitos.....	52

RESULTADOS.....	53
-----------------	----

DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	94
-------------------------------	----

BIBLIOGRAFIA.....	105
-------------------	-----

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

<u>CUADROS</u>	Pag.
CUADRO 1 Carboxilasas Dependientes de Biotina.....	4
CUADRO 2 Características Bioquímicas de las Diferentes Carboxilasas de Mamíferos.....	17
CUADRO 3 Actividad Específica de Piruvato Carboxilasa en Fibroblastos en Cultivo, Normales y en una Paciente con Acidosis Láctico-Pirúvica.....	72
CUADRO 4 Actividad de Piruvato Carboxilasa en Fibroblastos Humanos Crecidos con Diferentes Concentraciones de Biotina.....	75
CUADRO 5 Actividad de Carboxilasas en Fibroblastos Humanos en Cultivo, crecidos en diferentes concentraciones de Biotina.....	84
CUADRO 6 Actividad de Carboxilasas en Células Sanguíneas Mononucleares.....	85
CUADRO 7 Constantes Cinéticas para la Síntesis de Holocarboxilasas en Fibroblastos Humanos en Cultivo.....	89
CUADRO 8 Composición de Acidos Grasos de algunos Aceites Comestibles.....	90
CUADRO 9 Actividad de Carboxilasas Sanguíneas Mononucleares con o sin una Dieta Cetogénica.....	92



## FIGURAS

	Pag.
FIGURA 1 Estructura de la d-Biotina.....	1
FIGURA 2 Estructura de la N-carboxibiotina.....	2
FIGURA 3 Mecanismo de Carboxilación.....	6 y 7
FIGURA 4 Clasificación de las Enzimas dependientes - de Biotina de acuerdo a sus estructuras....	9
FIGURA 5 Vías Metabólicas en las que participan las Carboxilasas.....	18
FIGURA 6 Vía Metabólica del Piruvato.....	37
FIGURA 7 Metabolitos Sanguíneos después de una car- ga de Glucosa.....	38
FIGURA 8 Respuesta a Biotina y Tiamina.....	39
FIGURA 9 Actividad de Piruvato Carboxilasa vs Protef <u>i</u> na en Fibroblastos Humanos en Cultivo.....	70
FIGURA 10 Actividad de Piruvato Carboxilasa vs Tiemp <u>o</u> en Fibroblastos Humanos en Cultivo.....	71
FIGURA 11 Actividad de Piruvato Carboxilasa vs Piru <u>v</u> ato en Fibroblastos Humanos en cultivo....	73
FIGURA 12 Actividad de Piruvato Carboxilasa vs Piru <u>v</u> ato en Fibroblastos Humanos. Doble Recí- proco.....	74
FIGURA 13 Actividad de Propionil CoA Carboxilasa vs Protef <u>n</u> a en Fibroblastos Humanos en culti <u>v</u> o.....	76
FIGURA 14 Actividad de Propionil CoA Carboxilasa vs Tiempo en Fibroblastos Humanos en Cultivo..	77
FIGURA 15 Actividad de Beta-metilcrotonil CoA Carbo <u>x</u> ilasa vs Protef <u>n</u> a en Fibroblastos Huma <u>n</u> o <u>s</u> en cultivo.....	78

		Pags.
FIGURA	16 Actividad de Beta-metilcrotonil CoA Carboxilasa vs Tiempo en Fibroblastos Humanos en cultivo.....	79
FIGURA	17 Actividad de Piruvato Carboxilasa vs Proteína en Células Sanguíneas Mononucleares..	80
FIGURA	18 Actividad de Piruvato Carboxilasa vs Tiempo en Células Sanguíneas Mononucleares.....	81
FIGURA	19 Actividad de Propionil CoA Carboxilasa vs Proteína en células Sanguíneas Mononucleares.....	82
FIGURA	20 Actividad de Propionil CoA Carboxilasa vs Tiempo en Células Sanguíneas Mononucleares.....	83
FIGURA	21 Actividad de Sintetasa de Holocarboxilasas vs Proteína en Fibroblastos Humanos en cultivo.....	86
FIGURA	22 Actividad de Sintetasa de Holocarboxilasas vs Biotina en Fibroblastos Humanos en cultivo.....	87
FIGURA	23 Actividad de Sintetasa de Holocarboxilasas vs Biotina. Doble Recíproco.....	88
FIGURA	24 Metabolitos durante Ayuno y Dieta Cetogénica.....	91
FIGURA	25 Actividad de Piruvato Carboxilasa vs Acetil CoA en Fibroblastos Humanos en cultivo.....	93

## RESUMEN

Existen cuatro enzimas carboxilasas dependientes de biotina en humanos, una de ellas, la Acetil CoA carboxilasa se encuentra localizada en el citosol, en tanto que las otras tres: Piruvato carboxilasa (PC), Propionil CoA carboxilasa y beta-Metilcrotonil CoA carboxilasa se localizan en la mitocondria. Para ser activa como acarreador de CO<sub>2</sub>, la biotina debe estar unida de manera covalente a las diferentes apocarboxilasas, esta unión está catalizada por otra enzima llamada Sintetasa de Holocarboxilasas (SHC).

Dentro de los Errores Innatos del Metabolismo, se han descrito deficiencias aisladas de cada una de las carboxilasas y deficiencias múltiples de carboxilasas (DMC). La principal diferencia entre ambas, es que en el caso de los DMC, las actividades enzimáticas se elevan notablemente como respuesta a la administración de dosis farmacológicas de biotina, en tanto que no existe respuesta en las diferentes deficiencias aisladas. Se han descrito dos formas de DMC, una de ellas debida a deficiencia de la SHC, generalmente con una Km ap. para biotina aumentada, y otra debida a deficiencia de la enzima Biotinidasa, encargada del reciclaje de la biotina endógena (degradación de Holocarboxilasas), así como del aprovechamiento de la biotina proveniente de la dieta. Ambos tipos de DMC responden al tratamiento con biotina. Puesto que las diferen

tes carboxilasas participan en distintas vías metabólicas, - las manifestaciones clínicas de la DMC son muy variadas, afec- tando diversos órganos y sistemas.

En la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto - de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, se detectó, gra- - cias a su programa de tamiz genético de alto riesgo, una pa- - ciente con DMC, pero con características clínicas y bioquími- - cas peculiares. En este trabajo se describen los estudios -- realizados con objeto de identificar el defecto bioquímico de la paciente, así como estudiar los mecanismos de regulación de la síntesis de carboxilasas utilizando como modelo experimen- tal las células de la paciente mencionada.

Estudios clínicos y bioquímicos preliminares en la pacien- te, sugerían una deficiencia aislada de PC que respondía a bio- tina. Para descartar esta posibilidad, se mostró la metodolo- gía para medir las actividades de las tres carboxilasas mito- condriales en fibroblastos en cultivo de la paciente, presen- tando todas ellas 20-30% de las actividades de células norma- les y respondiendo solo parcialmente a biotina. Mediante en- sayo indirecto para la SHC, se encontró que está estaba defi- ciente en las células de la paciente (30% de la actividad nor- mal), pero a diferencia de otros paciente reportados anterior- mente, el defecto parece encontrarse en la  $V_{max}$  y no en la  $K_m$  ap. para biotina, esto pudiera explicar la pobre respuesta a biotina. En un intento de tratamiento y para estudiar el -

posible efecto del Acetil CoA como regulador de la biotinización de la apo PC, se provocó, mediante diversos procedimientos, un estado de cetosis en la paciente, encontrándose que la actividad de esta enzima en linfocitos de sangre periférica se normalizaba, en tanto que las concentraciones sanguíneas de piruvato disminuían a valores normales, esto no fue reproducido "in vitro" por lo que la hipótesis no pudo ser afirmada, es posible que los resultados fueran debido a un efecto hormonal.

## **INTRODUCCION Y ANTECEDENTES**

## CARBOXILASAS DEPENDIENTES DE BIOTINA.

El papel que tienen las reacciones de carboxilación de pendientes de biotina en las diferentes vías metabólicas es bien conocido. Estas reacciones comprenden la incorporación de  $\text{CO}_2$  a diferentes sustratos, siendo dicha incorporación de pendiente de energía [1]. Las enzimas responsables de esas reacciones son conocidas comunmente como carboxilasas.

La biotina es el grupo prostético de todas las carboxilasas [2]. Esta vitamina hidrosoluble perteneciente al complejo "B", 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 levadura [3]. La estructura de la biotina fue determinada por du Vignand y cols. en 1942 [4] y confirmada por Harris y cols. dos años más tarde al llevar a cabo su síntesis total [5].

Estructuralmente, la biotina ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}$ ) es un anillo-ureído, el cual contiene un átomo de azufre y una cadena lateral de ácido valérico, fig. 1.

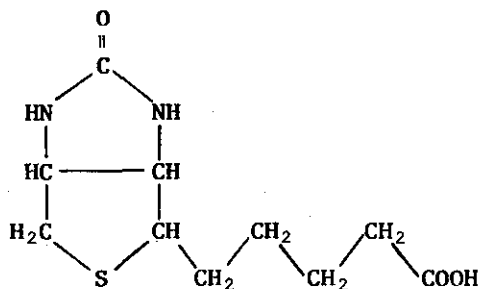


Fig. 1 Estructura de la d-Biotina

La biotina solo es activa cuando se encuentra unida covalentemente a la enzima de la cual es cofactor. La unión es por medio de un residuo de lisina localizado en el sitio activo de la enzima [6]. Esta característica fue sugerida por Wolf y cols. [7] al aislar el derivado biocitina (E-N-biotinil lisina) a partir de un extracto de levadura, fig. 2. -- De los ocho isómeros existentes, solo la d-Biotina muestra actividad de coenzima [9].

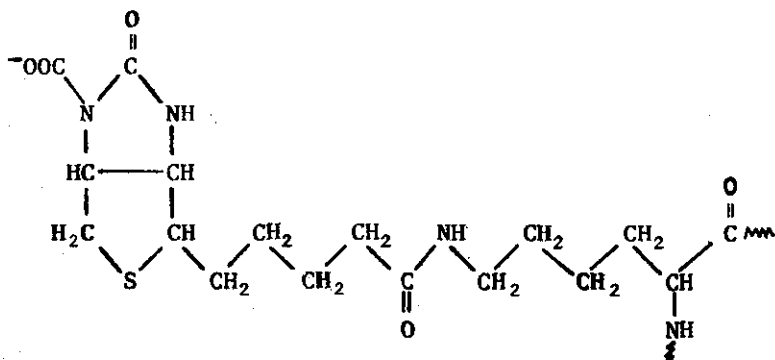
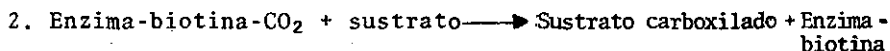
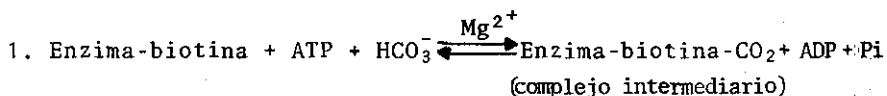


Fig. 2 Estructura de la N-carboxibiotina, covalentemente unida a un residuo de lisina de una enzima carboxilasa.

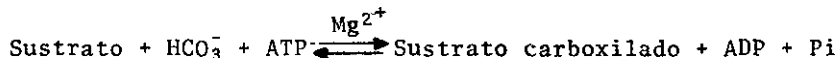


La distribución de la biotina en la naturaleza es amplia, encontrándose aún en pequeñas cantidades en la mayoría de los tejidos de plantas y animales, además, la vitamina es sintetizada por una amplia variedad de bacterias, incluyendo algunas de la flora intestinal normal del ser humano [8].

La reacción catalizada por todas las carboxilasas comprende la formación de un complejo intermediario, unido a la enzima; el grupo carboxibiotinilo (fig. 2), el cual funciona como acarreador del grupo carboxilo. La reacción tiene lugar en dos pasos secuenciales conforme a las ecuaciones 1 y 2:



Por lo tanto la reacción global puede escribirse como:



Para todas las carboxilasas, el donador del carboxilo es el ion bicarbonato; se requiere también un metal divalente, generalmente  $\text{Mg}^{2+}$ , aunque puede ser  $\text{Mn}^{2+}$  [1, 9].

En el cuadro 1 se muestran las reacciones globales catalizadas por las carboxilasas mejor conocidas, así como sus pa

C U A D R O 1

CARBOXILASAS DEPENDIENTES DE BIOTINA

ENZIMA	REACCION CATALIZADA	PAPEL BIOQUIMICO	EFFECTORES
Acetil CoA carboxilasa	Acetil CoA→Malonil CoA	Síntesis de Ac. grasos	+ Citrato, isocitrato - Malonil CoA
Piruvato carboxilasa	Piruvato→oxaloacetato	Gluconeogénesis, anaerobiosis y lipogénesis	+ Acetil CoA - Glutamato, aspartato
Propionil CoA carboxilasa	Propionil CoA→metilmalonil CoA	Metabolismo del propionato en animales y microorganismos	+ K <sup>+</sup>
β-Metilcrotonil CoA carboxilasa	β-Metilcrotonil CoA→β-Metilglutaconil CoA	Catabolismo de Leucina	+ K <sup>+</sup>
Geranil CoA carboxilasa	Geranil CoA→geranilCoA carboxilado	Degradación de isoprenoides en bacterias	
ATP:Urea amidoliasa	UREA→N-carboxiurea +H <sub>2</sub> O NH <sub>3</sub> + CO <sub>2</sub>	Catabolismo de Urea en bacterias	
Transcarboxilasa	Metilmalonil CoA + Piruvato→oxaloacetato + propionil CoA	Metabolismo bacteriano del propionato	

Tomado de Achuta Murthy y Mistry. Ref. 1.

peles bioquímicos y respectivos efectores.

Las carboxilasas se encuentran ampliamente distribuidas en microorganismos y animales. Muchas de ellas han sido aisladas en formas muy puras o cristalizadas y se han podido estudiar en detalle sus propiedades fisico-químicas y biológicas, Moss y Lane [10]. Como se verá más adelante, en los humanos solo existen 4 enzimas carboxilasas.

### **Mecanismo de Carboxilación.**

Existe evidencia de que las reacciones catalizadas por las diferentes enzimas dependientes de biotina, pueden ser llevadas a cabo por una apropiada combinación de varios tipos de reacciones parciales básicas. Vagelos y cols. [11] y Wood y cols. [12], estudiando dos enzimas bacterianas, demostraron que las enzimas dependientes de biotina realmente eran sistemas multi enzimáticos. Se encontró que el grupo prostético biocitina, tanto en la acetil CoA carboxilasa de E. coli como en la trans carboxilasa de Propionibacteria, estaba localizado en un pequeño polipéptido, distinto de las subunidades catalíticas y que funcionaba como traslocador del grupo carboxilo entre esas subunidades.

Como se puede ver de manera esquemática en la fig. 3 , - en la acetil CoA carboxilasa de E. coli, el primer paso es catalizado por el sistema activo denominado "biotincarboxilasa"

(BC), donde es carboxilado el grupo prostético biocitina, anclado a la subunidad denominada "proteína acarreadora de biocitina" (PAB). Esta subunidad no tiene actividad catalítica.

El siguiente evento es la traslocación del grupo biotinilcarboxilado del sitio BC al sitio denominado "transferasa de carboxilo" (TC) donde es catalizada la transferencia del carboxilo al aceptor final, acetyl CoA. La unión del grupo  $\text{CO}_2$  a la biocitina, parece ser muy importante para su función, ya que de esta forma el sistema tiene un brazo flexible que hace posible la traslocación de carboxilo entre las dos subunidades activas. Este mecanismo está apoyado por el aislamiento y purificación de las diferentes subunidades [11].

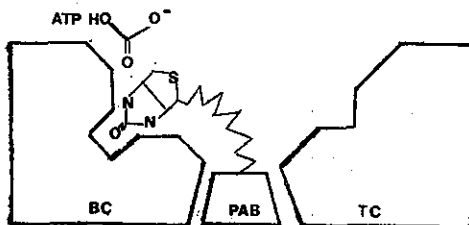


Fig. 3a Primera reacción parcial de la Acetil CoA Carboxilasa.

BC: Biotin Carboxilasa.

Tomado de Visser and Kellog, 1976. Ref. 11

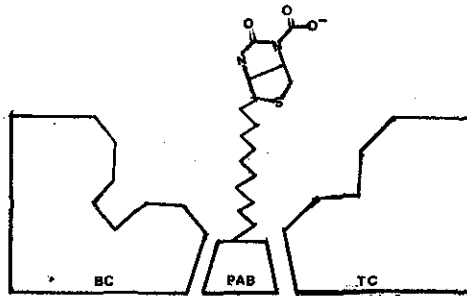


Fig. 3b Intermediario activo  
 PAB: Proteína acarreadora de biotina

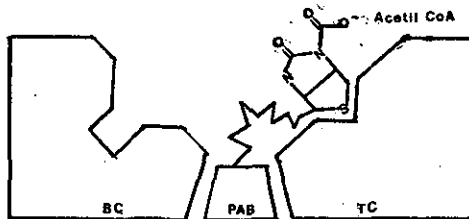


Fig. 3c Segunda reacción parcial de la Acetil CoA carboxilasa  
 TC: Transferasa de carboxilo.

La hipótesis de que las diferentes carboxilasas podrían llevar a cabo su función mediante el mismo esquema, se rechazó dado que se encontró que carboxilasas de otras especies no estaban constituidas por el mismo número de polipéptidos y que en algunas, como en Pseudomonas citronellolis [13], tanto el sitio BC como el PAB estaba localizado en un mismo polipéptido, o que como en el caso de la Piruvato carboxilasa en levadura y mamíferos [14] las tres actividades se encontraban incorporadas en una sola cadena polipeptídica multifuncional.

Sin embargo, el orden de los eventos que constituyen la reacción de carboxilación y el papel de la biotina como acarreador del carboxilo es un fenómeno general en este tipo de enzimas. De esta manera, se puede concluir que las enzimas dependientes de biotina pueden ser colocadas en tres grupos, como se ilustra en la figura 4.

En el primer grupo, representado por la acetil CoA carboxilasa de E. coli y la transcarboxilasa de Propionobacteria, la enzima activa puede ser dividida en tres tipos de componentes funcionales: PAB, BC y TC. En el segundo grupo, representado por  $\beta$ -metilcrotonil CoA de Achromobacter, solo están presentes dos tipos de polipéptidos. Uno de ellos que contiene la actividad de BC junto con la proteína acarreadora de -

biotina y otro que contiene la actividad de transferasa de biotina.

Finalmente, en el tercer grupo, todas las funciones estan contenidas en una sola cadena polipeptídica. Ejemplos de esto son: Acetil CoA carboxilasa y Piruvato carboxilasa de levadura, así como las mismas enzimas de aves y mamíferos [14].

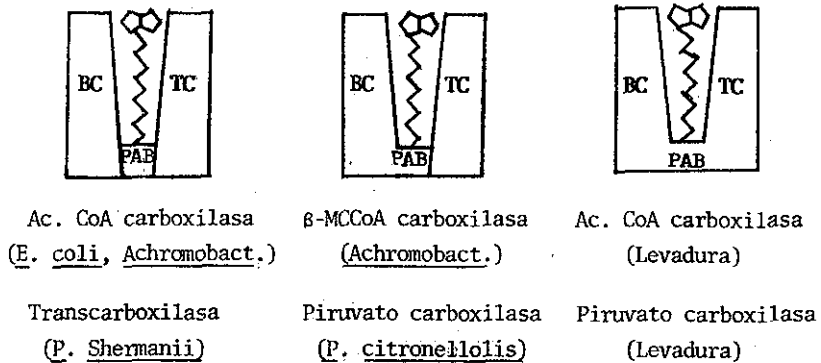


Fig. 4 Clasificación de las enzimas dependientes de biotina de acuerdo a sus estructuras (BC): Biotina carboxilasa; (PAB): Proteína acarreadora de biotina y (TC): Transferasa de carboxilo.

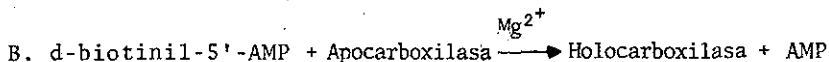
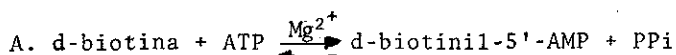
#### Síntesis de Holocarboxilasas.

Como ya se mencionó, para ser activa como acarreador de CO<sub>2</sub>, la biotina debe estar unida de manera covalente a la enzima. Esta unión es a través del grupo épsilon amino de un residuo de lisina, localizado en el sitio activo de la apocar

boxilasa, dando lugar de esta manera a la holocarboxilasa.

La unión de la biotina es catalizada, en una reacción dependiente de energía, por otra enzima llamada: Sintetasa de Holocarboxilasa ( (+) Biotin apocarboxilasa ligasa (AMP); EC 6.3.4.- ).

El hecho de que la síntesis de holocarboxilasas sea dependiente de ATP, sugiere que la biotinización de las carboxilasas comprende, como prerequisite, la activación del grupo carbonilo de la biotina. Se ha postulado que la reacción consiste de 2 pasos secuenciales:



En el primer paso (A), se lleva a cabo la formación del intermediario biotinil-5'-AMP a partir de biotina, ATP y  $\text{Mg}^{2+}$ , seguido de la transferencia del grupo biotinilo a la apocarboxilasa inactiva (B), formando la holocarboxilasa activa [1, 14]. Este mecanismo está apoyado principalmente por los experimentos de Siegel y cols, [15], quienes observaron que Biotinil-AMP preparado sintéticamente, podía reemplazar a la mezcla de biotina y ATP en un sistema sintetizador de holocarboxilasas libre de células.

La posibilidad de que el biotinil-AMP adicionado al sis



tema fuera hidrolizado y generara ATP, en lugar de ser un intermediario de la reacción, fue investigado por el mismo grupo de investigadores, incluyendo un sistema captador de ATP:Hexoquinasa y glucosa) en su sistema sintetizador de holocarboxilasas, de esta manera, cualquier ATP generado "de novo" sería inmediatamente utilizado por la trampa de hexoquinasa y no estaría disponible para síntesis de holoenzimas. La formación de holoenzimas a partir de biotinil-AMP no fue inhibida por la trampa de hexoquinasa, lo cual descarta la posibilidad mencionada [15].

Los estudios de Achuta Murthy y Mistry [16, 17] sugirieron la existencia de dos sintetisas de holocarboxilasas en el hígado de pollo, una de ellas localizada en el citosol y específica para la apoacetil CoA carboxilasa y otra localizada en la mitocondria y específica para apopropionil CoA carboxilasa. Hasta ahora no se han reportado estudios similares en mamíferos, por lo que se desconocen tanto su número, como su compartimentalización y especificidad en sistemas superiores.

Algunas de las holocarboxilasas están reguladas por la acción de ciertos metabolitos. La piruvato carboxilasa es activada por acetil CoA y este efecto es antagonizado por aspartato o glutamato, dependiendo la especie de origen [18, 19].

La acetil CoA carboxilasa es activada por metabolitos del Ciclo de Krebs, como citrato e isocitrato e inhibida por malonil CoA [20]. De la consideración de estos hechos, surge la pregunta de si también la síntesis de holocarboxilasas esta regulada por algún efector.

Que exista un posible tipo de regulación se ha hecho -- probable a partir de los estudios de Cazzulo y cols., quienes reportaron un novedoso modo de regulación de la síntesis de holopiruvato carboxilasa tanto en Bacillus stearothermophilus, como en levadura [21, 22, 23].

En extractos libres de células de estos microorganismos, en presencia de ATP,  $MgCl_2$  y Biotina o bien de Biotinil-AMP-preformado, la síntesis de la holopiruvato carboxilasa fué sumamente estimulada por la adición de acetil CoA. De hecho, la omisión de este metabolito redujo la producción de la holoenzima en un 94%.

En cuanto a sistemas animales se refiere, no existe ninguna respuesta convincente. Aunque Madapally y Mistry han reportado [24] que la acetil CoA no estimula la síntesis de holopiruvato carboxilasa por la sintetasa de hígado de pollo, no se han realizado más estudios en las sintetasas de origen animal.

Existen cuatro enzimas carboxilasas dependientes de biotina en mamíferos, cuadro 1; una de ellas, la acetil CoA car

boxilasa (EC 6.4.1.2; ACC), localizada en el citosol, es una enzima clave en la síntesis de los ácidos grasos; las otras tres carboxilasas están localizadas en la mitocondria y son: Propionil CoA carboxilasa (EC 6.4.1.3; PCC) que participa en el catabolismo de los aminoácidos Valina e Isoleucina y además en el catabolismo de Metionina y Treonina; la 3-Metilcrotonil CoA carboxilasa (EC 6.4.1.4; MCC) que participa en el catabolismo de Leucina y la Piruvato carboxilasa (EC 6.4.1.1; PC), enzima anaplerótica del Ciclo de Krebs y que además cataliza el primer paso en la vía de gluconeogénesis. En seguida presentamos un breve resumen de las principales características bioquímicas de estas enzimas.

### **Piruvato Carboxilasa.**

La molécula de PC tiene un peso molecular de aproximadamente 500,000 daltones. Micrografías electrónicas de preparaciones derivadas de hígado muestran que la PC es un tetrámero compuesto de cuatro subunidades idénticas. Cada subunidad tiene un peso molecular de 130,000. La Piruvato carboxilasa de mamíferos es activada por el ligando alostérico -- Acetil CoA. Estudios de unión indican que 4 moléculas de -- acetil CoA son unidas por cada molécula de enzima. Experimentos de afinidad sugieren que existen 4 sitios de unión, -- tanto para ATP como para piruvato (en presencia de acetil CoA),

por molécula de la enzima. Una evaluación de los datos presentados arriba sugieren que cada molécula de PC esta compuesta de 4 subunidades idénticas. Eso es, que cada polipéptido aparentemente contiene todos los componentes de un sitio activo funcional. -El subsitio de carboxilación, el subsitio de transferencia del carboxilo (el cual une  $\alpha$  cetoácidos) y el sitio de biotina además del sitio alostérico (el cual une acetil CoA)- [18, 19, 25].

La piruvato carboxilasa tiene un papel central en la regulación del flujo de átomos de carbono en el metabolismo, no solo en hígado y riñón, tejidos que muestran una alta actividad de PC, sino en otros tejidos también, particularmente en el cerebro en desarrollo [26]. Esta enzima es fundamental para la producción de oxaloacetato en la gluconeogénesis y lipogénesis y como parte de un mecanismo anaplérotico, o sea de "rellenado" de intermediarios del Ciclo de Krebs. -- Está sujeta a una regulación muy fina, particularmente dada por la concentración de acetil CoA en la célula, así como a regulación hormonal (la insulina la inhibe y el cortisol aumenta su actividad [27, 28]). No se ha reportado la existencia de isoenzimas de PC y se piensa que una sola clase de esta enzima se encuentra en los diferentes tejidos.

### **Propionil Coenzima A Carboxilasa.**

La propionil CoA carboxilasa, con un peso molecular de aproximadamente 540,000, es un tetrámero, con cada protómero compuesto de dos tipos de subunidades, las alfa, con peso molecular de 72,000 y las beta, con peso molecular de 56,000. Contiene 4 moléculas de biotina por molécula de enzima, localizadas en las subunidades grandes (alfa). Esta enzima es activada por cationes monovalentes y no se le han encontrado inhibidores específicos. Participa en el catabolismo de los aminoácidos isoleucina, valina, metionina y treonina vía la ruta del propionato para desembocar en succinil CoA y entrar al ciclo de Krebs [1].

### **$\beta$ -Metilcrotonil Coenzima A Carboxilasa.**

La beta-Metilcrotonil CoA carboxilasa bovina, tiene un peso molecular de aproximadamente 530,000. A semejanza de la PCC humana, es un tetrámero, con cada protómero formado por dos subunidades diferentes, la subunidad alfa, de peso molecular de 74,000 y la subunidad beta, con peso molecular de 58,000. La biotina se encuentra unida al polipéptido grande, el alfa. Esta enzima participa en el catabolismo del aminoácido leucina. Es activada por cationes monovalentes y no se han reportado inhibidores de su actividad [29].

### Acetil Coenzima A Carboxilasa.

La actividad de esta enzima tan importante, dado su papel central en la síntesis de ácidos grasos, es controlada en hígado y en tejido adiposo de mamíferos por la presencia de citrato e isocitrato. En su forma inactiva, la enzima consiste en protómeros de 400,000 a 500,000 daltones, formados de 4 subunidades. Cada uno de estos protómeros contiene una molécula de biotina y puede unir una molécula de acetil CoA y otra de citrato, sugiriendo que las subunidades no son idénticas. La activación por citrato se acompaña de polimerización de la enzima logrando una forma filamentosa y alcanza pesos moleculares de hasta 5 millones. Es así como citrato e isocitrato, intermediarios del ciclo de Krebs, funcionan como factores regulatorios, activando la ACC, la cual cataliza el paso limitante en la síntesis de ácidos grasos en mamíferos. Esta enzima es inhibida por Malonil CoA y derivados Acil CoA de ácidos grasos de cadena larga [20].

En el cuadro 2 se presenta un resumen de las características bioquímicas de las carboxilasas presentes en mamíferos.

En la figura 5 se puede observar la colocación y las interrelaciones de las diferentes carboxilasas en el metabolismo.

C U A D R O 2

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LAS DIFERENTES CARBOXILASAS DE MAMIFEROS

ENZIMAS	FUENTES ESTUDIADAS	P. MOL.	ESTRUCTURA DE SUBUNIDADES	P. MOL. DE SUBUNIDADES	EFFECTORES
PC	HUMANO	500,000	$\alpha_4$	130,000	+ Acetil CoA - Glutámico
PCC	HUMANO	540,000	$(\alpha, \beta)_4$	72,000 56,000	+ Cationes monovalentes
beta-MCC	BOVINA	530,000	$(\alpha, \beta)_4$	74,000 58,000	+ Cationes monovalentes
ACC	RATA	POLIMERICA	$\alpha_n$	25,000	+ Citrato - Malonil CoA

PC: Piruvato carboxilasa; PCC: Propionil CoA carboxilasa.

beta-MCC: beta-Metilcrotonil CoA carboxilasa; ACC: Acetil CoA carboxilasa.

+ = Activador

- = Inhibidor

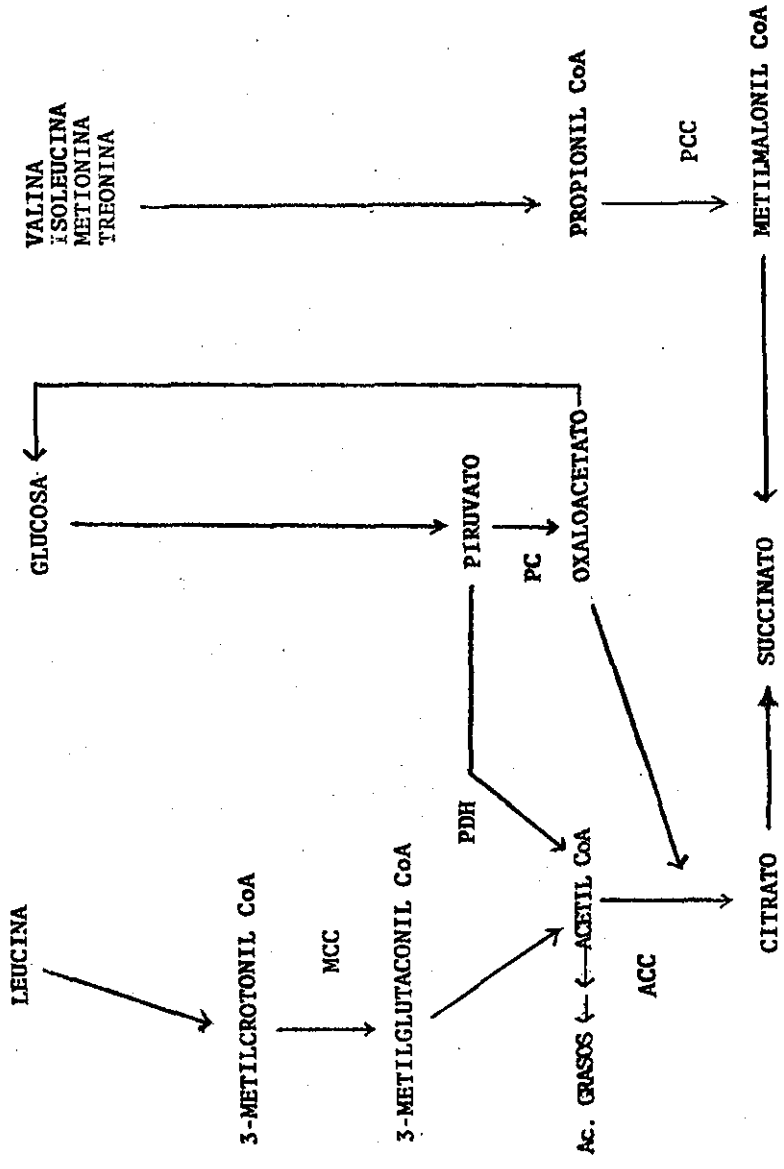


Fig. 5 VIAS METABOLICAS EN LAS QUE PARTICIPAN LAS CARBOXILASAS



## DEFICIENCIAS DE CARBOXILASAS EN HUMANOS.

Se han reportado pacientes con una deficiencia aislada de cada una de las carboxilasas y pacientes con deficiencia múltiple de carboxilasas.

Revisaremos primero las deficiencias aisladas:

### Deficiencia de Piruvato Carboxilasa.

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 [26]. 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 plasmáticas elevadas de lactato y 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 después. Se ha sugerido a la deficiencia de PC como posible causa de la enfermedad de Leigh: Encefalomielopatía necrotizante subaguda (ENS) [30], enfermedad degenerativa del tallo cerebral, frecuentemente caracterizada por hallazgos bioquímicos similares a aquellos descritos para la deficiencia de PC. Sin embargo, estudios recientes [31, 32, 33] 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 indetectable 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.

De Vivo y cols. [34] encontraron en el hígado de un paciente con deficiencia de PC, que las concentraciones de oxaloacetato, citrato,  $\alpha$  cetoglutarato, malato y succinil CoA se encontraban disminuidas. Esto sugirió que debido a la reducida disponibilidad de oxaloacetato, existe una baja en la actividad de la enzima citrato sintetasa, lo cual conduce a un flujo disminuido del ciclo de Krebs y a un metabolismo oxidativo defectuoso.

La manifestación clínica más grave es el profundo daño neurológico que sufren estos pacientes. Una posible explicación sería, que dado que el cerebro es virtualmente dependiente de la oxidación de glucosa, vía glucólisis hasta piruvato, el cual entra al ciclo de krebs como acetil CoA. Una interrupción en esa vía a cualquier nivel, conduciría a una privación cerebral de ATP.

El tratamiento de la deficiencia de PC se ha enfocado -- principalmente en el 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 [35]. La deficiencia de PC parece ser heredada de un modo autosómico recesivo, -- De Vivo y cols. [34] reportaron que las actividades de PC en fibroblastos derivados de los padres de un paciente afectado, eran intermedias entre las presentadas por células controles y del paciente, siendo heterocigotos obligados.

#### Deficiencia de Propionil CoA Carboxilasa.

La mejor caracterizada de las deficiencias aisladas de carboxilasas es la deficiencia de PCC, conocida como acidemia propiónica. Generalmente en los niños afectados se ini-

cia la sintomatología durante el periodo neonatal, con vómito, letargia e hipotonía [36]. Los individuos afectados -- acumulan propionato y sus metabolitos debido al inadecuado catabolismo de isoleucina, valina, treonina y metionina a través de la vía del propionato, la cual desemboca en el ciclo de krebs en forma de succinil CoA. Excretan grandes concentraciones de los ácidos orgánicos: metilcittrato, 3-hidroxipropionato y propionil glicina en la orina. Una ingestión excesiva de proteínas o 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 [37]. Las causas de esta variación clínica están poco claras por ahora. Algunos pacientes con deficiencia aislada de PCC han sido exitosamente tratados mediante una dieta restringida en proteínas, --- mientras que no se ha encontrado respuesta a dosis farmacológicas de biotina [37]. Esta enfermedad se hereda de un modo autosómico recesivo.

#### Deficiencia de $\beta$ -metilcrotonil Coenzima A Carboxilasa.

La deficiencia de  $\beta$ -metilcrotonil CoA carboxilasa ha si

do sospechada en varios casos reportados en la literatura -- [36, 39, 40], en todos ellos, menos en uno, se encontró que en realidad se trataba de deficiencias múltiples de carboxilasas. La deficiencia aislada de MCC fue confirmada enzimáticamente. En una preparación mitocondrial hepática no se encontró actividad detectable de MCC, pero se encontró actividad normal de PCC, excluyendo la posibilidad de una deficiencia múltiple [41]. En la orina se encontró excreción de los ácidos  $\beta$ -hidroxiisovalérico y  $\beta$ -cetoglutárico. 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 [41].

#### Deficiencia de Acetil Coenzima A Carboxilasa.

Recientemente se reportó el primer caso de deficiencia aislada de Acetil CoA carboxilasa [42]. 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 de la 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.

### Deficiencia Múltiple de Carboxilasas.

La diferencia más notable entre las deficiencias aisladas de carboxilasas y la deficiencia múltiple, en que todas las carboxilasas están deficientes, es que en el primer caso no se observa ningún efecto a la administración de biotina, mientras que en la deficiencia múltiple las actividades de las diferentes carboxilasas se elevan notablemente, e incluso llegan a normalizarse después del tratamiento con dosis altas de biotina [43, 44, 45].

Basándose en la edad en la cual se inician los síntomas de la enfermedad, así como en los datos bioquímicos, pueden distinguirse dos tipos diferentes de Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC): La forma neonatal, de inicio temprano, y en la cual los síntomas que generalmente se presentan son: vómito, letargia e hipotonía, asociada con acidosis metabólica, cetoacidosis láctica y elevación de los diferentes metabolitos urinarios característicos de las deficiencias aisladas de carboxilasas [29, 39, 43, 44, 45]. Las actividades de PC, PCC y de MCC están disminuidas en leucocitos de los pacientes, antes de la administración de dosis farmacológicas de biotina, pero alcanzan niveles normales o casi normales después del tratamiento.

Las concentraciones plasmáticas y urinarias de biotina son normales en este tipo de DMC. En estudios en fibroblas--

tos en cultivo, se observa que cuando se crecen las células en medio de cultivo con la concentración normal de biotina, las actividades de las diferentes carboxilasas están deficientes, pero al suplementar el medio con cantidades altas de biotina (100-1,000 veces la concentración normal) las actividades de las carboxilasas se incrementan hasta los niveles normales. Algunos investigadores han presentado recientemente evidencia de que el defecto primario en la DMC del tipo neonatal se encuentra en la Sintetasa de Holocarboxilasas; SHC [46, 47]. Se ha encontrado que la Km para biotina de la Sintetasa de un paciente es alrededor de 200 veces la Km de un control normal, esto explica la baja actividad de carboxilasas en concentraciones normales de biotina y su elevación cuando se crecen las células en medios ricos en biotina. En un principio se pensó que la DMC solo comprendía las carboxilasas mitocondriales y no a la ACC localizada en el citosol. Esto apoyaba la idea de la existencia de dos SHC distintas; una mitocondrial, encargada de biotinizarse PC, PCC y MCC y otra citosólica, encargada de biotinizarse a la ACC.

Con el desarrollo de mejores métodos para medir la ACC se encontró que en un paciente con deficiencia de las tres carboxilasas mitocondriales y que pertenecía al tipo neonatal, la ACC también se encontraba deficiente y que respondía a dosis altas de biotina [42]. Esto sugiere que la unión de biotina puede proceder por medio de varios mecanismos. Estos

incluyen una SHC común que une la biotina a las subunidades enzimáticas o a las apoenzimas ya ensambladas, antes de ser transportadas dentro de la mitocondria; SHC idénticas en ambos compartimentos celulares o SHC diferentes pero compartiendo alguna subunidad.

La otra forma de DMC es la llamada juvenil. Estos pacientes tienen manifestaciones clínicas similares a aquellos con la forma neonatal de DMC; actividad deficiente de carboxilasas en leucocitos de sangre periférica, antes de la terapia a base de biotina, que se elevan a niveles normales después del tratamiento. El inicio de la sintomatología es alrededor de los 3-6 meses de edad del paciente, e incluye: dermatitis, conjuntivitis, alopecia, ataxia y ocasionalmente candidiasis y retraso en el desarrollo [29, 45], además de los hallazgos bioquímicos encontrados también en la forma neonatal. La concentración plasmática de biotina puede encontrarse por abajo de lo normal o dentro de límites normales, en tanto que la biotina urinaria se encuentra generalmente disminuida. En estudios en fibroblastos, se observa que cuando se crecen las células en un medio con la concentración normal de biotina, las actividades de las carboxilasas se encuentran normales, no distinguiéndose éstas de las presentadas por líneas celulares controles, siendo esta la diferencia más característica entre los dos tipos de DMC.



En estudios realizados en algunos pacientes con esta forma de DMC [48, 49] se observó que cuando se les administraban oralmente, cantidades crecientes de biotina, la concentración plasmática de biotina no alcanzaba los niveles presentados por los controles. Este descubrimiento sugirió que probablemente el defecto en la forma juvenil de DMC fuera -- una anomalía en la absorción intestinal de biotina.

Recientemente, Wolf y cols. [50] definieron la causa probable de esta forma de DMC. Encontraron en varios pacientes con la forma juvenil, deficiencia de la enzima biotinidasa, en plasma.

La biotinidasa cataliza la liberación de biotina, mediante la hidrólisis de biocitina, la cual procede de la degradación de las diferentes holocarboxilasas, permitiendo de esta manera el reciclaje y la reutilización de la biotina endógena. Individuos con deficiencia de biotinidasa son incapaces de reciclar su biotina endógena y de degradar completamente las holocarboxilasas, acumulándose la biocitina. Si el aporte dietético de biotina no logra suplir la cantidad de biotina reciclada normalmente por medio de la biotinidasa, se desarrollará gradualmente un estado de deficiencia de biotina. En dosis farmacológicas, la biotina exógena puede reemplazar la cantidad de biotina que normalmente se recicla a partir de la biocitina endógena. Se ha postulado que la biotinidasa está involucrada también en el aprovechamiento de la bio-

tina proveniente de la dieta [51]. Esto último está apoyado por el hecho de que la mayoría de la biotina en los alimentos se encuentra unida a proteínas [6], y porque se ha encontrado actividad de biotinidasa en el jugo pancreático y en las células del epitelio intestinal [51].

Es evidente que se trata de un problema complejo y que es difícil el diagnosticar el tipo de DMC de que se trata. La mejor manera parece ser el comportamiento de las carboxilasas de fibroblastos en cultivo en diferentes concentraciones de biotina o bien la medición directa de las enzimas responsables: SHC para la forma neonatal y la biotinidasa para la forma juvenil.

Existen fenocopias de la DMC, es decir, deficiencias de biotina adquiridas, tales como la debida a un consumo excesivo de huevo crudo, el cual contiene avidina, glicoproteína que une específicamente y casi irreversiblemente a la biotina, impidiendo su absorción intestinal [52] o bien debida a una alimentación parenteral prolongada, sin suplemento de biotina [53]. Los pacientes con una deficiencia de biotina adquirida pueden ser mantenidos bajo dosis fisiológicas de biotina libre, al igual que los deficientes de biotinidasa, en tanto que los deficientes de SHC requieren de dosis farmacológicas del cofactor para mantener un balance metabólico.

El estudio de las Deficiencias Múltiples de Carboxilasas ha llamado ultimamente la atención de los especialistas, dada su complejidad biológica y las importantes consecuencias que tiene en el metabolismo humano.

Las DMC están comprendidas dentro del grupo de enfermedades conocidas como Errores Innatos del Metabolismo. Brevemente, se expondran los conceptos más importantes de este -- grupo de enfermedades.

### Errores Innatos del Metabolismo.

El término de error innato del metabolismo fue utilizado por primera vez a principios de este siglo por Archibald E. Garrod, el cual reconoció la existencia de fenotipos debidos al bloqueo de una vía metabólica, heredados en forma mendeliana o monogámica [54, 55]. Garrod incluyó en esta agrupación a la alcaptonuria, el albinismo, la cistinuria y la pentosuria.

Aunque no todos, los errores innatos del metabolismo -- constituyen en su mayoría enfermedades, en las que un bloqueo metabólico es consecuencia de deficiente actividad de una enzima o de un proceso de transporte membranal. Este bloqueo-- tendrá como consecuencia una acumulación excesiva de sustrato y formación insuficiente de los productos de la vía bloqueada.

Vías metabólicas colaterales, normalmente de poca importancia, pueden aumentar su flujo en forma considerable, al quedarle cerrado el paso al sustrato, a través de la vía principal. -- Los cambios en las concentraciones de metabolitos de la vía bloqueada, pueden afectar las actividades de las enzimas pertenecientes a otras vías metabólicas diferentes.

Puesto que existen numerosas vías metabólicas, y por lo tanto enzimas en un organismo, (en el hombre se han reconocido más de 2,000 enzimas diferentes), las posibilidades de un error innato del metabolismo (EIM) son tan grandes como el número de enzimas. Sin embargo, solo se conocen actualmente alrededor de doscientos. El resto está aún por ser descubierto [56].

Cualquiera de las vías metabólicas puede estar afectada, debido a esto, las manifestaciones clínicas de los EIM son muy diversas. Pueden presentarse solas o en diferentes combinaciones, afectando a cualquiera de los aparatos o sistemas del organismo, produciendo incapacidad grande, retraso mental y en muchos casos la muerte del paciente a temprana edad [54].

Más del 95% de los EIM se heredan en forma autosómica recesiva. Esto es, los heterocigotos portadores del gen mutante son clínicamente sanos. Por esta razón, estas enfermedades son más frecuentes en hijos de matrimonios consanguíneos. Es posible ofrecer consejo genético a las parejas que ya tu

vieron un hijo afectado, y en algunos EIM (por ejemplo, Síndrome de Tay Sachs) es posible detectar a los heterocigotos portadores.

Existen estudios de laboratorio, llamados pruebas de tamiz genético, que permiten la identificación de los pacien-tes con un EIM. Aunque estas pruebas no son diagnósticas, - permiten seleccionar individuos con alta probabilidad de es-tar afectados. Estudios posteriores más sofisticados permiten el diagnóstico preciso.

En algunos EIM, la alteración bioquímica responsable - del daño orgánico, aparece hasta después del nacimiento. -- Existen algunos tratamientos que permiten evitar el daño pro-vocado por el EIM, los cuales pueden ser: aportando el producto que no es formado, restringiendo el sustrato de la vía bloqueada o eliminando el compuesto ofensivo. En algu-nos casos de enzimas que dependen de cofactores, es posible tratar su deficiencia mediante megadosis de vitaminas [54, - 55].

El estudio de los errores innatos del metabolismo por parte del bioquímico ha superado las implicaciones médicas. En la actualidad son cada vez más los investigadores que reconocen la importancia que los EIM tienen como modelo experi-mental para el estudio de la biología molecular del ser huma-no. No es posible negar las importantes aportaciones deriva-

das del empleo de modelos bacterianos y de eucariotes inferiores, pero qué mejor que estudiar el metabolismo humano en el hombre mismo.

Un gran número de vías y mecanismos metabólicos normales en el organismo humano han podido ser definidos mediante el estudio de los EIM. Baste como ejemplo el hecho de que buena parte de lo que se conoce sobre el metabolismo de los carbohidratos ha derivado de los estudios sobre galactosemia y glucogenosis. Asimismo, algunos aspectos de las vías metabólicas de las purinas y de las pirimidinas han sido comprendidos gracias al estudio de alteraciones como la gota y el síndrome de Lesch-Nyhan [56].

En la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M., se detectó, -- gracias a su programa de Tamiz genético de alto riesgo, una paciente con Deficiencia Múltiple de Carboxilasas, pero con características clínicas y bioquímicas peculiares. En este trabajo se describen los estudios realizados con objeto de -- identificar el defecto bioquímico de la paciente, así como -- estudiar los mecanismos de regulación de la síntesis de carboxilasas utilizando como modelo experimental, células de -- una paciente con Deficiencia Múltiple de Carboxilasas.

## ANTECEDENTES DE LA PACIENTE Y ESTUDIOS PRELIMINARES.

Se trata de un paciente de sexo femenino, mestiza, nacida en marzo de 1978, sin consanguinidad entre sus padres ni antecedentes de familiares afectados de manera similar. La madre notó movimientos fetales más tardíos y de menor intensidad que en sus embarazos anteriores.

El parto fue prolongado y con uso de forceps, presentando apnea neonatal con cianosis. Letárgica desde el nacimiento, a los tres meses presentó espasmos masivos y crisis convulsivas tipo tónico, con frecuencia de varios episodios al día. A los cuatro meses se le diagnosticó retraso psicomotor.

Al ser estudiada por primera vez en el Instituto Nacional de Pediatría la paciente contaba con un año y ocho meses de edad pero con una talla por debajo del tercer percentil.

Había dificultad para la deglución y secreciones traqueobronquiales abundantes y continuas que requerían ser aspiraadas. No se encontró visceromegalia.

La niña se mostraba indiferente al medio, no reconociendo a las personas y reponiendo solamente a estímulos dolorosos o fuertes, no podía sentarse ni caminar. Una tomografia axial computada reveló atrofia cortical y subcortical.

Estudios de electrolitos séricos revelaron una concentración baja de bicarbonato, con una brecha de aniones por arriba de lo normal. El pH urinario fue inferior a 6.0 en varias ocasiones. Nunca hubo manifestaciones clínicas de acidosis metabólica ni de cetosis. Tampoco anormalidades dermatológicas.

Cuando la paciente fue estudiada en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. a través del programa de Tamiz genético, se observó, por medio de cromatografía en capa fina, que tanto en orina como en plasma la concentración de alanina se encontraba aumentada. También resultaron elevadas las concentraciones sanguíneas de piruvato (254  $\mu\text{M}$ ; normal: menos de 113) y de lactato (3.2  $\mu\text{M}$ ; normal: 1.0 - 1.7).

Estos hallazgos sugirieron un defecto en el metabolismo de piruvato (fig. 6). Lo que fue confirmado al estudiar la respuesta de la paciente a una carga oral de glucosa (9.7 mmol/Kg). Como se puede ver en la figura 7, las concentraciones sanguíneas de los ácidos pirúvico, y láctico (basalmente ya elevadas) se incrementaron aún más como consecuencia de la carga [57]. En personas normales, la concentración de estos ácidos no se incrementa después de administrar glucosa [58].



Existen dos posibilidades principales para un bloqueo en el metabolismo de piruvato: un defecto en la actividad del complejo multienzimático Piruvato Deshidrogenasa (PDH), el cual cataliza la conversión de piruvato a acetil CoA, como entrada al ciclo de Krebs o bien una deficiencia en la enzima piruvato carboxilasa (PC), que cataliza el paso de piruvato a oxaloacetato como inicio de la vía de gluconeogénesis y que además es una enzima anaplerótica del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

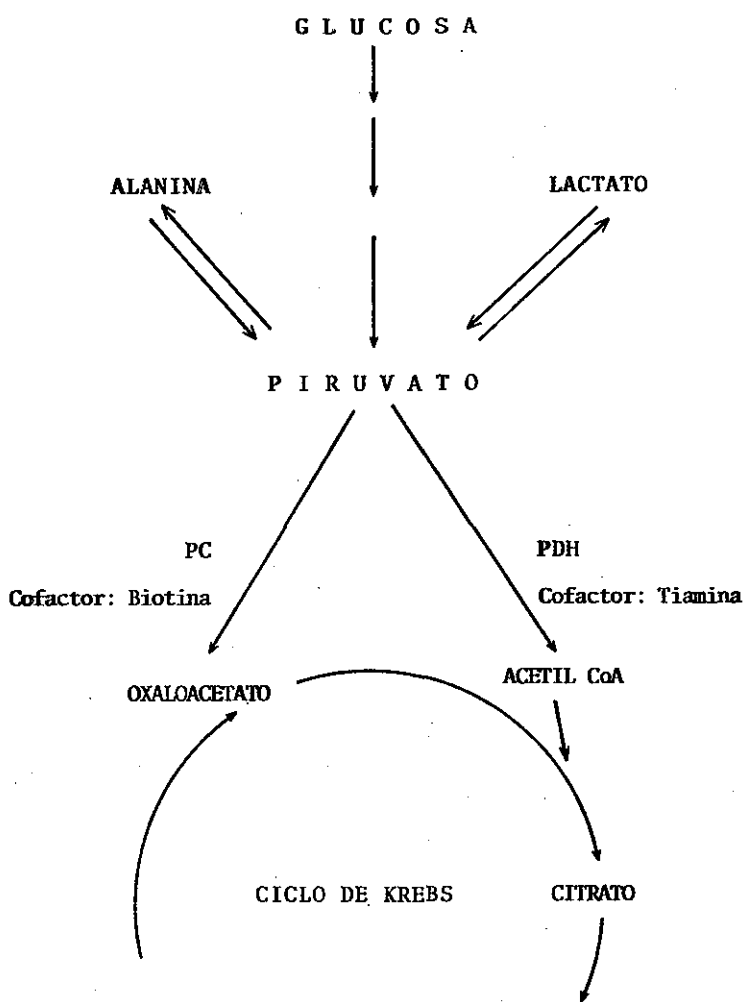
Ambas enzimas requieren para ser activadas de la presencia de vitaminas como cofactores. Tiamina para la PDH y biotina para la PC (ver figura 6).

Mientras se montaban métodos para dilucidar cual era el defecto enzimático en esta paciente, y como un intento de obtener una respuesta clínica, se administraron dosis farmacológicas tanto de tiamina como de biotina a la paciente. Como se puede observar en la figura 8, la concentración sanguínea de ácido pirúvico disminuyó a un valor cercano al normal cuando se administró biotina, incrementándose nuevamente al suprimirse esta vitamina, en tanto que no se observó ninguna respuesta a la administración de tiamina.

Estas observaciones sugirieron que el bloqueo metabólico en este caso se debía a una deficiencia de la enzima Piru-

to carboxilasa y que al parecer podía ser superada por dosis altas de su cofactor biotina. La paciente falleció como consecuencia de una bronconeumonía bilateral aguda a la edad de seis años.

Todos los resultados anteriores fueron obtenidos por -- otros miembros de la Unidad de Genética de la Nutrición. Los estudios que se describen a continuación los realicé como -- el trabajo de tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas (Bioquímica) y fueron llevados a cabo con el -- objeto de identificar y caracterizar el defecto enzimático -- en la paciente descrita.



**Fig. 6. Vía del Piruvato**

PC: Piruvato Carboxilasa

PDH: Piruvato Deshidrogenasa

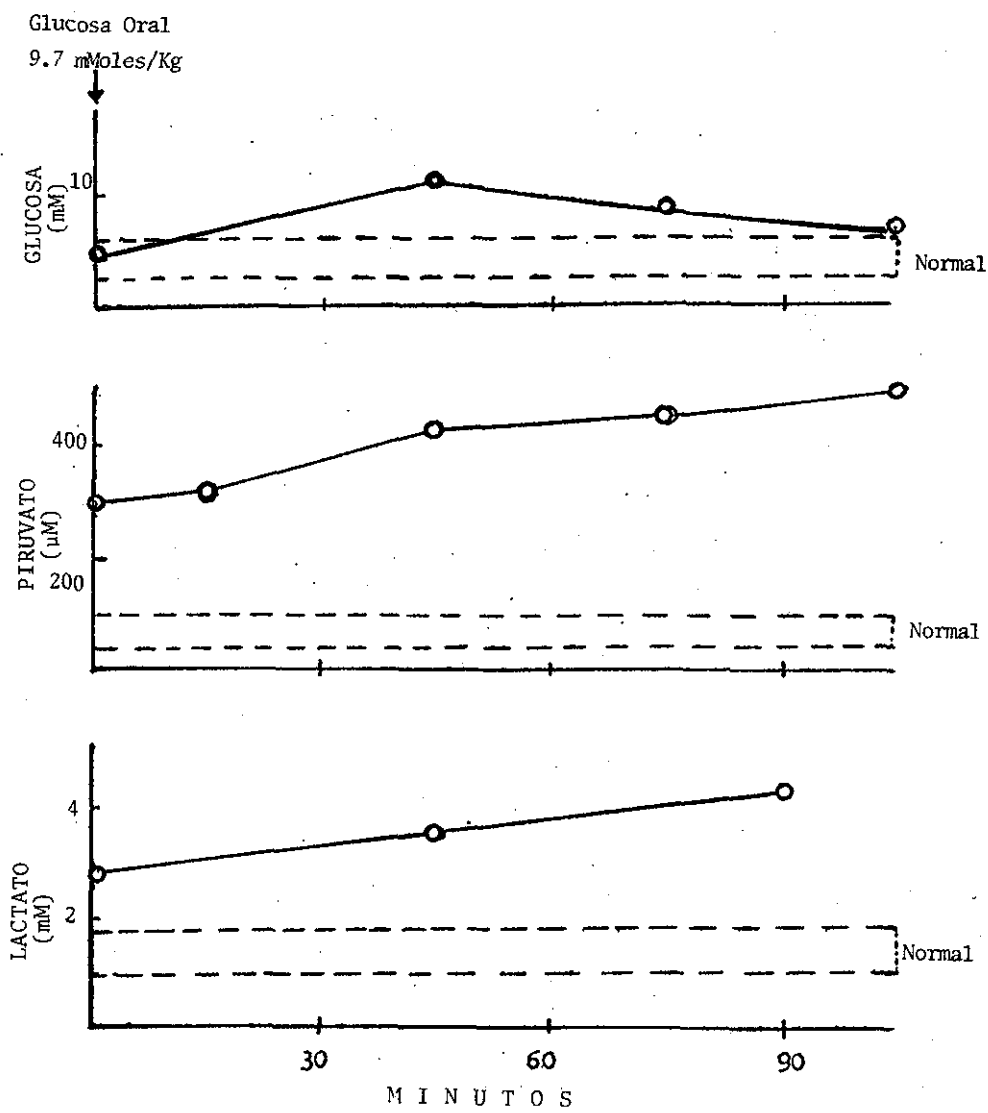


Fig. 7 Metabolitos sanguíneos después de una carga oral de glucosa.

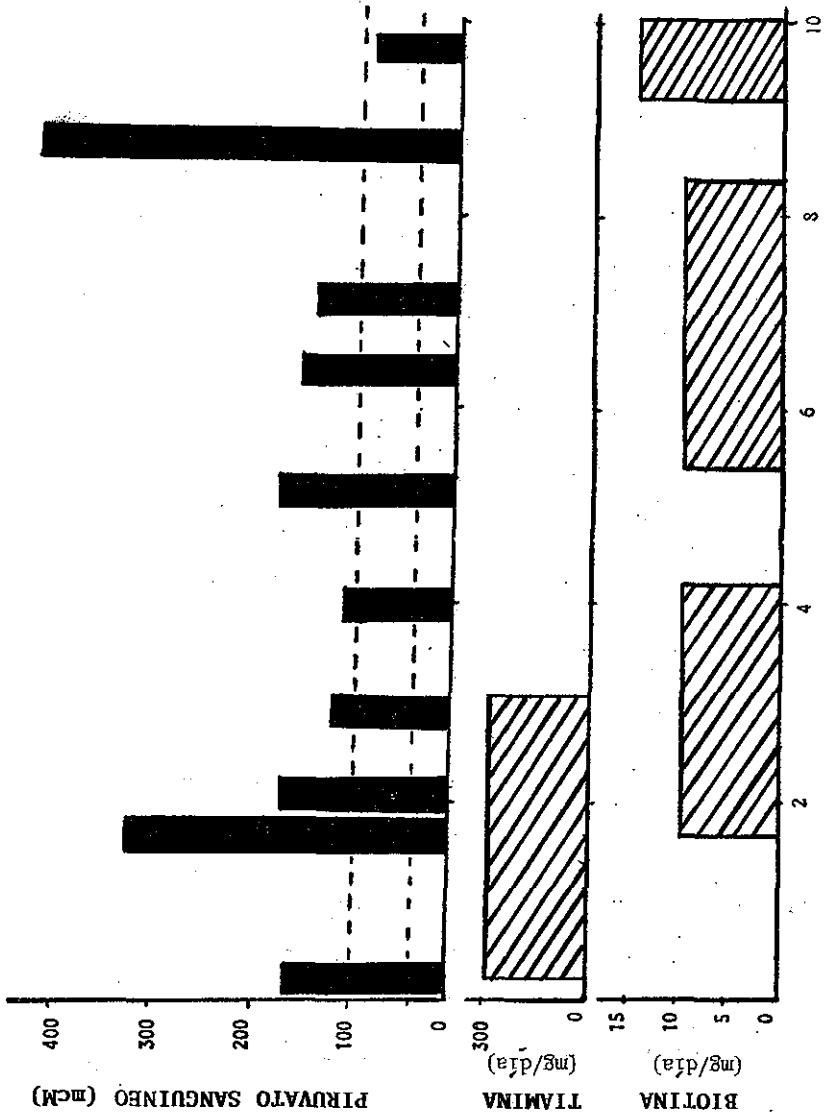


Fig. 8. Respuesta a Tiamina y Biotina.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## MATERIAL Y METODOS

## CULTIVO DE TEJIDOS.

### Medio de Cultivo para Fibroblastos (MEM):

Medio mínimo de Eagle en polvo (Gibco)	9.8 g/L
Bicarbonato de Sodio (J.T. Baker)	2.2 g/L
Piruvato de Sodio (Sigma Chemical Co.)	0.1 g/L
Suero Fetal Bovino (Microbiological Associates). Inactivado a 56°C/30 min.	120 ó 200 ml según se indique.

Este medio se esteriliza por filtración a presión a través de un filtro Millipore de 0.22 micras de poro. Se conserva en refrigeración a 4°C.

### Solución de Verseno.

EDTA (J. T. Baker)	2.0 g.
Cloruro de Sodio (J. T. Baker)	8.0 g.
Cloruro de Potasio (J. T. Baker)	4.0 g.
Tris-base (Merck)	3.0 g
Rojo de Fenol; Solución al 0.5% (Merck)	2.0 ml
Agua bidestilada	998 ml

### Solución de Tripsina:

Tripsina (Merck)	1.25 g
Solución de Verseno	500.0 ml

El pH de ambas soluciones se ajusta a 7.4 y se esteriliza por filtración a presión a través de un filtro Millipore de 0.22 micras de poro. Se pueden conservar a 4°C o bien en congelación a -20°C

#### **CULTIVO DE FIBROBLASTOS:**

El cultivo de fibroblastos de piel de la paciente se obtuvo con consentimiento informado, a partir de un explante de piel tomado sobre el músculo deltoides. (Realizado en el Instituto Nacional de Pediatría). Bajo anestesia local (xilocaína al 1%) y condiciones asépticas, se practicó una incisión en la piel obteniéndose varios fragmentos de aproximadamente 2 mm<sup>3</sup>. Estos fragmentos se colocaron en tubos de ensayo estériles, los cuales contenían 10 ml de medio de cultivo MEM, suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) más antibióticos, para su transportación a la Unidad de Genética de la Nutrición en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. A partir de ese momento, el manejo de los fragmentos se llevó a cabo siempre en forma esteril y dentro de una campana de flujo laminar. Entre 1 y 2 horas más tarde, los fragmentos de tejido fueron colocados en cajas de Petri, las cuales contenían medio MEM con objeto de que no se secase el tejido, el cual se cortó en pedazos más pequeños, empleando pin



zas y tijeras de disección. En seguida, estos pequeños fragmentos se colocaron en frascos de cultivo T-25 (25 cm<sup>2</sup> de área), tres fragmentos por frasco. A estos frascos previamente se les habían colocado 0.9 ml. de medio de cultivo MEM, suplementado con 20% de SFB y antibióticos. Este volumen fue suficiente para cubrir los explantes pero sin que llegaran a flotar. Se incubaron a 37°C en una estufa con un ambiente de 5% CO<sub>2</sub>, con objeto de mantener el pH del medio constante.

Aproximadamente después de 10 - 15 días de realizados los explantes, se pudo observar, alrededor de cada fragmento un gran número de fibroblastos. A partir de ese momento, el medio de cultivo, ya sin antibióticos y con 12% de SFB se cambió cada 2 o tres días. Una o dos semanas después, cuando ya había un gran número de células, estas fueron desprendidas mediante el empleo de las soluciones de Verseno y de tripsina y transferidas a frascos de cultivo T-75 (75 cm<sup>2</sup> de área). Al llegar estas células a confluencia, fueron subcultivadas a nuevos frascos T-75 con objeto de expandir la línea celular. Una vez logrado este propósito, aquellas células que no se utilizarían para experimentos fueron congeladas en nitrógeno líquido con el fin de evitar su envejecimiento y formar una especie de "banco" celular para cualquier eventualidad.

Las líneas celulares normales utilizadas como controles fueron derivadas a partir de prepucios de niños recién nacidos, sanos, en el Sanatorio Santa Teresa y gracias a la colaboración del Dr. Margarito Castañeda. Estos tejidos fueron manejados de una manera análoga a la de los fragmentos de piel mencionados líneas arriba.

Cuando se estudian enzimas dependientes de biotina, resulta de gran importancia la concentración de biotina en el medio de cultivo.

El medio mínimo esencial de Eagle preparado por Gibco, no contiene biotina en su formulación, de tal manera que toda la biotina presente en los cultivos es proporcionada por el suero fetal bovino que se adiciona al medio MEM.

La concentración de biotina es mucho mayor en el SFB que en el suero humano: 18 ng/ml en el primero, en tanto que en el segundo es de 0.15 ng/ml [43]. A pesar de la dilución que sufre el SFB, la concentración final de biotina en el medio MEM es al menos 10 veces mayor que la concentración promedio en el plasma o suero humanos. Más adelante se abundará sobre este punto.

Para la determinación de PC, PCC y MCC en fibroblastos en cultivo, el homogenado celular se preparó mediante una

modificación del método de Zurrendonk y Tager [59], el cual utiliza la atracción específica de la digitonina por el colesterol y la diferencia que existe entre las membranas mitocondriales y la membrana plasmática en cuanto a su contenido de este lípido. La membrana plasmática es muy rica en colesterol (Relación molar Colesterol/fosfolípidos = 0.76), la membrana externa mitocondrial contiene una cantidad relativamente baja de colesterol (Relación molar Colesterol/ fosfolípidos = 0.12) en tanto que la membrana interna mitocondrial -- prácticamente no contiene colesterol [60] . Las células fueron incubadas en presencia de una concentración de Digitoninina en la cual, tanto la membrana plasmática como la membrana externa mitocondrial son dañadas, mientras que la membrana interna de las mitocondrias permanece intacta. Este método fué descrito originalmente para hepatocitos de rata en suspensión [59, 60, 61].

Para los experimentos, las células se crecieron generalmente en cajas de Petri de 60 mm de diámetro o en frascos de cultivo.

Justo antes del ensayo, se retiró el medio de cultivo, las monocapas celulares se lavaron con 3-5 ml de solución salinina amortiguada "PBS", pH 7.4 (NaCl:8 g; KCl:0.2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1.15 g y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:0.2 g/Litro) y se expusieron durante 60 segundos a 3-5 ml de un medio frío que contenía: 20 mM MOPS --

(morfolino propano sulfonato de potasio), 3 mM EDTA; 0.25 M sacarosa y 1 mg/ml de Digitonina, ajustado a un pH de 7.2.

Pasados los 60 segundos, las células se rasparon y el homogenado resultante se diluyó al volumen requerido según el experimento con MOPS/sacarosa/EDTA sin Digitonina. Se mantuvo en hielo a 4°C hasta el ensayo.

Las carboxilasas son estables por cuando menos dos horas después de romper las células, por lo que los ensayos enzimáticos se realizaron siempre dentro de ese intervalo de tiempo.

#### **OBTENCION DE CELULAS SANGUINEAS MONONUCLEARES.**

La muestra se obtuvo mediante punción venosa, en una jeringa previamente heparinizada con una solución que contenía 5,000 U de Heparina/ml, utilizándose 0.02 ml por ml de sangre. La separación de células se realizó siguiendo el método descrito por Perper y cols. [62], el cual utiliza un gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals) cuya densidad es de 1.077. La muestra de sangre se diluyó 1:1 con PBS, mezclando suavemente con una pipeta Pasteur; utilizando la misma pipeta se aplicaron 4 ml de sangre diluida (cuidando de no mezclar) sobre 3 ml de Ficoll-Hypaque previamente colocados en un tubo de centrifuga de plástico (15 ml); y se centrifugaron a 2,500 rpm durante 35 - 40 minutos a temperatura ambiente.

Finalizada la centrifugación, se retiró y desechó la capa superior de plasma, se colectó la banda opaca intermedia que contenía las células mononucleares y se transfirió a otro tubo de centrifuga donde se lavaron las células dos veces -- con 3 ml de PBS, centrifugando a 1,500 rpm/10 min. en cada lavado. Finalmente se resuspendieron en 1 ml de medio ILU (Isohashi, Leiter y Utter; ref. 50): 50 mM de fosfato de potasio; 0.5 mM EDTA y 2 M de Sacarosa, ajustado a un pH de 7.4, y se congelaron a -70°C hasta el día del ensayo (31).

Las células se mantuvieron congeladas un máximo de seis meses antes de ensayarse. En ese tiempo no existen efectos apreciables sobre las actividades enzimáticas. No obstante esta apreciación, en los experimentos solo se utilizaron muestras que llevaban congeladas los periodos más similares posibles y las cuales se ensayaron el mismo día y no en experimentos diferentes.

Para la preparación del homogenado celular, las células se descongelaron justo antes del ensayo, se diluyeron con 7 volúmenes de buffer de fosfato de potasio 5 mM; 0.5 mM EDTA y 0.25 M de sacarosa, pH:7.0 y se centrifugaron a 3,000 rpm/10 min. a 4°C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml del mismo buffer, se homogenizaron por medio de 30 golpes en un homogenizador manual vidrio-vidrio, se congelaron y descongelaron tres veces en baño de -- hielo seco-acetona y se mantuvieron a 4°C hasta el ensayo, - el cual nunca se realizó después de dos horas.

## ENSAYOS ENZIMATICOS:

### Piruvato Carboxilasa.

La piruvato carboxilasa fue ensayada mediante una modificación del método de Atkin y Utter [31], el cual está basado en la incorporación de  $^{14}\text{CO}_2$ , utilizando piruvato como sustrato y en presencia de un exceso de citrato sintetasa. Esta enzima se adiciona dado que el oxaloacetato formado en la carboxilación del piruvato es muy inestable, por lo que es necesario condensarlo con Acetil CoA y formar citrato, un compuesto mucho más estable.

La mezcla de reacción contenía: Tris-HCl:45 mM;  $\text{MgCl}_2$ : 5 mM; ATP:2.0 mM; Acetil CoA:0.33 mM;  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  (0.1 mCi/mmol). 25 mM; Piruvato de Sodio:10 mM y 2.2 U de Citrato Sintetasa. el pH final de reacción fue de 7.8 y el volumen final de 1.0 ml.

El homogenado celular (fibroblastos o células sanguíneas mononucleares), se preincubó durante 4 minutos a  $37^\circ\text{C}$  con -- 250 mcg de Trirón X-100, con objeto de solubilizar las mitocondrias y exponer la enzima, y 4 minutos más en presencia de todos los componentes de la mezcla de reacción, excepto piruvato. La reacción se inició con la adición de piruvato (agua destilada para los blancos). La incubación se llevó a cabo a  $37^\circ\text{C}$ , al terminar esta, la reacción se paró colocando los tubos

en hielo seguido de la adición de 0.5 ml de ácido tricloacético al 20%.

Después de 15 minutos, los tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 3,000 rpm con objeto de remover la proteína precipitada. Un mililitro del sobrenadante se transfirió directamente a viales de centelleo, se agregó 0.5 ml de  $\text{NaHCO}_3$  250mM, se agitó vigorosamente y se dejaron destapados durante toda la noche, con objeto de eliminar el  $^{14}\text{CO}_2$  que no se hubiera incorporado en citrato. Al día siguiente se añadieron a cada vial, 10 ml de líquido de centelleo (Bray), se agitaron y se contaron en un espectrómetro de centelleo líquido Packard. Bajo estas condiciones, la radioactividad medida en el blanco de reacción fue de menos del 10% de la observada en los homogenizados de líneas controles. La eficiencia de conteo fue corregida utilizando Tolueno  $^{14}\text{C}$  como estandar externo. La proteína celular se midió siguiendo el método de Lowry y cols. [63].

#### **Propionil CoA y Beta-Metilcrotonil CoA Carboxilasas.**

La Propionil CoA carboxilasa y la beta-metilcrotonil Coa carboxilasa se midieron mediante un procedimiento similar al utilizado para la piruvato carboxilasa [43], pero con la siguiente mezcla de reacción:  $\text{MgCl}_2$ :4.6 mM;  $\text{KCl}$ :100 mM;  $\text{ATP}$ :3 mM;  $\text{Tris-HCl}$ : 66 mM,  $\text{KH}^{14}\text{CO}_2$  (8.55 mCi/mmol):4.6 mM; Propionil CoA:0.75 mM o beta-metilcrotonil CoA: 0.58 mM, para medir

PCC o MCC respectivamente. El pH final de reacción fue de -- 8.0 y el volumen final de 0.6 ml. La temperatura de incubación fue de 37°C, después de lo cual se procedió de la misma manera ya descrita para la determinación de PC.

### **Sintetasa de Holocarboxilasas.**

La actividad de la sintetasa de holocarboxilasas se estimó, de una manera indirecta, midiendo la actividad de una de las carboxilasas mitocondriales, generalmente la Propionil-CoA carboxilasa, en un homogenado de fibroblastos depletados de Biotina (donde las diferentes carboxilasas se acumulan como apoenzimas inactivas, refs: 46, 47) antes y después de una preincubación en presencia de ATP y biotina, según una modificación del método descrito por Saunders y cols. para células linfoblastoides en cultivo [47]. El incremento en la actividad de PCC, representa el efecto de la actividad de la sintetasa.

El depletado de biotina se logró creciendo las células durante 2 subcultivos (2 semanas) en medio MEM (sin biotina en su formulación) suplementado con 12% de suero fetal bovino, el cual se había pasado previamente a través de una columna de Avidina-agarosa (0.5 cm x 5 cm, Sigma Chemical Co.), con una actividad de 15 U de avidina/ml de gel empacado. La avi-



dina una de manera específica y prácticamente irreversible toda la biotina que contiene normalmente el suero fetal [64].

Con objeto de comprobar que el suero se encontraba libre de biotina después de la columna, antes de pasarlo por la misma se le agregó biotina  $H^3$  de alta actividad específica, encontrando que nada de la radioactividad permanecía en el suero - después de la columna de avidina.

Cultivadas en este medio sin biotina, las células crecen de manera indistinguible de aquellas cultivadas en medio MEM normal durante los dos subcultivos mencionados, a partir del tercer subcultivo el crecimiento es más lento y eventualmente las células dejan de crecer y mueren.

El homogenado celular se preparó de la siguiente manera: a un frasco de cultivo T-75 confluyente y depletado de biotina se le retiró el medio, se lavó la monocapa celular con 5 ml de PBS en dos ocasiones, se agregaron 0.5 ml de agua destilada y se congeló a  $-20^{\circ}C$  por lo menos durante una hora.

Pasado ese tiempo, se descongeló, se raspó la monocapa y este homogenado se conservó a  $4^{\circ}C$  hasta el ensayo, que siempre se realizó dentro de la hora siguiente.

La mezcla de reacción para la preincubación contenía:

Tris-HCl: 100 mM;  $MgCl_2$ : 8.0 mM; KCl: 50 mM; Glutati3n reduci-  
do: 2.5 mM; ATP: 3 mM; Biotina en concentraciones variables se  
g3n se indique y protefna celular entre 0.5 y 1.0 mg por tubo.  
El pH final de reacci3n fu3 de 8,0 y el volumen final de 0.6-  
ml. Se incub3 a 30°C durante una hora.

La reacci3n se inici3 con la adici3n de la protefna ce-  
lular y se detuvo colocando los tubos en hielo. Se tomaron -  
alfcuotas de cada tubo para medir la actividad de PCC de acuer-  
do al m3todo descrito anteriormente. Los blancos para la de-  
terminaci3n de la sintetasa se prepararon omitiendo tanto la  
biotina como el ATP de la mezcla de preincubaci3n .

## DETERMINACIONES DE METABOLITOS.

Las concentraciones de alanina tanto en orina como en plasma se determinaron mediante cromatografía de capa fina, según el método de Shaw y cols. [65]. Las concentraciones plasmáticas de glucosa así como de los ácidos pirúvico y láctico se midieron por métodos enzimáticos [66]. Los ácidos orgánicos en orina se estudiaron por cromatografía gas líquido [67].

Todas estas determinaciones fueron realizadas por personal de la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

La identificación de los metabolitos por medio de espectrometría de masas, fue practicada por el Dr. S. Cederbaum de la Universidad de California en los Angeles, EUA.

La concentración de biotina en plasma fue medida por el Dr. J. Thoene de la Universidad de Michigan, EUA.

## RESULTADOS

## RESULTADOS:

Los resultados preliminares obtenidos en el laboratorio sugerían una deficiencia en la enzima Piruvato carboxilasa.

Para poner a prueba esta hipótesis, se montó la metodología para medir la actividad de esta enzima en fibroblastos de piel en cultivo, normales y de la paciente.

Con objeto de dar validez al método empleado, primero se determinó la relación de la actividad enzimática con respecto a la concentración de proteína celular utilizada y al tiempo de reacción. La figura 9 muestra que existe relación lineal entre la actividad de PC y la cantidad de proteína -- adicionada, en el intervalo de 0 a 300  $\mu$ g, en tanto que en la figura 10 puede observarse que hay linealidad con respecto al tiempo de reacción cuando menos durante los primeros 90 minutos de incubación. Estos datos indican que dentro de esos intervalos la reacción se lleva a cabo en condiciones no limitantes de sustratos y cofactores y de máxima actividad de la enzima, por lo tanto todos los experimentos reportados se realizaron siempre dentro de los intervalos de tiempo y proteína indicados.

Bartlett y cols. [43] reportaron que las actividades de las diferentes carboxilasas mitocondriales en células en cultivo, muestran variación dependiendo de la fase de cultivo -

en que se encuentren, mostrando sus niveles máximos y más constantes entre los 3 a 8 días después de alcanzada la confluencia; nosotros encontramos un comportamiento similar, - por lo que los ensayos se realizaron siempre 5 días después de que los cultivos habían alcanzado el grado de confluencia.

En el cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos: la actividad de PC en los fibroblastos de la paciente se encontraba disminuida, aproximadamente 15% de la presentada por el control. Asimismo, en la figura 11 puede observarse una cinética de actividad de PC en función de concentraciones variables de uno de sus sustratos, piruvato, donde se aprecia - que comparada con el control, la PC de fibroblastos de la paciente presentaba aproximadamente 20% de la actividad máxima normal, aunque la Km aparente para piruvato era similar en ambos casos, figura 12. Estos datos apoyaban fuertemente la deficiencia de PC.

En vista del efecto de altas dosis de biotina sobre los niveles sanguíneos de ácido pirúvico en la paciente, la cual se podría explicar por una activación "in vivo" de la PC por su cofactor, estudiamos el efecto de altas concentraciones - de biotina sobre fibroblastos en cultivo. Medimos la actividad de PC en células crecidas en un medio normal, sin biotina

adicionada, donde la única fuente de biotina es el suero fetal bovino (7.5 nM de biotina), y células crecidas durante 10 días con aproximadamente 500 veces la concentración normal de biotina (1 mg de biotina/litro de MEM:4  $\mu$ M). Los resultados pueden observarse en el cuadro 4. Cuando se comparó la actividad enzimática en el cultivo de la paciente con la observada en seis líneas celulares normales, en un medio normal la enzima se encontraba deficiente (20% de la actividad normal), mientras que en un medio rico en biotina esta actividad de incrementaba hasta cerca del 50% de lo normal. En las líneas celulares controles no se observaron cambios significativos en la actividad de PC. Con estos datos se comprobó que la paciente tenía una deficiencia de PC y que respondía parcialmente a biotina.

Como se describió en antecedentes, en los pacientes deficientes de carboxilasas reportados por otros autores, la respuesta a grandes cantidades de biotina solo se observa cuando la deficiencia es múltiple y afecta a todas las carboxilasas y no cuando se trata de una deficiencia aislada de alguna de ellas [29, 39, 44, 45].

Para descartar una deficiencia múltiple de carboxilasas, era necesario medir las actividades de las otras carboxilasas mitocondriales: Propionil CoA carboxilasa y beta-Metilcro

tonil CoA carboxilasa en las células de la paciente. Por esta razón se montó la metodología para medir estas enzimas, tanto en fibroblastos en cultivo como en células sanguíneas-mononucleares. En las figuras 13 y 14 puede observarse la linealidad de PCC con respecto a la cantidad de proteína celular utilizada y al tiempo de incubación en fibroblastos en cultivo, siendo de 0 - 150  $\mu\text{g}$  y hasta 60 minutos respectivamente.

Las figuras 15 y 16 corresponden a los estudios de linealidad de la actividad de MCC en fibroblastos en cultivo, encontrándose los mismos intervalos que para PCC, o sea, 0 - 150  $\mu\text{g}$  para la cantidad de proteína y hasta 60 minutos para el tiempo de reacción.

Por lo que respecta a las células sanguíneas mononucleares, se montaron los ensayos para PC y PCC solamente. En la figura 17 se muestra la linealidad existente entre la actividad de PC y la concentración de proteína celular, 0 - 100  $\mu\text{g}$ , en tanto que en la figura 18 los resultados correspondientes para el tiempo de incubación, siendo de hasta 90 minutos. En cuanto a la PCC, la linealidad con respecto a la proteína, figura 19, fue entre 0 - 75  $\mu\text{g}$  y para el tiempo de reacción de hasta 60 minutos, figura 20. Todos los experimentos reportados se realizaron dentro de los intervalos mencionados, dependiendo de la enzima y del tipo celular del que se tratara.



Utilizando fibroblastos en cultivo, se midieron simultáneamente las actividades de las tres carboxilasas mitocondriales en células crecidas en un medio normal, sin biotina adicionada y en células crecidas en un medio rico en biotina (1 mg/litro). Los resultados se muestran en el cuadro 5, donde puede observarse que cuando las células fueron crecidas en un medio normal, las actividades de las tres carboxilasas en las células de la paciente se encontraban disminuidas, --- 15-20% de los controles y que estas actividades se incrementaban hasta aproximadamente 40-50% de las presentadas por los controles cuando las células se crecieron en un medio rico en biotina. Dados los resultados pudimos concluir que se trataba de una Deficiencia Múltiple de Carboxilasas que respondía parcialmente a biotina. Esta deficiencia fue comprobada en células sanguíneas mononucleares de la paciente, cuadro 6, al medir las actividades de dos de las carboxilasas, PC y PCC y encontrarlas claramente disminuidas. No es necesario medir las actividades de todas las carboxilasas, puesto que el encontrar a dos de ellas deficientes es indicativo de una deficiencia múltiple y la actividad de la MCC seguramente se encontraría disminuida en estas células como se encontró en los fibroblastos de la paciente ( Ver Introducción y Antecedentes).

En la mayoría de los pacientes con DMC estudiados hasta la fecha, se ha observado excreción urinaria de metabolitos -

asociados con un bloqueo en dos diferentes vías metabólicas en que participan dos distintas carboxilasas, PC y PCC, (ácidos lácticos, metilcátrico, 3-hidroxi propiónico,  $\beta$ -hidroxiisovalérico, así como de propionil glicina), (25, 28, 19). Mediante análisis por cromatografía de gases de ácidos orgánicos en orina de la paciente, solo fue posible detectar -- excreción anormal de ácido láctico y no de los otros metabolitos esperados en una DMC. Se envió entonces una muestra de orina al Dr. Stephen Cederbaum del Instituto Neuropsiquiátrico de la Universidad de California en Los Angeles, quien mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas, encontró excreción anormal de los ácidos láctico, metilcátrico e hidroxipropiónico. La excreción de estos ácidos -- esta asociada con un bloqueo tanto de PC como de PCC.

Esto concuerda con una DMC y nos permitió confirmar el defecto bioquímico en la paciente.

Se han descrito dos formas distintas de Deficiencia - Múltiple de Carboxilasas: la forma Neonatal y la forma Tardía o Juvenil (ver antecedentes). Aunque esta clasificación es eminentemente clínica, se ha podido asociar con cada una de ellas un defecto bioquímico específico:

- a) Deficiencia de la enzima Sintetasa de Holocarboxilasas, la cual se encarga de unir de manera covalente la biotina a las distintas apocarboxilasas (inacti-

vas) para formar las holocarboxilasas (activas; -- asociada con la forma neonatal [46, 47, 68] y

- b) Deficiencia de biotina, debida a una deficiencia - en la actividad de la enzima biotinidasa. Esta en zima se encarga de hidrolizar la biocitina (biotinil-lisina) proveniente de la degradación de las - holocarboxilasas y liberar la biotina que puede ser reutilizada para síntesis de nuevas moléculas de - holocarboxilasas. La biotinidasa se ha encontrado deficiente en el plasma de todos los pacientes has ta ahora estudiados, que presentaban la forma ju- venil de la DMC [50, 69].

La mejor forma de distinguir entre estas dos formas de DMC es mediante estudios en fibroblastos en cultivo.

Cuando los fibroblastos con deficiencia de SHC se cre- cen en un medio de cultivo con la concentración normal de- biotina, las actividades de las carboxilasas se encuentran por abajo de lo normal, pero cuando estos fibroblastos son cultivados en un medio que contenga una concentración alta de biotina (100 veces o más la normal), las actividades de las carboxilasas se incrementan incluso alcanzando valo- res normales. Esto puede explicarse dado que estas célu- las sintetizan cantidades normales de las diferentes apo- carboxilasas [29], pero debido a la deficiencia de SHC no- pueden formar las holocarboxilasas correspondientes, aún -

en concentraciones adecuadas de biotina. En los pacientes con deficiencia de SHC estudiados hasta ahora [46, 47], - se ha encontrado que el defecto se encuentra en una Km para biotina aumentada, de tal forma que aumentando la concentración de biotina por arriba de esta Km, eventualmente se llega a alcanzar la actividad normal de la SHC y a poder biotinizar las diferentes apocarboxilasas a una velocidad -- normal.

En la forma juvenil de DMC, lo que parece suceder es que debido a la deficiencia de biotinidasa, no existe una disponibilidad adecuada de biotina para la síntesis de holocarboxilasas. Se ha postulado que la biotinidasa está - involucrada, tanto en el reciclaje de la biotina endógena a partir de la biocitina proveniente de la degradación de las holocarboxilasas, como en el aprovechamiento de la biotina proveniente de la dieta [51]. Esto último está apoyado por el hecho de que la mayoría de la biotina en los alimentos - está unida a proteínas [8,70], y a que se ha encontrado actividad de biotinidasa en el jugo pancreático y en las células del epitelio intestinal [51,70]. Se cree que las - proteínas que contienen biotina son degradadas por las distintas proteasas digestivas hasta biocitina o biotinil-péptidos, los cuales son hidrolizados por la biotinidasa proveniente del jugo pancreático para liberar biotina y que -

de esta forma sea absorbida por el intestino. Otra posibilidad sería que la biocitina o bien los biotinil-péptidos fueran absorbidos como tales y que sea en el interior de las células intestinales (donde existe biotinidasa), donde sea liberada la biotina [51]. En los pacientes con deficiencia de Biotinidasa se han encontrado concentraciones sanguíneas de biotina cerca del límite inferior normal o subnormales, existe además la posibilidad de que la especie que se determinó fuera biocitina más que biotina, dado que los métodos de cuantificación empleados (microbiológicos o por dilución isotópica) no distinguen entre esas dos especies.

Tomando en cuenta lo anterior, en los pacientes con deficiencia de biotinidasa no existe uno de los sustratos (biotina) y no es posible formar las holocarboxilasas, a pesar de que tanto las apocarboxilasas como la SHC son completamente normales y se encuentran en cantidades adecuadas.

Quando se colocan a los fibroblastos de estos pacientes en las concentraciones que comunmente se emplean en los medios de cultivo (biotina en su forma libre) aproximadamente  $7.5 \mu\text{M}$ , las holocarboxilasas son sintetizadas normalmente y sus actividades no difieren de las presentadas por células normales.

Dadas estas características de las diferentes formas de DMC y en función de los resultados de los estudios realizados en los fibroblastos en cultivo de la paciente, la causa más probable de su enfermedad era una deficiencia

de la Sintetasa de Holocarboxilasas, (SHC).

Con el fin de comprobar esta hipótesis, se montó un ensayo que permitió tener una idea aproximada de la actividad de la SHC.

En este ensayo, la actividad de la SHC se estimó, de manera indirecta, midiendo la actividad de PCC, en un homogenado de fibroblastos previamente depletados de biotina, antes y después de una preincubación en presencia de ATP y biotina. El incremento en la actividad de la PCC representó el efecto de la actividad de la sintetasa.

Las actividades de las carboxilasas después de dos -- subcultivos en medio MEM sin biotina (ver material y métodos), son de 2-5% de las presentadas por células crecidas -- en medio MEM normal, cuya concentración de biotina es de -- aproximadamente 7:4 nM. Esta concentración de biotina es -- más que suficiente para mantener las actividades de las carboxilasas en niveles máximos en células normales en cultivo [71]. Esto lo hemos comprobado creciendo células normales en medios con 100 ó 1,000 veces más cantidad de biotina, -- sin que se observe un aumento apreciable en las actividades de las carboxilasas.

Con éste método indirecto de estimación de la actividad de SHC, aún después de la preincubación con ATP y biotina, no fue posible la recuperación del 100% de la actividad

de carboxilasas que presentaban las células crecidas en medio normal. Saunders y cols. reportaron una recuperación de entre el 30 y 40% [47]; la lograda en nuestro caso, -- 50% para PCC, concuerda con la reportada. Este fenómeno puede deberse a desnaturalización de la sintetasa o de las apocarboxilasas durante el procesamiento de los fibroblastos, o quizá a pérdida de algún factor desconocido hasta ahora, pero esencial para el proceso de biotinización. También se ha reportado que las carboxilasas son menos estables cuando se encuentran en su forma "apo" que en su forma "holo" [71].

En la figura 21 se observa la relación entre la concentración de proteína celular y actividad enzimática, la cual muestra un comportamiento de tipo exponencial, curvado hacia arriba. Esto se observó tanto en células normales, como en células de la paciente, encontrándose en este último caso actividades muy por abajo de las presentadas por el control. Este comportamiento es característico de enzimas que requieren de la presencia de un activador [83]. No se conoce ningún activador para la SHC, lo cual no significa que no exista y que esté presente en el homogenado celular, siendo adicionado junto con la enzima a la mezcla de reacción, de tal manera que al irse incrementando la concentración, una mayor proporción de la enzima estará en la forma activa, obteniéndose la curva de actividad en forma curvada hacia arriba.

Otra posibilidad es cuando la enzima activa consiste de un complejo de sub-unidades, las cuales son inactivas - en forma individual, siendo activadas cuando se combinan, - en una especie de cooperatividad positiva. El aumento en la concentración favorece la agregación de la enzima, originando que la curva de actividad tome la forma exponencial. Esta situación ha sido descrita previamente para la enzima 6-fosfofructuquinasa [84].

En este ensayo es necesario utilizar una concentración grande de proteína celular para obtener actividades lo suficientemente altas y poder comparar a la paciente con los controles, por esta razón, siempre se utilizó aproximadamente 1.0 mg de proteína por tubo de ensayo en las determinaciones de la SHC.

En la figura 22 se muestra una cinética de actividad de SHC en función de concentraciones crecientes de biotina, donde puede observarse que comparada con el control, la SHC presentaba aproximadamente 15% de la actividad normal. - Es de notarse que el defecto parece encontrarse en la velocidad máxima de la enzima y no en la Km aparente para biotina (figuras 22, 23 y cuadro 7).

Estos datos muestran que la paciente tenía una Defi--ciencia Múltiple de Carboxilasas debida a una deficiencia-



en la actividad de la Sintetasa de Holocarboxilasas.

Como parte de los primeros estudios que se realizaron en la paciente descrita, una prueba adicional fue un ayuno de 24 horas. Durante este periodo la paciente se mantuvo normoglicémica, se elevaron los cuerpos cetónicos en la sangre y, las concentraciones de lactato y piruvato (elevadas antes del ayuno) descendieron a valores casi normales (72). Estos resultados fueron paradójicos ya que en un paciente con una deficiencia de piruvato carboxilasa (enzima clave en gluconeogénesis) se esperaría una incapacidad para mantener la glicemia normal, o sea formar glucosa a partir de sustratos gluconeogénicos como piruvato y aminoácidos.

También llamó la atención la disminución de los ácidos láctico y pirúvico, lo cual podría explicarse en esta paciente, por un aumento en la actividad de la enzima Piruvato deshidrogenasa, derivando el piruvato a acetil CoA como alimentador del ciclo de Krebs. Esto es improbable ya que en el ayuno se produce gran cantidad de acetil CoA a partir de los ácidos grasos por el proceso de la  $\beta$ -oxidación y el acetil CoA es un reconocido inhibidor del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (27).

Para explicar estos resultados, se sugirió que la movilización de grasas produjo una elevación en la poza de ace

til CoA (evidenciado por el aumento en la concentración de los cuerpos cetónicos), y que el acetil CoA, reconocido activador de la piruvato carboxilasa, pudiera haber activado a la PC de esta paciente, dando un mayor flujo metabólico a través de la vía gluconeogénica, disminuyendo así las concentraciones de lactato y piruvato en el plasma de la pa-  
ciente y manteniendo la glicemia en niveles normales.

Con el fin de comprobar esta hipótesis, y pensando también en obtener alguna mejoría clínica, fue que se estudió - el efecto de un estado de cetosis en la paciente. Este estádo se indujo mediante dos procedimientos distintos: un ayuno prolongado (48 hrs.) y la administración de una dieta cetogénica.

Las dietas cetogénicas se han utilizado en algunos errores innatos del metabolismo, como es el caso de acidosis láctico pirúvica debida a una deficiencia de piruvato deshidrogenasa [58,73]. Por otro lado, este tipo de tratamiento se ha utilizado como un intento de controlar las crisis convulsivas en pacientes donde el empleo de productos anticonvulsionantes no llega a tener efecto [74, 75].

Con base en este último punto fue que también se buscó, mediante la dieta cetogénica, disminuir la frecuencia de las crisis convulsivas en la paciente.

La dieta cetogénica administrada contenía una relación entre grasas y proteínas + carbohidratos de 2.75:1. La base de esta dieta fue aceite de coco, aprovechando su alto contenido de triglicéridos de cadena media, 15% (cuadro 8). Se ha reportado [75] que las dietas a base de triglicéridos de cadena media son más efectivas que las llamadas "altas en lípidos", ya que se requiere de un menor porcentaje de estos triglicéridos para producir el mismo efecto cetogénico que la dieta alta en lípidos. Esto puede deberse a que los ácidos grasos de cadena media no necesitan de la participación de carnitina para su transporte al interior de las mitocondrias, donde se lleva a cabo su oxidación hasta acetyl CoA.

La dieta se administró a la paciente durante un mes -- aproximadamente. Durante el periodo de ayuno y los siguientes 15 días, la niña permaneció constantemente vigilada en la Unidad de Terapia Intensiva del Instituto Nacional de - Pediatría.

Los resultados se presentan en la figura 24. Durante el ayuno, los cuerpos cetónicos en sangre se elevaron por arriba de los valores normales, al mismo tiempo que aparecía cetonuria. La concentración del ácido pirúvico en sangre, inicialmente elevada, disminuyó a valores normales, la glucosa bajó, aunque nunca se presentaron síntomas de hipoglicemia clínica y las convulsiones desaparecieron. La dieta cetogénica se inició con una relación grasas:proteínas + carbohidratos de 2:1, con lo cual no se mantuvo el estado ce

tónico: los cuerpos cetónicos en sangre disminuyeron y la cetonuria desapareció, al mismo tiempo que el ácido pirúvico volvió a elevarse y las convulsiones se reiniciaron. Fue necesario llevar la proporción entre grasas y proteínas + carbohidratos hasta 2.75:1 para que se mantuviera la cetonuria, así como elevados los cuerpos cetónicos en sangre. La concentración de ácido pirúvico se mantuvo dentro de límites normales y las convulsiones cedieron, al mismo tiempo que la paciente permaneció normoglicémica. El diseño de las diferentes dietas fue realizado por la Licenciada en Nutrición Laura M. González Alarcón y las mediciones en sangre de los diferentes metabolitos, fueron realizados por la Q.F.B. Carmen Garay como parte de sus respectivos trabajos de tesis profesionales.

Al medir las actividades de PC y PCC en células sanguíneas mononucleares, encontramos que antes del tratamiento, las actividades de ambas enzimas se encontraban disminuidas, pero después de la dieta la actividad de PC se había incrementado a niveles casi normales, en tanto que la actividad de PCC no se modificó en el mismo grado, (cuadro 9).

En un estado de cetosis, que consiste en que están elevados los cuerpos cetónicos: beta-hidroxibutirato y acetooacetato, puede postularse que esto sea un reflejo de un aumento en la poza de acetyl CoA. Se sabe que el acetyl CoA-

es un modulador positivo específico de la PC [19, 25, 26, - 76], pudiera ser que en las células de la paciente estuviera ocurriendo una activación de la holo PC por este metabolito, hasta niveles cercanos a la función normal.

Con objeto de poner a prueba esta idea, medimos la activación de PC por acetil CoA, en un homogenado de fibroblastos de la paciente, incubado con concentraciones crecientes del modulador. En la figura 25 puede observarse que aún a concentraciones muy altas de acetil CoA, la actividad de PC no superó nunca el 25% de la actividad alcanzada por homogenados de células normales. En otras palabras, aunque estos estados de cetosis "in vivo" parecían normalizar la actividad de PC -documentado tanto por su medición en células sanguíneas mononucleares, como por la disminución del piruvato sanguíneo-, esto no se lograba en homogenados celulares, aún a concentraciones muy altas de acetil CoA. En la discusión se consideran mecanismos alternos que quizá puedan explicar los resultados obtenidos.

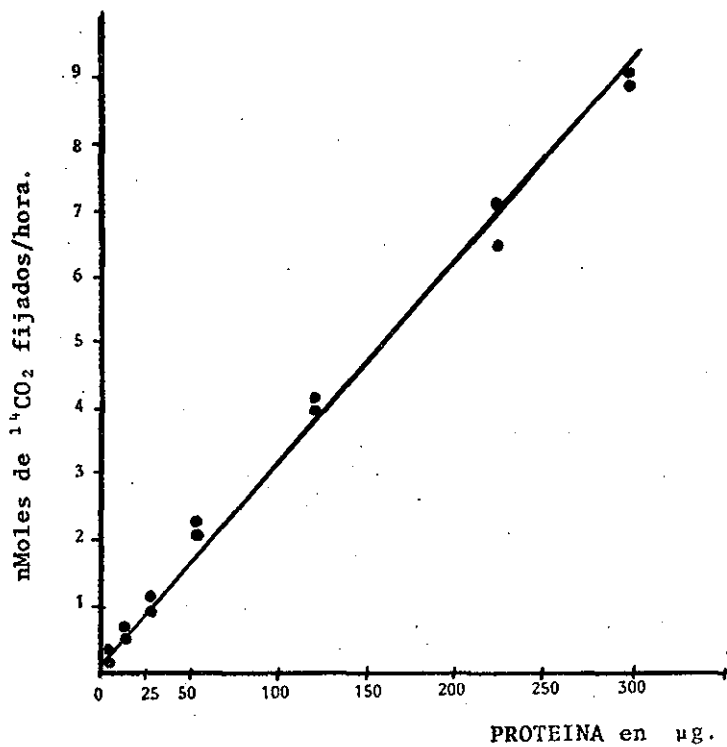


Fig. 9 Actividad de Piruvato carboxilasa vs Proteína en fibroblastos humanos en cultivo.

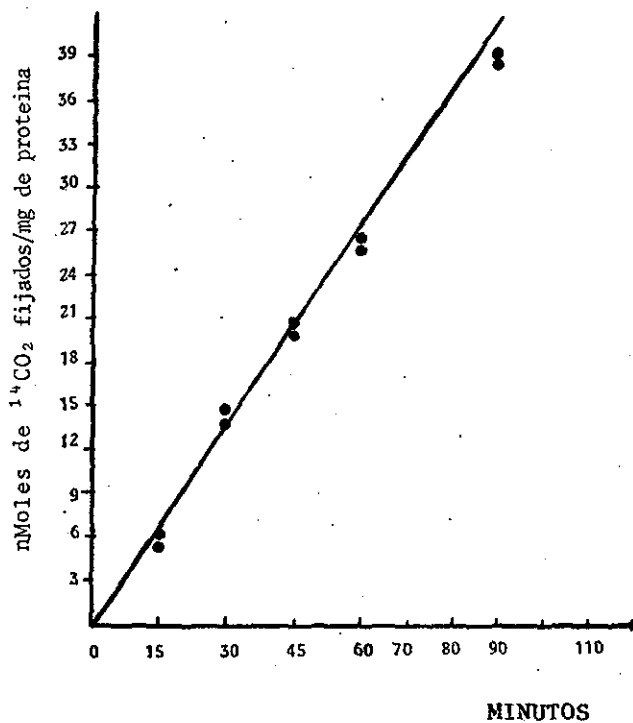


Fig. 10 Actividad de Piruvato carboxilasa vs Tiempo en fibroblastos humanos en cultivo

C U A D R O 3

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE PIRUVATO CARBOXILASA EN FIBROBLASTOS EN CULTIVO,  
NORMALES Y EN UNA PACIENTE CON ACIDOSIS LACTICO-PIRUVICA

---

nmoles  $^{14}\text{CO}_2$  fijados/  
mg de protefna x hora.

---

LINEA CELULAR

CONTROL

38.08  $\pm$  1.15

PACIENTE

5.35  $\pm$  0.90

---

Los resultados representan la medida de 4 determinaciones  $\pm$  la desviación estandar.



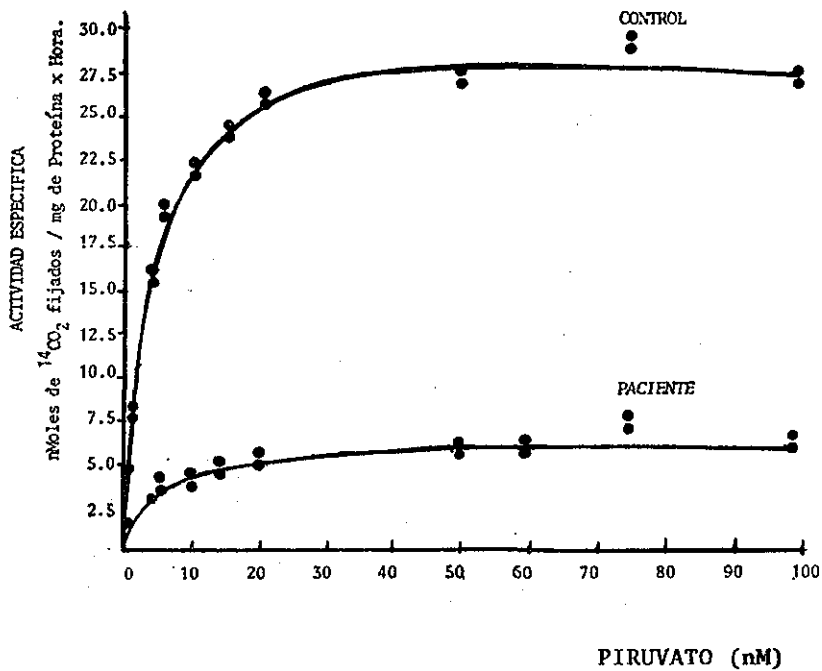


Fig. 11 Actividad de Piruvato carboxilasa vs Piruvato en fibroblastos humanos en cultivo

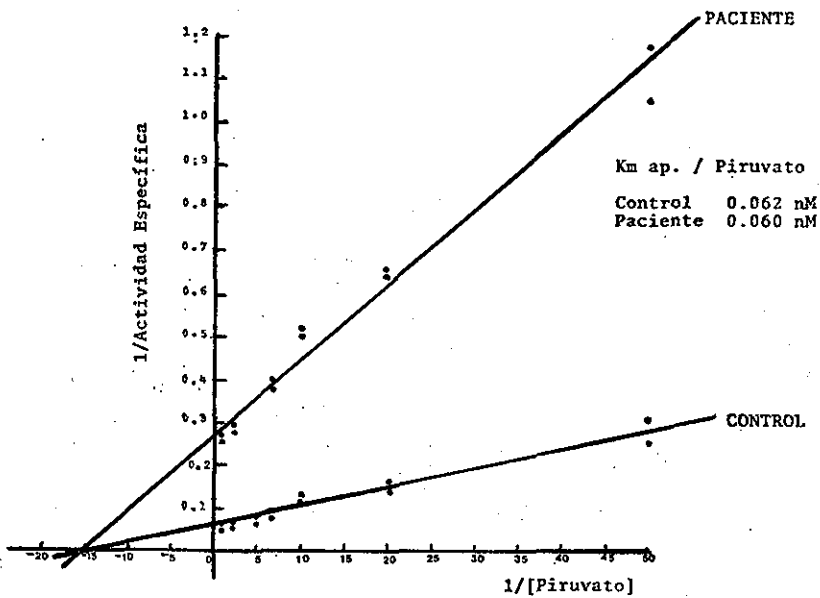


Fig. 12 Actividad de Piruvato carboxilasa vs Piruvato en fibroblastos humanos. Doble recíproco.

C U A D R O 4

ACTIVIDAD\* DE PIRUVATO CARBOXILASA EN FIBROBLASTOS HUMANOS  
CRECIDOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BIOTINA

CONCENTRACION DE BIOTINA EN EL MEDIO DE CULTIVO

	7.5 nM <sup>a</sup>	4 μM <sup>b</sup>
CONTROL 1	47.74 ± 9.83	55.00 ± 3.0
CONTROL 2	70.62 ± 2.57	72.87 ± 0.75
CONTROL 3	52.90 ± 0.25	50.42 ± 0.62
CONTROL 4	40.57 ± 1.80	40.68 ± 0.66
CONTROL 5	27.50 ± 0.64	31.87 ± 0.54
CONTROL 6	47.80 ± 1.14	38.95 ± 1.61
MEDIA DE CONTROLES	47.86 ± 14.22	48.30 ± 14.62
PACIENTE	9.01 ± 0.46	21.64 ± 2.19

\* Actividad Específica como: nMoles de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fijados/mg Proteína x hora.

<sup>a</sup> Células cultivadas en MEM, sin biotina adicionada, 7.5 nM.

<sup>b</sup> Células cultivadas en MEM + 1 mg/L de biotina, 4 μM.

Los valores son la media ± la desviación estandar de ensayos por triplicado.

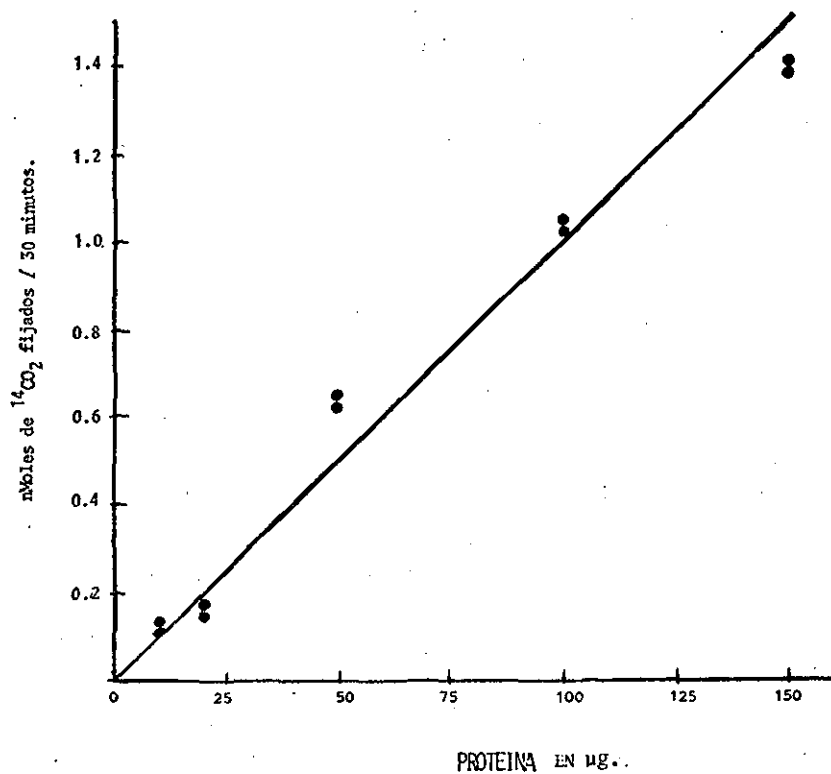


Fig. 13 Actividad de Propionil CoA carboxilasa vs Proteína en fibroblastos humanos en cultivo.

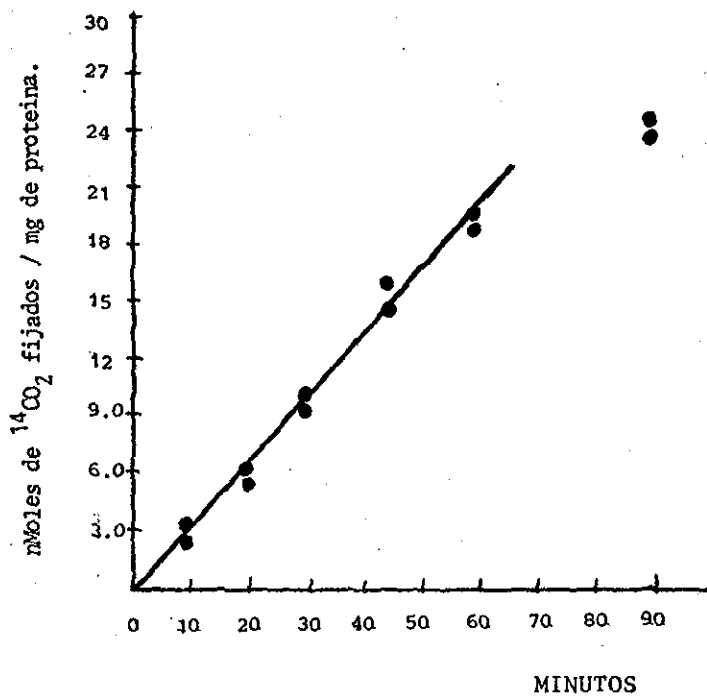


Fig. 14 Actividad de Propionil CoA carboxilasa vs Tiempo en fibroblastos humanos en cultivo.

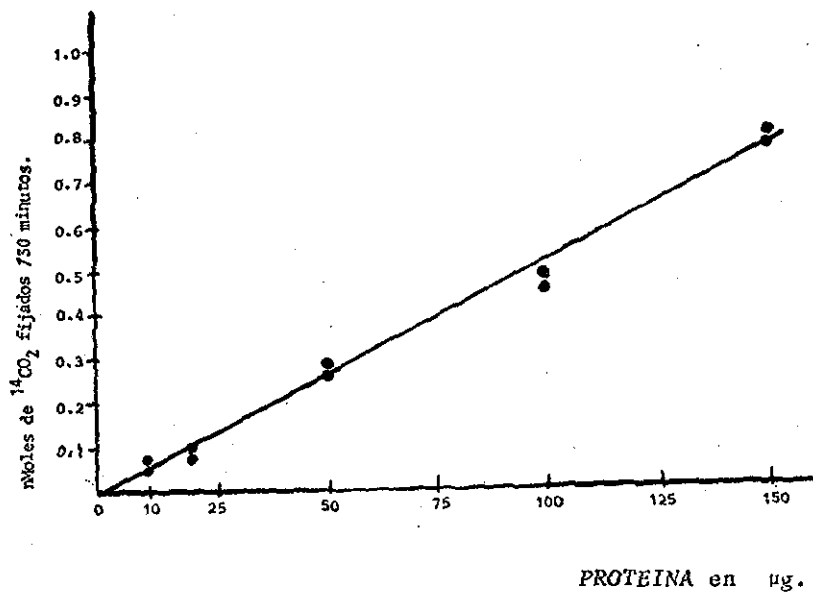


Fig. 15 Actividad de beta-metilcrotonil CoA carboxilasa vs Proteína en fibroblastos humanos en cultivo

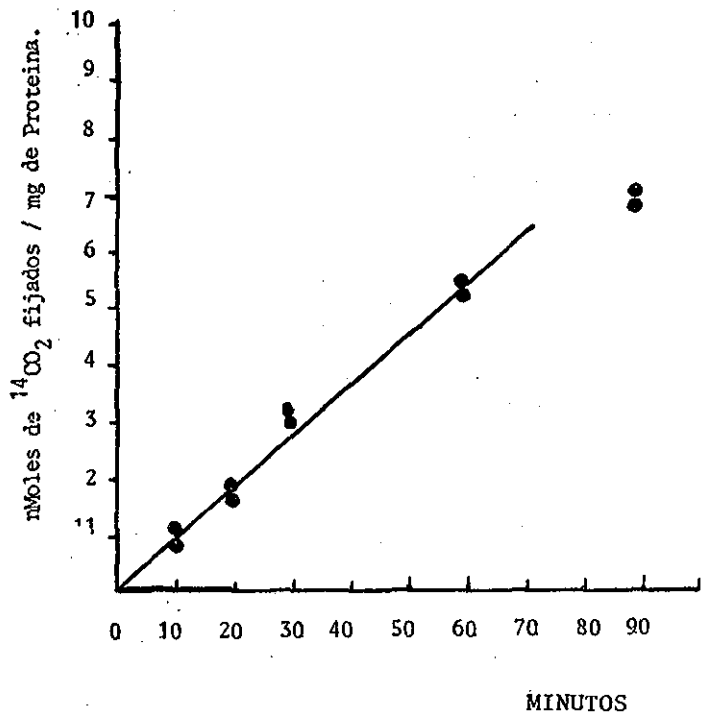


Fig. 16 Actividad de beta-Metilcrotonil CoA carboxilasa vs Tiempo en fibroblastos humanos en cultivo.

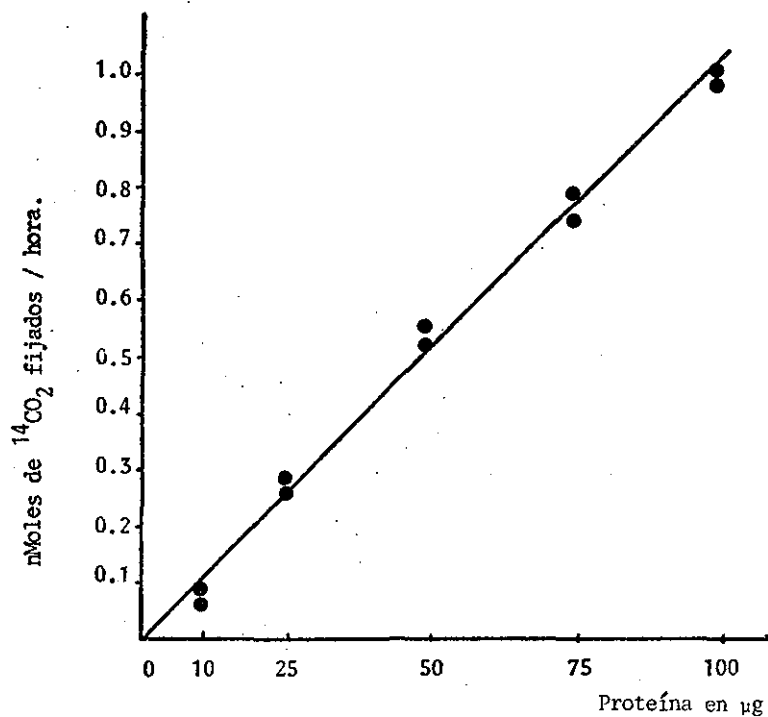


Fig. 17 Actividad de Piruvato carboxilasa vs Proteína en células sanguíneas mononucleares



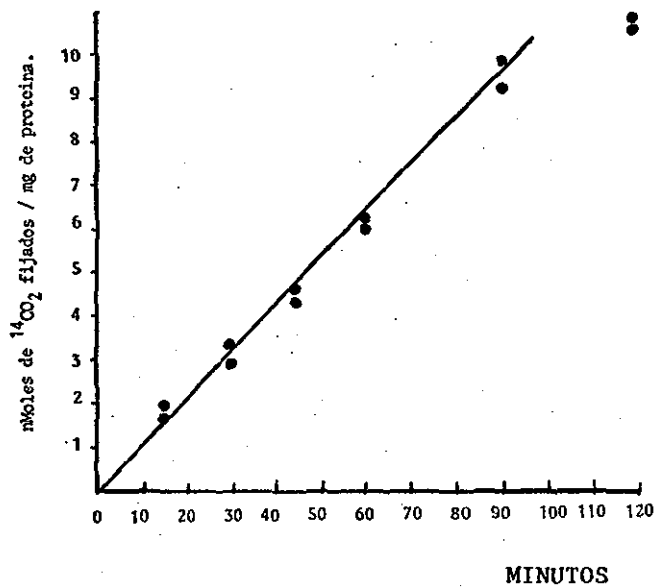


Fig. 18 Actividad de Piruvato carboxilasa vs Tiempo en células sanguíneas mononucleares.

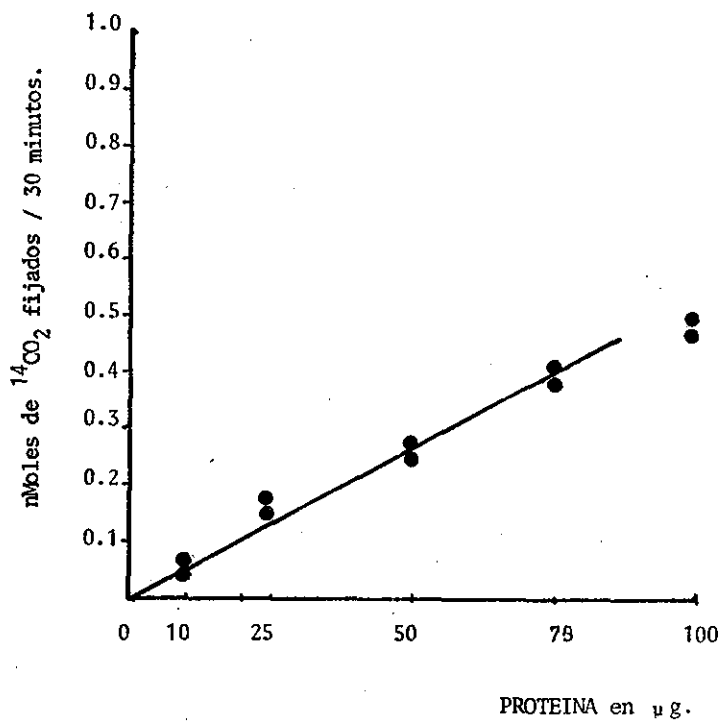


Fig. 19 Actividad de Propionil CoA carboxilasa vs Proteína en células sanguíneas mononucleares.

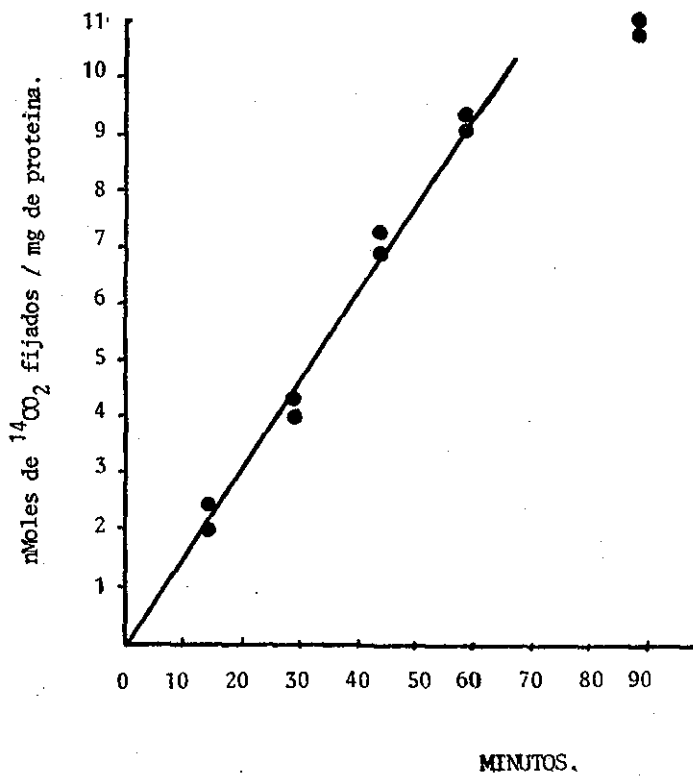


Fig. 20 Actividad de Propionil CoA carboxilasa vs Tiempo en células sanguíneas mononucleares.

**C U A D R O 5**

ACTIVIDAD\* DE CARBOXILASAS EN FIBROBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO  
CRECIDOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BIOTINA

	MEDIO NORMAL 7.5 nM			MEDIO CON BIOTINA 100 x (1 mg/L) 4 μM		
	PC	PCC	MCC	PC	PCC	MCC
CONTROL 1	27.50 ± 1.12	15.04 ± 0.68	3.71 ± 0.06	31.87 ± 0.94	23.23 ± 1.11	4.75 ± 0.24
CONTROL 2	46.60 ± 0.53	31.84 ± 1.20	5.82 ± 0.27	38.95 ± 2.80	27.98 ± 1.31	4.71 ± 0.32
PACIENTE	7.50 ± 0.09	5.84 ± 0.70	0.93 ± 0.17	14.90 ± 1.62	8.30 ± 0.48	1.67 ± 0.31

PC : Piruvato carboxilasa.

PCC : Propionil CoA carboxilasa.

MCC : beta-Metilcrotonil CoA carboxilasa.

\* : ACTIVIDAD ESPECIFICA como: nMoles de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fijados/mg de Proteína x Hora.

Los valores son la media ± la desviación estandar de ensayos por triplicado.

C U A D R O 6

ACTIVIDAD\* DE CARBOXILASAS EN CELULAS SANGUINEAS  
MONONUCLEARES

	PIRUVATO CARBOXILASA	PROPIONIL CoA CARBOXILASA
CONTROL	10.02 ± 0.7	10.73 ± 0.53
PACIENTE	2.42 ± 0.14	3.78 ± 0.28

\* ACTIVIDAD ESPECIFICA como nMoles de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fijados/mg de Proteína x Hora.

Los valores son la media ± la desviación estandar de ensayos por triplicado.

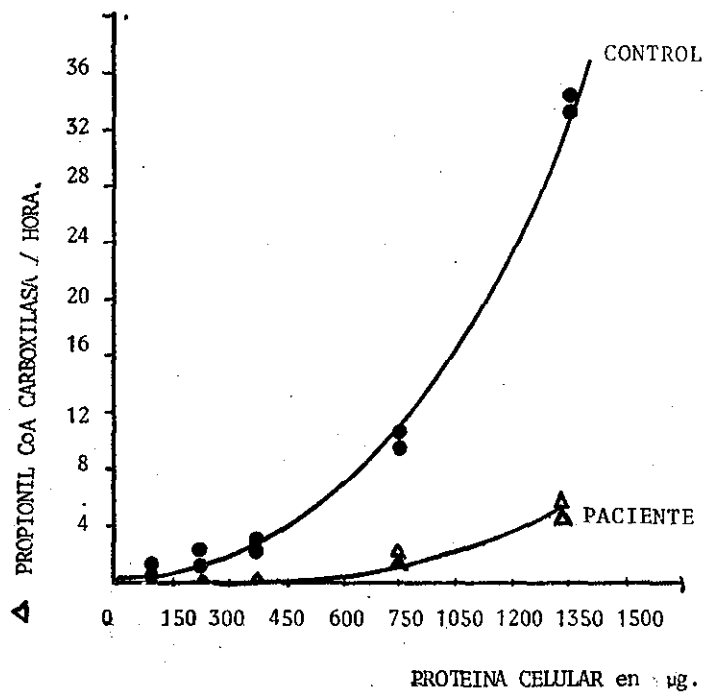


Fig. 21 Sintetasa de Holocarboxilasas vs Proteína en fibroblastos humanos en cultivo.

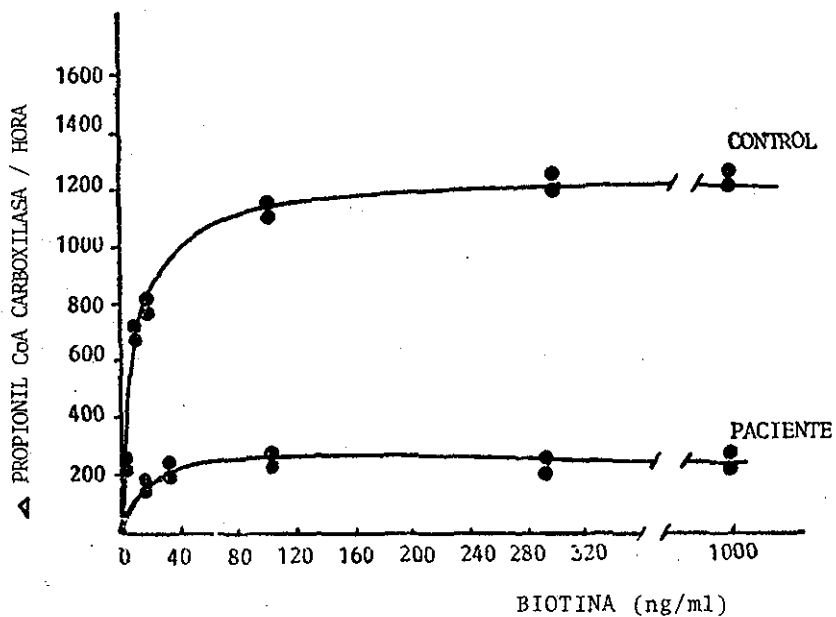
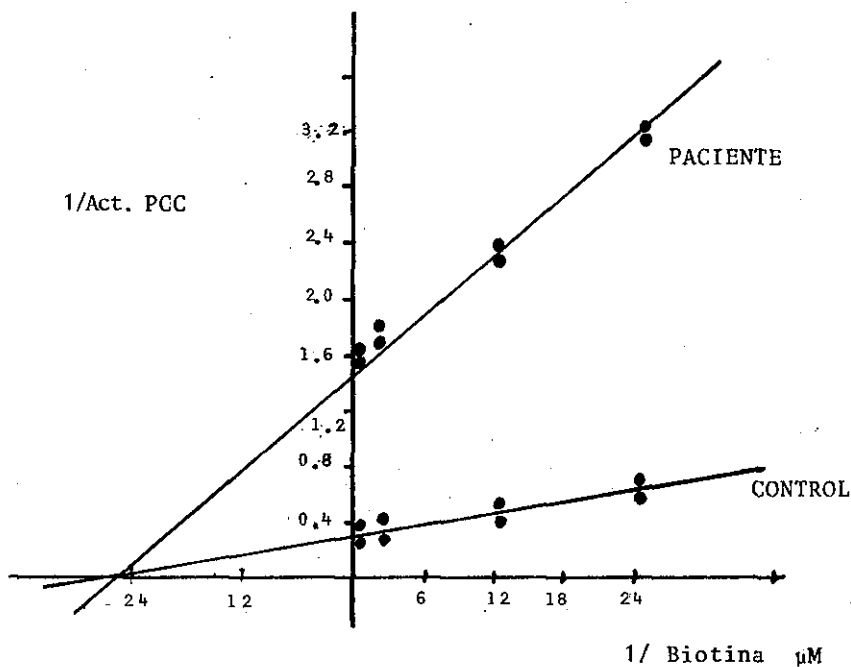


Fig. 22 Actividad de Sintetasa de Holocarboxilasas vs Biotina en fibroblastos en cultivo.

La concentración de proteína celular fue la misma en ambos casos. 1.mg/ml de mezcla de reacción en la pre-incubación.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 23 Actividad de la Sintetasa de Holocarboxilasas vs Biotina. Doble Recíproco.



C U A D R O 7

CONSTANTES CINÉTICAS PARA LA SINTETASA DE HOLOCARBOXILASAS  
EN FIBROBLASTOS HUMANOS EN CULTIVO

	VELOCIDAD MAXIMA ( $\mu$ Moles $^{14}$ CO <sub>2</sub> fijados/mg Prot. x hora)	Km ap. PARA BIOTINA ( $\mu$ Moles/Litro)
CONTROL	20.04	0.0454
PACIENTE	6.56	0.0459

C U A D R O 8

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE ALGUNOS ACEITES COMESTIBLES

ACIDO GRASO	ESTRUCTURA	C O M P O S I C I O N ( % )		
		ACEITE DE COCO	ACEITE DE MAIZ	ACEITE DE OLIVO
CAPRILICO	8:0	8.0	--	--
CAPRICO	10:0	7.0	--	--
LAURICO	12:0	48.0	--	--
MIRISTICO	14:0	18.0	--	--
PALMITICO	16:0	8.5	10	11
PALMITOLEICO	16:1	--	--	--
ESTEARICO	18:0	2.3	2	2
OLEICO	18:1	6.0	31	79
LINOLEICO	18:2	2.0	56	7
OTROS	--	--	1	1

Donde no existe valor númerico, la cantidad es < 0.5% del total de ácidos grasos.  
Tomado de Refs. 27 y 72.

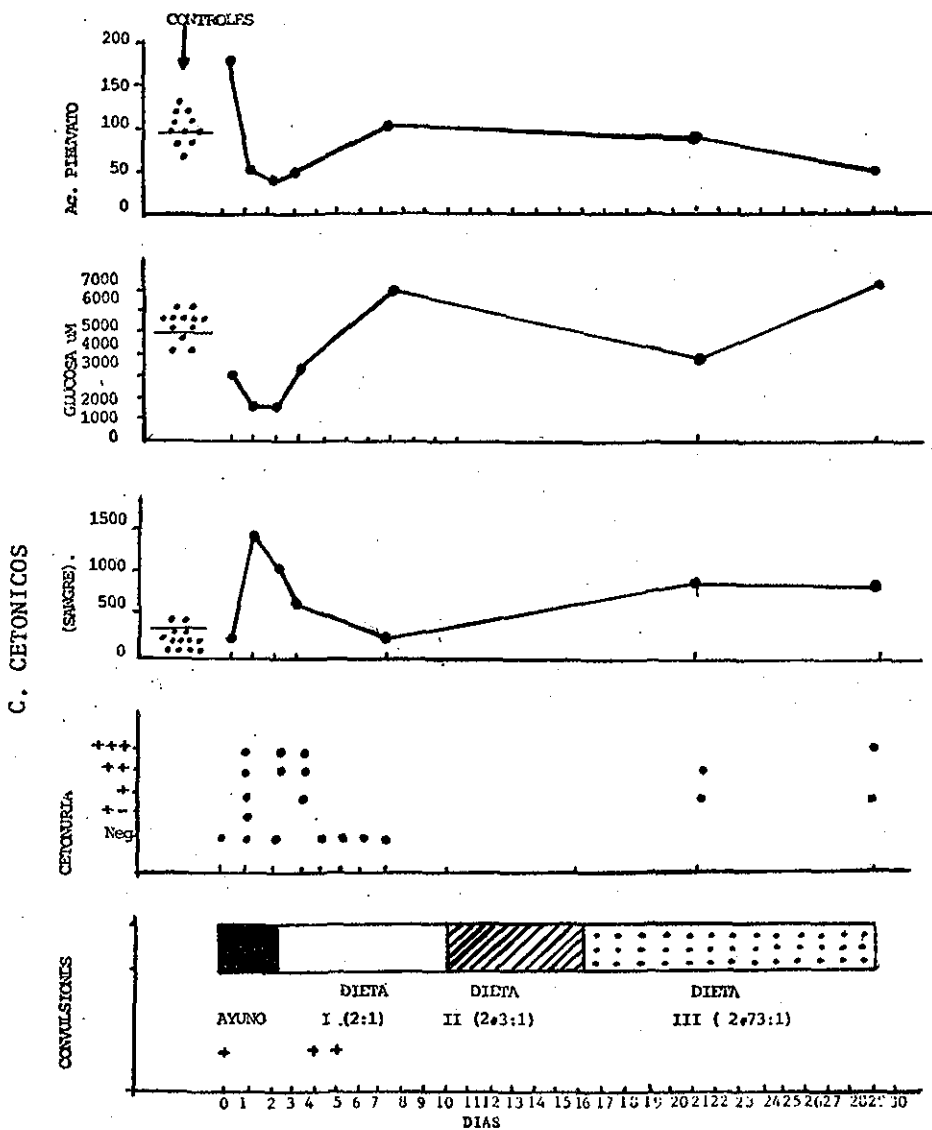


Fig. 24 Metabolitos durante ayuno y Dieta cetogénica

C U A D R O 9

ACTIVIDAD\* DE CARBOXILASAS EN CELULAS SANGUINEAS MONONUCLEARES  
CON O SIN UNA DIETA CETOGENICA

	PACIENTE		CONTROL	
	PC	PCC	PC	PCC
SIN DIETA	2.42 ± 0.14	3.78 ± 0.28	10.02 ± 0.7	10.72 ± 0.54
CON DIETA	8.33 ± 0.21	5.06 ± 0.17		

PC : Piruvato carboxilasa.

PCC : Propionil CoA carboxilasa.

\* : ACTIVIDAD ESPECIFICA como nMoles de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fijados/mg Prot. x Hora.  
Los valores son la media ± la desviación estandar de ensayos por triplicado.

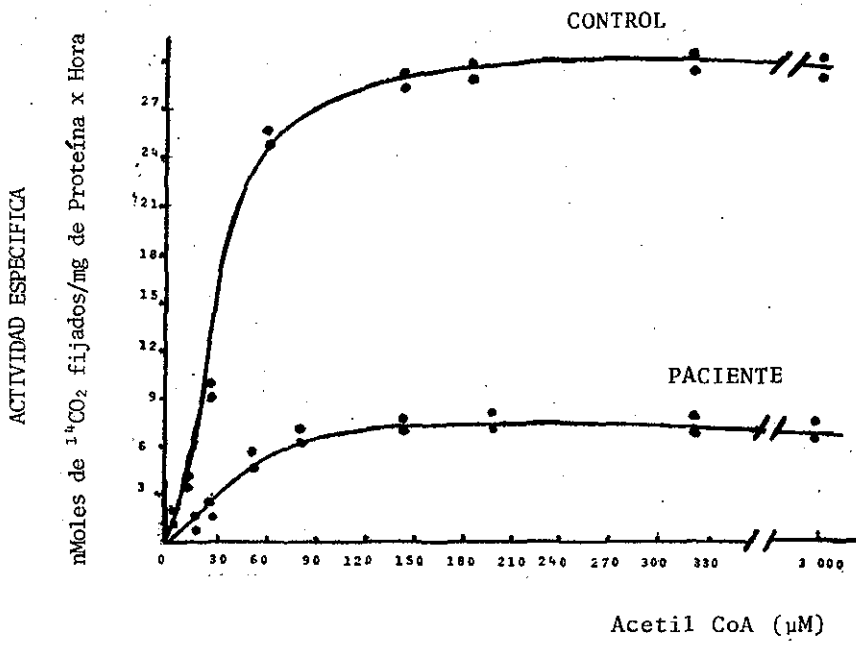


Fig. 25 Actividad de Piruvato carboxilasa vs Acetil CoA en Fibroblastos Humanos en cultivo.

**DISCUSION Y CONCLUSIONES**

Los estudios bioquímicos y las determinaciones enzimáticas reportados en el presente trabajo, han permitido confirmar el primer diagnóstico que se realiza en México de un caso de Deficiencia Múltiple de Carboxilasas (DMC).

Si bien todos los casos de DMC estudiados hasta ahora constituyen un grupo heterogéneo en cuanto a las manifestaciones clínicas y bioquímicas que presentan [69, 81], es posible distinguir dos formas principales de este Error Innato del Metabolismo: La forma Neonatal, debida a deficiencia de la enzima Sintetasa de Holocarboxilasas [46, 47] y la forma Juvenil, atribuida a una baja disponibilidad de biotina, tanto de la biotina endógena (mediante su reciclaje), como de la biotina exógena proveniente de la dieta. Esta condición se ha atribuido, en los casos descritos a la fecha, a una deficiencia de la enzima Biotinidasa [50, 51, 69].

Tanto la deficiencia de Sintetasa de Holocarboxilasas, como la deficiencia de Biotinidasa, conducen a una baja actividad de al menos las tres carboxilasas mitocondriales, PC, PCC y MCC y muy probablemente, también a deficiencia de la carboxilasa citoplasmática: Acetil CoA carboxilasa [42].

La administración de dosis farmacológicas de biotina restauran las actividades de las carboxilasas a niveles normales, en ambos tipos de DMC [39, 43].

Como ya se describió previamente en este trabajo (ante-

cedentes y resultados), la distinción entre los dos tipos de DMC solo es posible mediante el estudio de las actividades - de las diferentes carboxilasas en células en cultivo y bajo diferentes concentraciones de biotina en el medio [43, 45, 71]. Cultivados en concentraciones normales de biotina, los fibroblastos con deficiencia de SHC, en los cuales se ha encontrado una  $K_m$  para biotina aumentada [46], muestran actividades bajas de carboxilasas, y estas se elevan al cultivar las células en medios suplementados con una concentración de biotina superior a su  $K_m$  anormal, en cambio los fibroblastos -- con deficiencia de biotinidasa, donde no existe biotina libre disponible para síntesis de holocarboxilasas, pero con apocarboxilasas y SHC normales, mostrarán actividades normales de carboxilasas al crecerlos en medios con solo la concentración normal de biotina.

Otra forma de diferenciar entre tipos de DMC es la medición directa de las enzimas involucradas.

El encontrar que en fibroblastos derivados de la paciente, las actividades de las tres carboxilasas mitocondriales estaban deficientes al crecer las células en concentración normal de biotina, y que estas actividades se elevaban hasta el 50% de las normales (cuadro 5), sugirió que la DMC debía ser causada por una deficiencia de la SHC y no de la biotinidasa. Esto fue comprobado al estimar la actividad de la SHC



y encontrarla deficiente (figura 21). Por lo tanto, se trata de una DMC del tipo neonatal, que responde solo parcialmente a biotina, pero con características bioquímicas y clínicas peculiares.

Como ya se mencionó en el capítulo de resultados (pág. - 63), el comportamiento exponencial que presenta la actividad de la SHC al ser medida a concentraciones progresivas de proteína, tanto en células normales como de la paciente, es característico de una enzima que requiere de la presencia de un activador [83]. La SHC es una enzima poco estudiada y para la cual no se ha descrito ningún activador, por lo que no es posible por ahora asegurar que éste sea el caso. También es posible que se trate de una enzima oligomérica y que el resultado observado sea consecuencia de una especie de cooperatividad positiva, como en el caso descrito para la enzima 6-fosfofructuocinasa [84].

Este ensayo indirecto de la actividad de la SHC requiere de altas concentraciones de proteína celular para obtener actividades lo suficientemente altas y poder comparar a la paciente con los controles, por esta razón, siempre se utilizó aproximadamente 1.0 mg. de proteína por tubo de ensayo en las determinaciones de la SHC.

La actividad máxima de la SHC de la paciente es similar a las reportadas, 15% del control (figs. 21 y 22) pero resulta interesante el hecho de que la deficiencia parece manifes-

tarse solo en la velocidad máxima de la actividad de la enzima y no también en la  $K_m$  aparente para biotina (fig. 23 y cuadro 7). Esto quizá pudiera explicar la respuesta solo parcial de las diferentes carboxilasas de la paciente a altas concentraciones de biotina.

En estas mediciones se utilizó la misma cantidad de proteína celular en ambos tipos de células, pero es posible, de existir un activador, que la cantidad de éste en el homogenado celular de la paciente sea menor que en los controles normales y que existiera entonces una menor proporción de enzima en la forma activa en las células de la paciente. Esto podría explicar los resultados encontrados.

Existen otros mecanismos bioquímicos que tal vez pudieran explicar una  $V_{max}$  disminuída, pero con una  $K_m$  ap. para biotina normal, por ejemplo, que la mutación hubiese afectado la producción cuantitativa de la SHC, de tal manera que existieran menos moléculas de enzima por célula, aunque estas moléculas conservando sus propiedades de afinidad por sus substratos.

Otra posibilidad sería que se tratara de una sintetasa anormalmente lábil y que fuera estabilizada por grandes cantidades de biotina.

El encontrar en las células de la paciente una SHC con una  $K_m$  aparente para biotina similar a las normales, pudiera-

ser un artefacto metodológico, ya que el ensayo empleado mide la biotinización como una sola reacción, siendo que en -- realidad se trata de dos reacciones independientes, aunque - acopladas. Además no es posible controlar las concentraciones de algunos reactantes, principalmente de las apocarboxilasas, las cuales constituyen los sustratos receptores de la sintetasa.

Para medir con exactitud la Km para biotina sería necesario contar con un ensayo directo de la actividad de SHC, el - cual podría ser midiendo la incorporación de biotina radioactiva a alguna apocarboxilasa purificada, de tal manera que se pudieran controlar las concentraciones de los sustratos de la reacción.

La purificación de las apocarboxilasas es difícil, dada--principalmente su inestabilidad y a que se desnaturalizan muy fácilmente durante el proceso de purificación, además de que--es necesario depletar de biotina al animal de donde se van a obtener las apocarboxilasas, generalmente rata. Este proce--dimiento es muy lento (1-2 meses) y requiere de la preparación de dietas especiales, libres de biotina y ricas en avidina, - la cual une la biotina procedente de la flora intestinal evitando su absorción en el intestino. Se requiere de un gran - número de animales para obtener la cantidad de apocarboxila--sas necesaria para llevar a cabo el ensayo en condiciones no limitantes de este sustrato.

Las manifestaciones clínicas de la paciente no corresponden a las encontradas en la forma neonatal de DMC (nunca presentó acidosis metabólica ni cetosis). La presencia de una actividad residual de carboxilasas tan alta en la paciente -- (20-30% del normal), pudiera ser la causa de que la niña no presentará cuadros más graves característicos de esta enfermedad [68]. Cabe la posibilidad de que el daño neurológico fuera consecuencia de la hipoxia neonatal y no del problema metabólico. Pudiera pensarse que de no haber ocurrido esa complicación perinatólogica, la paciente fuera normal, y que con la actividad enzimática que ella tenía, fuera suficiente para -- mantener su metabolismo sin un desequilibrio evidente.

El retraso en el desarrollo que presentó la paciente durante toda su vida, no tiene una explicación clara, es posible que se debiera a sus problemas de deglución, que no le -- permitieran nutrirse adecuadamente.

La inducción de un estado de cetosis en la paciente, tanto por un ayuno prolongado, como por la administración de una dieta cetogénica, se realizó con el objetivo principal de estudiar la hipótesis de que la PC de esta paciente podía ser -- activada por cetosis. Esta hipótesis surgió del estudio preliminar donde, durante un ayuno de 24 horas, la paciente desarrolló un estado de cetosis, permaneció normoglicémica y sus niveles sanguíneos de piruvato y lactato (elevados antes del-

ayuno) descendieron a valores casi normales [72]. En un estado de cetosis, la elevación en los cuerpos cetónicos probablemente refleje una elevación en la poza de acetyl CoA, el cual es un reconocido activador de PC [18, 19], y esto pudiera haber activado a la holo PC, dando un mayor flujo metabólico a través de la vía gluconeogénica, disminuyendo las concentraciones de lactato y piruvato en el plasma de la paciente y manteniendo la glicemia en niveles normales.

Los resultados obtenidos: disminución de la concentración sanguínea de piruvato (fig. 24) y la normalización de la actividad de PC en linfocitos de la paciente (cuadro 9), parecían apoyar la hipótesis postulada. Sin embargo, mediante estudios en homogenados de fibroblastos en cultivo, la PC de células de la paciente no se normalizó aún a concentraciones de acetyl CoA muy por arriba de las fisiológicas (fig. 25), de hecho, la curva de activación muestra una velocidad máxima a concentraciones similares a las del control. Este dato debilita la hipótesis anterior. Una alternativa sería que la acetyl CoA no haya sido el metabolito causante de la activación, sino algún otro, quizá producto de la misma  $\beta$ -oxidación.

Otra posibilidad sería que la acetyl CoA no solo participe en la activación de la holo PC, sino también en el proceso de biotinylation de la apopiruvato carboxilasa. Esta idea está apoyada por los estudios realizados por el grupo de Cazulo y cols. [21, 22, 33], quienes han reportado que en dos microorganismos: Bacillus stearothermophilus y Sacharomyces

ceevisiae, la acetil CoA es indispensable en la biotinizaci3n de la apo PC. Esto podría explicarse si la acetil CoA interacciona de alguna manera con la apo PC, modificándola estructuralmente y convirtiéndola en un mejor sustrato para la sinte<sub>3</sub>tasa de holocarboxilasas. Esto operaría normalmente en el organismo sano, pero su efecto quizá se haya visto magnificado en la paciente durante el tiempo del tratamiento, permitiendo ver un mecanismo hasta ahora desconocido.

Esta hipótesis se debilita por los trabajos de Madapally y Mistry [24] y de Chang y Cohen [84] quienes, trabajando respectivamente con hígado de pollo y células 3T3 en cultivo, encontraron que la acetil CoA no tiene efecto aparente sobre la biotinizaci3n "in vitro" de apo PC.

Otra explicaci3n a los resultados encontrados sería un posible efecto hormonal.

En ayuno, los niveles de algunas hormonas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos y grasas se modifican: la insulina desciende, debido a la baja concentraci3n de glucosa sanguínea, en cambio el glucagon y el cortisol se elevan en la sangre [27, 28, 80]. Es bien reconocido que tanto el glucagon como el cortisol estimulan la gluconeogénesis en hígado, aunque por mecanismos diferentes; el glucagon incrementando el flujo de piruvato hacia la mitocondria, provocando un aumento en la actividad de PC y otras enzimas gluconeogénicas [80], en cambio el cortisol induce la gluconeogénesis promoviendo el catabolismo de proteínas en los tejidos periféri-

cos con el fin de suministrar aminoácidos como sustratos gluconeogénicos para el hígado [27, 80]. También se ha encontrado que el cortisol promueve la síntesis de novo de PC - [27, 80]. Estos estudios se han llevado a cabo en hígado, y dado que no se han encontrado isoenzimas de PC, es factible la baja en las concentraciones sanguíneas de piruvato en la paciente y el aumento en la actividad de PC en linfocitos debido a un efecto hormonal, quizá de glucagon y cortisol combinados. Esto también explicaría el que la paciente permaneciera normoglicémica.

Un objetivo adicional al inducir el estado de cetosis a la paciente, fue el intento de controlar sus crisis convulsivas, ya que se ha reportado el empleo exitoso de dietas cetogénicas en el control de convulsiones que no ceden con los anticonvulsivos comunes [74, 75].

El principal punto de regulación del ciclo de Krebs en las células está dado por la enzima citrato sintetasa, cuya actividad depende en gran parte de la cantidad de oxaloacetato disponible para condensarlo con acetyl CoA y formar citrato.

En una deficiencia de PC, no se produciría suficiente cantidad de oxaloacetato para alimentar el ciclo de Krebs, lo que se piensa provocaría un ciclo "lento" [34]. Como se sabe, el tejido nervioso obtiene su energía principalmente a partir del mecanismo oxidativo de glucosa. Una disminución en este-

proceso oxidativo, conduciría a una deprivación cerebral de ATP. Esto pudiera explicar el daño neurológico en los pacientes con deficiencia de PC.

Algunos neurotransmisores se sintetizan a partir de intermediarios del ciclo de Krebs, un ejemplo es el neurotransmisor inhibitorio GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), formado a partir del ácido glutámico proveniente de la transaminación del  $\alpha$  cetoglutarato del ciclo de Krebs. En un ciclo lento, es posible que se sintetice poco GABA y las convulsiones pudieran deberse a déficit de ese neurotransmisor.

El cerebro es capaz de utilizar, en ausencia de concentraciones adecuadas de glucosa, a los cuerpos cetónicos como fuentes de energía [27, 28], los cuales entran al ciclo de Krebs en la forma de acetil CoA [27]. En un estado de cetosis, es posible que los cuerpos cetónicos hayan sido utilizados por las células nerviosas de la paciente como fuente de energía. De ser así, y si la actividad de PC también se incrementó en esas células, al igual que en linfocitos, es posible que la formación de oxaloacetato se incrementara y que se alcanzara una velocidad normal del ciclo de Krebs, pudiéndose entonces sintetizar cantidades adecuadas de neurotransmisores, controlándose las convulsiones.

El hecho de que durante el tratamiento de la paciente las convulsiones desaparecieran (fig. 24) parece apoyar la hi



pótesis antes descrita, sin embargo, la evidencia necesaria para comprobar la hipótesis debe ser de naturaleza bioquímica.

La investigación de las diferentes hipótesis postuladas en este trabajo requiere de contar con métodos directos de medición de la actividad de la SHC, así como de las concentraciones intracelulares e intramitocondriales de acetil CoA y metabolitos relacionados.

En la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M., se piensa continuar con esta línea de investigación, utilizando tanto células en cultivo como ratas depletadas de biotina, con objeto de estudiar en detalle el proceso de biotinización, así como caracterizar la mutación de la Sintetasa de Holocarboxilasas de la paciente descrita. Los trabajos descritos en el presente trabajo contribuyeron a sentar las bases sobre las que se apoyarán investigaciones posteriores.

**BIBLIOGRAFIA**

1. ACHUTA MURTHY , P.N. and MISTRY, S.P. Synthesis of biotin dependent carboxylases from their apoproteins and biotin. *Biochemicals Reviews.* 43: 1-10, 1972.
2. UTTER, M.F. and SHEU, K.R. Biochemical mechanisms of biotin and thiamin action and relationships to genetic disease. *Birth Defects: Original Article Series.* Vol. XVI. - Number 1, Pages 289-304, 1980.
3. KOGL, F. and TONIS, B. Uber das Bios-Problem. Darstellung von Krystallisiertem biotin aus Eigelb. *Z. Physiol Chem.* - 242: 43-73, 1936.
4. du VIGNEAUD, V. et al. On the structure of biotin. *J. Am. Chem. Soc.* 64: 188-189, 1942.
5. HARRIS, S.A. and WOLF, D.E. Synthetic biotin. *Science* 97: 447-448, 1943.
6. KOSOW, D.P., HUANG, S.C. and LANE, M.D. *J. Biol. Chem.* - 237: 3633, 1962.
7. WOLF, D.E. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 74: 2002, 1952.
8. BONJOUR, J.P. Biotin in man's nutrition and therapy, a review. *Internat. Vit. Nutr. Rev.* 47: 107-118, 1977
9. VISSER, C.M. and KELLOGG, R.M. Biotin. Its place in evolution. *J. Mol. Evol.* 11: 171-187, 1978.
10. MOSS, J. and LANE, M.D. *Adv. Enzymol.* 35: 321, 1971.

11. ALBERTS, A.W. and VAGELOS, P.R. Acetyl-CoA carboxylase II. Demonstration of biotin protein and carboxylase -- subunits. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 63: 1319, 1969.
12. GERWIN, I.R., JACOBSON, B.E. and WOOD, H.G. Transcarboxylase, VIII. Isolation and properties of a biotin-carboxy carrier protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -- 64: 1315, 1969.
13. WAKIL, S.J. J. Lip. Res. 2: 1, 1961.
14. UTTER, M.F., BARDEN, R.E. and TAYLOR, B.L. Pyruvate carboxylase: An evaluation of the relationships between structure and mechanism and between structure and catalytic activity. Adv. Enzymol. 42: 1-72, 1975.
15. SIEGEL, J.L. and FOOTE, J.E. The enzymatic synthesis of Propionyl coenzyme A Holocarboxylase from D-Biotynyl -- 5-Adenylate and the Apocarboxylase. J. Biol. Chem. -- 240 (3): 1025-1031, 1965.
- 16.- ACHUTA MURTHY, P.N. and MISTRY, S.P. Synthesis of acetyl CoA holocarboxylase in vitro by a cytosolic preparation from chicken liver. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. -- 147: 114-117, 1974.
17. ACHUTA MURTHY, P.N. and MISTRY, S.P. In vitro synthesis of propionil CoA holocarboxilase by partially purified -- mitochondrial preparation from biotin-deficient chicken - liver. Can. J. Biochem. 52: 800-803, 1974.
18. EASTERBROOK, S.B. et al. The atypical Velocity response by pyruvate carboxylase to increasing concentration of - acetyl-coenzyme. A. Biochem. J. 179: 497-502, 1979.

19. YIP, B.P. and RUDOLPH, F.B. Hysteretic behavior of beef liver pyruvate carboxylase. Arch. Biochem. Biophys. -- 191 (2): 657-665, 1978.
20. GOODNIDGE, A.G. Regulation of the activity of acetyl - coenzyme A carboxylase by Palmitoyl CoA and Citrate. -- J. Biol. Chem. 247 (21): 6946-6952, 1972.
21. CAZZULO, J.J., SUNDARAM, T.K. and KORNBERG, H.L. Properties and regulation of Pyruvate Carboxylase from Bacillus stearothermophilus. Proc. Roy. Soc. Lon. B. -- 176: 1-19, 1970.
22. CAZZULO, J.J., SUNDARAM, T.K. and KORNBERG, H.L. Mechanism of Pyruvate Carboxylase formation from the apoenzyme and biotin in a thermophilic Bacillus. Nature, 227: 1101-1105, 1970.
23. CAZZULO, J.J., SUNDARAM, T.K. and KORNBERG, H.L. Regulation of Pyruvate Carboxylase formation from the apoenzyme and biotin in thermophilic Bacillus.
24. MADAPALLY, M.M. and MISTRY, S.P. Synthesis of chicken - liver pyruvate holocarboxylase in vivo and in vitro. -- Biochim. Biophys. Acta. 215: 316-322, 1970.
25. BARDEN, R.E., TAYLOR, B.L. and ISOHASHI, I. Structural - properties of pyruvate carboxylase from chicken liver and other sources. P.N.A.S., USA. 72 (11): 4308-4312, 1975.
26. SANDER, J.E.; PACKMA, S. and TOWNSEND, J.J. Brain pyruvate carboxylase and the pathophysiology of biotin-dependent diseases. Neurology. 32: 878-880, 1982.

27. MONTGOMERY, R. et al. Biochemistry: A case oriented -- approach. Third Edition, 1980. pp. 236-238.
28. WHITE, A. Principles of biochemistry. Fifth Edition, - McGraw-Hill, 1973.
29. SAUDUBRAY, J.M. et al Search for the biochemical basis of biotin dependent multiple carboxylase deficiency. Determination of biotin activation in cultured fibroblasts. *Cli. Chim. Acta.* 122: 241-248, 1981.
30. GROVER, W.D. Biochemical studies and therapy in subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh's syndrome). *J. Pediatrics.* 81 (1): 39-44, 1972.
31. ATKIN, B.M. and UTTER, M.F. Pyruvate carboxylase deficiency and Lactic acidosis in a retarded child without Leigh's disease. *Pediat. Res.* 13: 109-116, 1979.
32. MURPHY, J.V. et al Pyruvate carboxylase deficiency an - alleged biochemical-caused Leigh's disease. *Pediatrics.* 68: 401-404, 1981.
33. SANDER, J. Pyruvate carboxylase activities in Leigh's disease. *Neurology.* 34: 515-6, 1984.
34. De Vivo, D.C. et al. The clinical and biochemical implications of pyruvate carboxylase deficiency. *J. Clin. -- Endocrin. Metab.* 45: 1281, 1977.
35. BRUNETTE, M.G. 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.

36. WOLF, B., HSIA, Y.E. and SWEETMAN, L. Propionic acidemia: a clinical update. *J. Pediatr.* 68:113-118, 1981.
37. WOLF, B., PAULSEN, E.P. and HSIA, Y.E. Asymptomatic propionyl CoA carboxylase deficiency in a 13 year old girl. *J. Pediatr.* 95: 563-565, 1979.
38. LEONARD, J.V., SEAKINS, J.W.T. and BARTLETT, K. Inherited disorders of 3-methylcrotonyl CoA carboxylation. *Arch. Dis. Child.* 56: 53-59, 1981.
39. BARTLETT, K., NG, H. and LEONARD, J.V. A combined defect of three mitochondrial carboxylase presenting as biotin -- responsive 3-methylcrotonyl glycinuria and 3-methylisovaleric aciduria. *Clin. Chim. Acta.* 100: 183-186, 1980.
40. STOKKE, O. et al. Beta-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency: a new metabolic error in leucine degradation. *Pediatrics.* 49: 726-735, 1972.
41. FINNIE, M.D.A. et al. Massive excretion of 2-Oxoglutaric acid and 3-hydroxyisovaleric acid in a patient with a deficiency of 3-methylcrotonyl CoA carboxylase. *Clin. Chim. Acta.* 73:515-519, 1976.
42. FELDMAN, G.L. and WOLF, B. Deficient acetyl CoA carboxylase activity in Multiple Carboxylase Deficiency. *Clin. Chim. Acta.* 111: 147-151, 1981.
43. BARTLETT, K. NG, H. and DALE, G. Studies on cultured fibroblasts from patients with defects of biotin-dependent carboxylation. *J. Inher. Metab. Dis.* 4: 183-189, 1981.

44. BARTLETT, K., NG, H. and LEONARD, J.V. A combined -- defect of three mitochondrial carboxylase. Clin. Chim. Acta. 100: 183-186, 1980.
45. GHNEIM, H.K., NOY, G. and BARTLETT, K. Biotin-depen dent carboxylases and cultured human fibroblasts. Bio chemical Society Transactions. 9: 405-406, 1981.
46. BURRI, B.J, SWEETMAN, L. and NYHAN, L. Mutant Holocar boxylase Synthetase: Evidence for the enzyme defect in early infantile biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. Am. J. Hum. Genet. 34: 590-601, 1981.
47. SAUNDERS, M.E. and SHERWOOD, W.G. Evidence for a de- fect of Holocarboxylase Synthetase activity in cultured limphoblasts from a patient with biotin-responsive Mul- tiple Carboxylase Deficiency. J. Clin. Invest. 68: -- 1491-1495, 1981.
48. MUNNICH, A. and SAUDUBRAY, J.M. Defective biotin ab- sorption in multiple carboxylase deficiency. The Lancet (Agust). 1: 263, 1981.
49. THOENE, J. and BAKER, H. Biotin-responsive carboxylase deficiency associated with subnormal plasma and urinary biotin. N. Engl. J. Med. 304: 817-820, 1981.
50. WOLF, B., PARKER, W.D. and ALLEN, R.J. Deficient Bio tinidase activity in late onset multiple carboxylase - deficiency. N. Engl. J. Med. 308: 161, 1983.
51. WOLF, B. y cols. Biotinidase deficiency: The possible - role of biotinidase in the procesing of dietary protein bound biotin. J. Inher. Metab. Dis. 7:Supple 2: 121-122, 1984.



52. SWEETMAN, L. et al. Clinical and metabolic abnormalities in a boy with dietary deficiency of biotin. Pediatrics. 68: 553-558, 1981.
53. MOCK, D.M. et al. Biotin deficiency: An unusual complication of parenteral alimentation. N. Engl. J. Med. -- 304: 820-823, 1981.
54. VELAZQUEZ, A. El estudio de los errores innatos del metabolismo y sus implicaciones para la medicina. Gaceta Med. Méx. 116: 503-514, 1980.
55. STANBURY, J.B., WYNGAARDEN, J.B. and FREDRICKSON, D.S. (Eds), The metabolic basis of inherited disease. McGraw-Hill Book Co., Nueva York, 1978.
56. McKusick, V.A. Mendelian inheritance in man, 5th ed. The Johns Hopkins University Press, 1978.
57. PRIETO, E., MORET, E., KLEIN, J., MORENO, M., CARNEVALLE, A., ROBLES, C., y VELÁZQUEZ, A. Deficiencia de Piruvato carboxilasa que responde a biotina. XIII Reunión Nacional. Sociedad Mexicana de Bioquímica, Aguascalientes, Ags. México, 18-22 Noviembre, 1980.
58. CEDERBAUM, S. et al. Sensitivity to carbohydrates in a patient with familial Intermitent Lactic acidosis and pyruvate dehydrogenase deficiency. Pediat. Res. 10:713, 1976.
59. ZUURENDONK, P.F. and TAGER, J.M. Rapid separation of particulate component and soluble cytoplasm of isolated rat liver cells. Biochem. Biophys. Acta. 333: 393, 1974.

60. COLBEU, A., NACHBAUR, J. and VIGNAIS, P.M. Enzimic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 249: 462-492, 1971.
61. LEVY, M., TOURY, R. et ANDRE, J. Separation des membranes mitochondriales. Purification et caractérisation -- enzymatique de la membrane externe. *Biochim. Biophys. Acta.* 135: 599-613, 1967.
62. PERPER, R.J. et al. Purification of lymphocytes and -- platelets by gradient centrifugation. *J. Lab. Clin. Med.* 72: 842, 1968.
63. LOWRY, O.H. and ROSEBROUGH, A.I. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: -- 265, 1951.
64. CUATRECASAS, P. and WILCHEK, M. Single-step purification of avidin from egg white by affinity chromatography on biocytin-sepharose columns.
65. SHAW, K.N.F. et al. Biochemical screening and monitoring of patients with phenylketonuria and variants forms of hyperphenylalaninemia. En: *Biochemistry Genetics Diagnosis and therapy* (Bickel and Hudson. Eds.), 1971.
66. BERGMAYER, H.U. *Methods of enzymatic analysis.* Verlag Chemie. Weinheim. Academic Press. Inc. Nueva York, 1974.
67. SHIA, V.F. *Laboratory techniques for the detection of hereditary metabolic disorders.* Ed. CRC Press, Cleveland Ohio, 1973.

68. WOLF, B. and FELDMAN, G.L. The biotin-dependent carboxylase deficiencies. *Am. J. Hum. Genet.* 34: 699-716, 1982.
69. WOLF, B. et al. Phenotypic variation in biotinidase deficiency. *J. Pediatr.* 103: 233-237, 1983.
70. PISPA, J. Animal Biotinidase. *Ann. Med. Exp. Biol.* --- *Fenn.* 43 Suppl. 5: 5-39, 1965.
71. MARSAC, C. et al. Biotin dependent carboxylase activities in normal human and multicarboxylase deficient patient fibroblasts. Relationships to the biotin content of the culture medium. *Clin. Chim. Acta.* 129: 119-128, 1983.
72. GONZALEZ ALARCON LAURA, M. Errores Innatos del Metabolismo: Detección y Tratamiento de algunos casos clínicos. Tesis Profesional, Universidad Iberoamericana, Mexico, D.F. 1983.
73. FALK, R., CEDERBAUM, S. and BLASS, J. Ketogenic diet in the management of pyruvate dehydrogenase deficiency. *Pediatrics.* 58: 713-721, 1978.
74. GORDON, N. Medium chain triglycerides in a ketogenic diet. *Develop. Med. Child. Neurol.* 19: 535-544, 1977.
75. HUTTENLOCKER, P. Ketonemia and seizures: Metabolic and anticonvulsant effects of two ketogenic diets in childhood epilepsy. *Pediatr. Res.* 10: 536-40, 1976.
76. OSMANI, S.A. and SCRUTTON, M.C. Activation of pyruvate carboxylase from *Aspergillus nidulans* by acetyl coenzyme A. *FEBS LETTERS.* 135: 253-256, 1981.

77. KEECH, D.B. and WALLACE, J.C. How significant is homotropic cooperativity in terms of metabolic regulations. Trends in Biochemical Sciences (julio): 182-184, 1981.
78. MIZUMAGA, T., KURAISHI, H. and AIDA, L. The presence of apopyruvate carboxylase and synthesis of holopyruvate carboxylase in biotin requiring Baker's yeast. Agr. Biol. Chem. 34: 146-148, 1970.
79. SUNDARAM, T.K., CAZZULO, J.J. and KORNBERG, H.L. Pyruvate carboxylase formation from the apoenzyme and d-biotin in *Sacharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. 143: 609-616, 1971.
80. NAOMI, FRAUS-FRIEDMAN. Hormonal regulation of hepatic - gluconeogenesis. Physiological Reviews. 64 (1): 170-259, 1984.
81. ROBINSON, B.H., TAYLOR, J. and SHERWOOD, W.G. The genetic heterogeneity of lactic acidosis: Occurrence of recognizable inborn errors of metabolism in a pediatric population with lactic acidosis. Ped. Res. 14: 956-962, 1980.
82. GHNEIM, H.K. and BARTLETT, K. Mechanism of biotin-respon- sived combined carboxylase deficiency. The Lancet. May. 22: 1187-1188, 1982.
83. DIXON, M. WEBB, E. THORNE, C.J.R. and TIPTON, K.F. (Eds.). Enzymes third Edition, Academic Press. N.Y., 1979.
84. CHANG, H.I. and COHEN, N.D. Regulation and intracellular - localization of the biotin Holocarboxylase synthetase of 3T3-L<sub>1</sub> cells. Arch. Biochem. Biophys. 225 (1): 237-47, -- 1983.