



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

RESPUESTA A BIOTINA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y GRADO
DE BIOTINILACION DE CARBOXILASAS MITOCONDRIALES, EN
CULTIVOS PRIMARIOS DE HEPATOCITOS DE RATAS DEFICIENTES
DE BIOTINA.

290630

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :

MARIA ALEJANDRA DIAZ CAMAÑO



DR. ANTONIO VELAZQUEZ ARELLANO



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION FACULTAR



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Respuesta a biotina de la actividad enzimática y grado de biotinilación de carboxilasas mitocondriales, en cultivos primarios de hepatocitos de ratas deficientes de biotina.

realizado por *MARIA ALEJANDRA DIAZ CAMAÑO*

con número de cuenta 8833144-7 , pasante de la carrera de *Biología*

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario *Dr. Antonio Velázquez Arellano*

Propietario *Dr. Ignacio Camacho Arroyo*

Propietario *Biól. Christian Humberto Guerra Araiza*

Suplente *Quím. Julia Jeanett Segura Uribe*

Suplente *Biól. David Garcíadiago Cázares*

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de

Edna M. Suarez D.

DRA. EDNA MA. SUAREZ DIAZ



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE GENÉTICA DE LA NUTRICIÓN DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ANTONIO VELÁZQUEZ ARELLANO Y CON EL APOYO DEL PROYECTO PAPIIT IN217196

DEDICATORIA

A mis padres

Sr. Quintín Díaz y Sra. María E. Camaño, les dedico esta tesis por su apoyo, cariño y comprensión.

A mis hermanos

Raúl, Roberto, Rubén, Luz, Ricardo, Víctor, René, Gabriel gracias por estar conmigo, Miguel eres un amor y Raquel mi hermana querida te quiero.

A mis sobrinos

Josue, Fernanda, Jimena, Roberto, Bruno, Jesús, Rodrigo, Nancy, Samuel, Daniel, Diego, Eybar, Atzin, Luis, Frida, Juan, Gilberto, José y Ixchel.

A mis Amigos.

En memoria a Sacbé Gracias por ser uno de mis mejores amigos.

Agradecimientos.

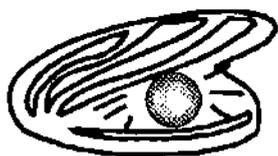
Al Dr. Antonio Velázquez Arellano por su apoyo y dedicación para la realización de este trabajo.

A toda la gente que me ayudo en su laboratorio, en la Unidad de Genética de la Nutrición y en la Sección Clínica, GRACIAS.

Tesis

PERLA

IMPRESORES



A sus órdenes:

REP. DE CUBA No. 99-5
COL. CENTRO HISTORICO
TEL. 521-36-53

INDICE

	Páginas
RESUMEN	1
ANTECEDENTES	2
Generalidades de la biotina	2
Distribución de la biotina	5
Biotina y carboxilasas	5
Deficiencia de biotina	11
Características del hígado	14
Aislamiento de hepatocitos	18
Cultivo de hepatocitos	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
HIPOTESIS	23
OBJETIVOS	24
DISEÑO GENERAL DEL ESTUDIO	25
MATERIALES Y METODOS	26
Extracción de hepatocitos y cultivos celulares	26
Biotinilación y cosecha de hepatocitos	28
Determinación de proteínas por el método de Bradford	29
Determinación de la actividad enzimática de las carboxilasas	31
Electroforesis y blot de estreptavidina - fosfatasa alcalina	35
RESULTADOS	40
DISCUSION	45
CONCLUSION	48
PERSPECTIVAS	49
REFERENCIAS	50

*** TESIS URGENTES ***

Pedro Ahumada

TRATO DIRECTO

Rep. De Cuba No. 99 Desp. 23-A
Centro Histórico Tel 5-512-84-69

RESUMEN

La biotina es una vitamina que desempeña un importante papel en el metabolismo como cofactor de cuatro carboxilasas: Piruvato carboxilasa (PC) que participa en la gluconeogénesis, la Propionil CoA carboxilasa (PCC) que interviene en el catabolismo de aminoácidos, la 3-Metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC) que participa en la degradación de la leucina y la Acetil CoA carboxilasa (ACC) en la lipogénesis.

Cuando existe deficiencia de biotina la actividad de las carboxilasas disminuye notablemente, sin embargo se desconoce acerca el comportamiento enzimático el grado de biotilación de cada una de las carboxilasas deficientes al añadir biotina. En este estudio, se sometieron ratas a una dieta deficiente de biotina. Estas se sacrificaron entre la octava y décima semana una vez que la deficiencia empezó a manifestarse físicamente. Se aislaron hepatocitos y se realizaron cultivos primarios a los cuales se les agregó biotina a diferentes tiempos, midiéndose la actividad específica y el grado de biotilación de las enzimas PC Y PCC por Western Blot de estreptavidina (una proteína que se une con alta afinidad a la biotina) acoplada a fosfatasa alcalina.

Los resultados muestran que la PCC requirió de 24 horas para reactivarse y biotilarse, mientras que PC se reactivó y biotiló dentro de las tres primeras horas llegando a los valores del control.

En investigaciones paralelas; se encontró que la deficiencia de biotina disminuyó la masa de PCC y MCC pero no la masa de PC. Esto puede explicar el rápido aumento en la actividad de PC y de su forma biotilada. Para PCC y MCC, se explica su lenta reactivación y/o biotilación al agregar biotina. En base a estos resultados podemos sugerir que la deficiencia de biotina afecta de forma distinta a las dos enzimas mitocondriales PC y PCC.

ANTECEDENTES

GENERALIDADES DE LA BIOTINA.

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

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

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

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

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

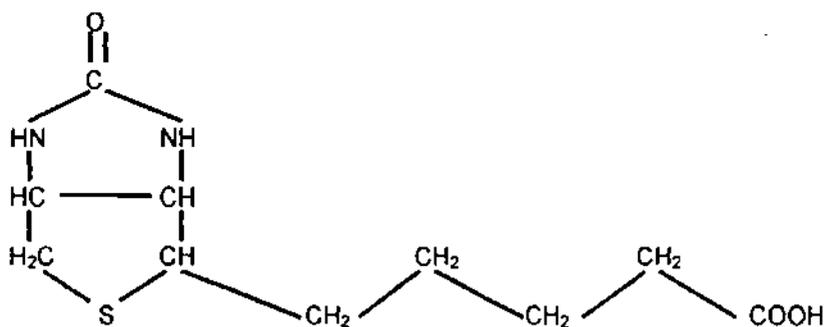


Figura 1. Estructura de la biotina

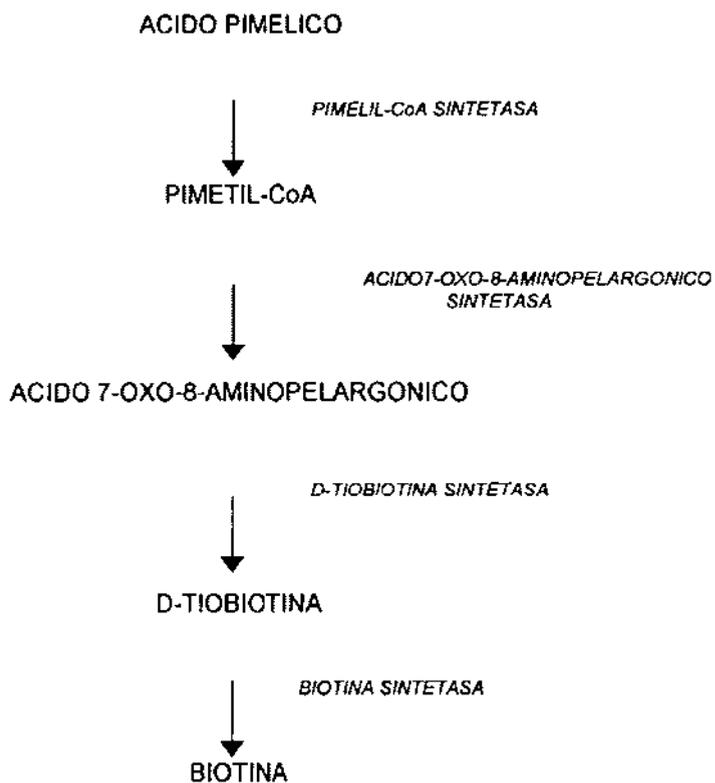


Figura 2. Biosíntesis de biotina en microorganismos

DISTRIBUCIÓN DE LA BIOTINA

La biotina es un importante factor nutricional. Se han encontrado bajas concentraciones de esta vitamina con respecto a otras, en plantas (20 a 120 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) y en tejido animal (1 a 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) y puede ser sintetizada por una amplia variedad de bacterias, incluyendo algunas del tracto gastrointestinal humano y de especies animales.

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

BIOTINA Y CARBOXILASAS

El papel más importante de la biotina es actuar como grupo prostético de diferentes enzimas. Las cuatro principales enzimas que contienen biotina son: Propionil Coenzima A carboxilasa (PCC), Piruvato carboxilasa (PC), β Metilcrotonil-Coenzima A carboxilasa (MCC) y Acetil Coenzima A carboxilasa (ACC) (Fig.4). La ACC es una enzima citosólica, mientras que las otras tres son mitocondriales.

La ACC cataliza la carboxilación de la acetil-CoA. Esta enzima lleva a la formación de la malonil-CoA la cual es reconocida como intermediario en la fase reguladora de la lipogénesis y de la β -oxidación de ácidos grasos, participando también en la génesis de la membrana celular. La ACC tiene una estructura compleja, sujeta a regulación alostérica, particularmente por el citrato; puede encontrarse en un estado protomérico, catalíticamente inactiva, y en estado polimérico, siendo este último el estado activo de la enzima (10).

La PC es una enzima tetramérica, compuesta de subunidades idénticas; cada polipéptido contiene una molécula de biotina. También es una enzima clave de la gluconeogénesis en el hígado y en el riñón, en donde cataliza el primer paso de esta vía metabólica. Está también presente en tejidos lipogénicos (hígado, tejido adiposo, glándula mamaria y suprarrenal) en los que actúa en la síntesis de ácidos grasos, participando en el transporte de la mitocondria al citosol de grupos acetilo vía citrato y de equivalentes reducidos vía malato (11). En todos los tejidos tiene un papel anaplerótico del ciclo de los ácidos tricarboxílicos al catalizar la formación de oxaloacetato (12).

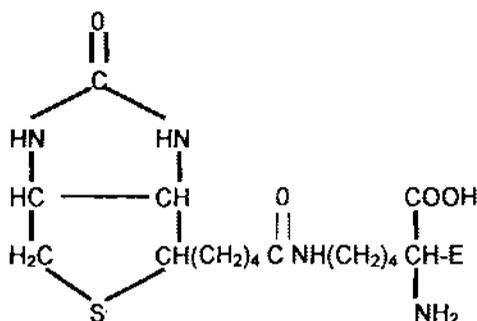


Figura 3. Estructura de la biotina unida covalentemente a un residuo de lisina de una carboxilasa (biocitina).

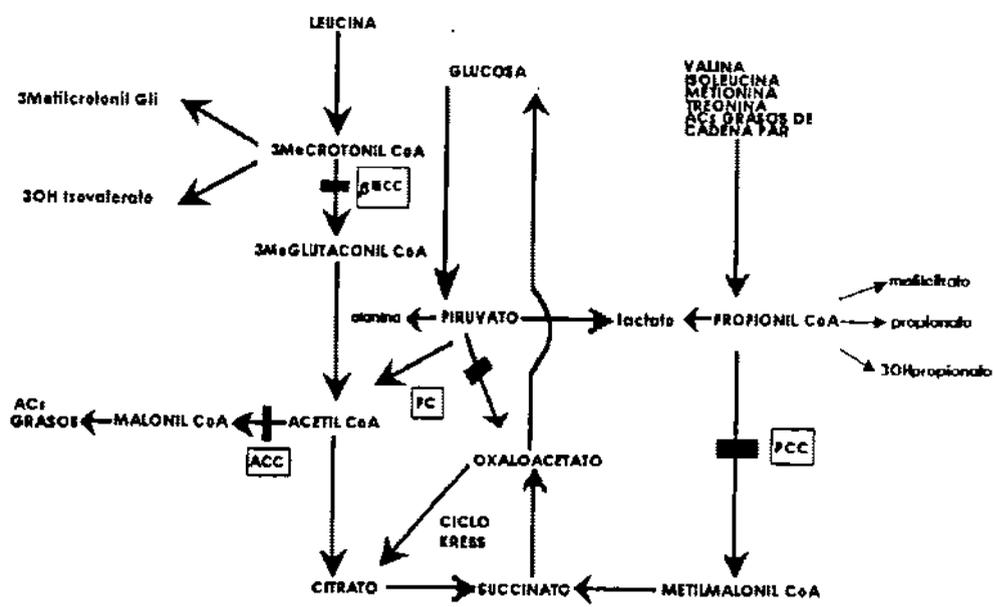
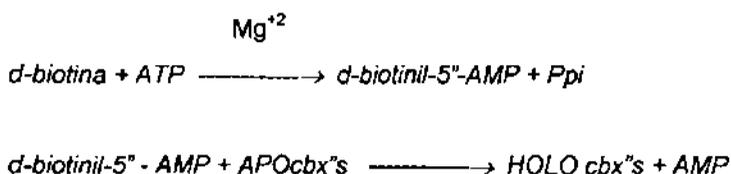


Figura 4. Vías metabólicas en las que actúan las 4 carboxilasas dependientes de biotina.

La PCC es un tetrámero compuesto por dos subunidades diferentes; la de mayor peso molecular es la que tiene la molécula de biotina. Cataliza la conversión de la propionil CoA a metilmalonil CoA, en la vía catabólica de los ácidos grasos de cadena impar, de los aminoácidos isoleucina, treonina, metionina y valina y del colesterol (13). En esta forma estos compuestos ingresan al ciclo de los ácidos tricarbónicos vía succinil CoA. La PCC ha sido aislada y purificada a partir de mitocondrias de riñón de res y de hígado humano.

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

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



En el primer paso se lleva a cabo la formación de un intermediario de alta energía a partir de biotina, ATP y Mg^{+2} y en el segundo se obtiene la holocarboxilasa mediante la transferencia del grupo biotinilo a la apocarboxilasa (14).

Al parecer sólo existe una HCS para todas las carboxilasas (15). Chiang y Mistry fueron los primeros en demostrar que la sintetasa localizada en el citosol puede activar tanto a la apopiruvato carboxilasa (enzima mitocondrial) como la apoacetil CoA carboxilasa (enzima citosólica), sugiriendo que quizá pueda activar a todas las apocarboxilasas. Posteriormente se observó que en humanos, un defecto genético en la sintetasa resulta en deficiencia de todas las carboxilasas(16).

La biotinidasa (biotina-amida aminohidrolasa) es la enzima que cataliza la hidrólisis del producto de degradación de las carboxilasas llamado biocitina (épsilon-n-biotinil-lisina); los productos de esta reacción son biotina y lisina. La biotina liberada de la biocitina es reutilizada por el organismo. Además, la biotinidasa participa en el aprovechamiento de la biotina en la dieta que, como se señaló anteriormente, en su mayor parte se encuentra unida a proteínas. Esta enzima fue descubierta en hígado de cerdo por Thomas y Peterson en 1954 (17). En el mismo año Wright (18) describió una enzima en plasma sanguíneo humano que hidrolizaba la biocitina y en 1963, Koivusalo y colaboradores (19) purificaron la biotinidasa de "*Streptococcus faecalis*". Más recientemente la biotinidasa ha sido purificada del plasma y suero humano, que es en donde se encuentra en mayor cantidad (20, 21). La biotinidasa es una glicoproteína que contiene residuos de ácido siálico (20).

El ciclo de la biotina demuestra el reciclamiento metabólico. Las dos enzimas principales involucradas en este ciclo son la holocarboxilasa sintetasa y la biotinidasa, que actúa como hidrolasa y libera a la biotina de la biocitina de pequeños péptidos biotinilados, los cuales resultan de la degradación proteolítica de las holocarboxilasas y posiblemente de las proteínas unidas provenientes de la dieta (Fig.5).

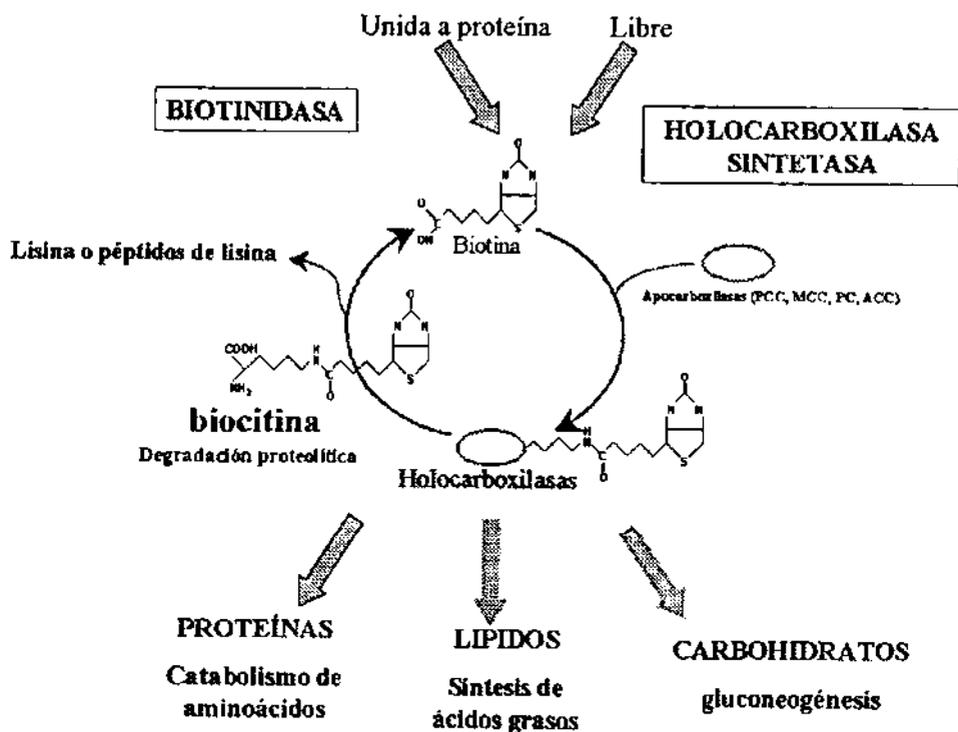


Figura 5. El ciclo de la biotina.

DEFICIENCIA DE BIOTINA

Los síntomas clínicos de deficiencia de biotina en humanos son: dermatitis periorificial, conjuntivitis, alopecia, irritabilidad o letargia, inmunodeficiencia, retraso en el desarrollo y crecimiento, además de crisis convulsivas y acidosis metabólica (22, 23).

Se han descrito casos aislados de deficiencia en esta vitamina, asociados a la ingestión de grandes cantidades de clara de huevo, la cual contiene avidina (24); también en humanos, sometidos a una alimentación parenteral total por tiempo prolongado (25) y en personas afectadas por algunos errores innatos del metabolismo (26). Cuando hay carencia de biotina se establece una deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC), resultando en bloqueos de la gluconeogénesis, anaplerosis del ciclo de Krebs, de la síntesis y elongación de los ácidos grasos y el catabolismo de varios aminoácidos y lípidos. Todos estos complejos trastornos metabólicos ocasionan manifestaciones clínicas graves que pueden llevar a la muerte.

En el caso de humanos con deficiencia múltiple de carboxilasas determinada genéticamente, se han descubierto dos clases de mutaciones: en el gen de la HCS y en el de la biotinidasa (27). Estas mutaciones muestran una correlación del cuadro clínico según la edad en que se inicia, cerca del nacimiento muy agudo y grave (16, 28, 29). Los pacientes con deficiencia de biotinidasa no son capaces de reciclar la biotina endógena y degradar completamente las holocarboxilasas, acumulándose la biocitina (30). La sintomatología es muy similar a la que se observa en la deficiencia nutricia de biotina. En la deficiencia de HCS, de aparición generalmente neonatal, lo que predomina es una grave acidosis metabólica, rápido deterioro neurológico y frecuentemente la muerte en pocos días. Ambos tipos de deficiencia múltiple de carboxilasas responden satisfactoriamente a la administración de grandes cantidades de biotina oral, con lo que desaparecen los síntomas clínicos, anteriormente se han descrito deficiencias aisladas de cada una de las carboxilasas y para cada caso existen síntomas específicos (26)

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

La deficiencia de biotina se puede inducir rápidamente en la mayoría de los animales monogástricos, alimentándolos con una dieta rica en avidina. Las principales manifestaciones de una severa deficiencia de biotina en diversas especies, se caracterizan por anomalías en la piel, pelo, problemas locomotores, reproductivos y de crecimiento; la dermatitis es un efecto común en la mayoría de animales, ya que en general presentan asperezas en la piel, rozaduras especialmente en la boca y ojos (32) (Fig.6).



Figura 6. Ratas machos deficiente de biotina a las 8 semanas.

CARACTERÍSTICAS DEL HÍGADO.

El hígado es la glándula más grande del cuerpo humano y llega a constituir hasta un 5% del peso total en niños y un 2.8% en adultos, en los que pesa aproximadamente 1.5 kg. Está formado por dos lóbulos principales, de los cuales el derecho es de mayor tamaño y por lóbulos secundarios (33). Está cubierto por una delgada cápsula de tejido conjuntivo que penetra en la glándula y la divide en lóbulos y lobulillos; dicha cápsula se denomina cápsula de Glisson (33).

La unidad estructural del hígado, llamada lobulillo hepático, está formada por el parénquima hepático, algunas ramas de la arteria hepática, conductos biliares y uno o más vasos linfáticos incluidos en el tejido conjuntivo. A diferencia de las demás glándulas exocrinas compuestas, los lobulillos del hígado en los humanos carecen de tabiques o divisiones interlobulillares. Sin embargo, tales divisiones sí se encuentran en los lobulillos hepáticos de cerdos y otros animales (34). Cuando se observa al microscopio, el lobulillo hepático presenta una forma hexagonal en cualquiera que sea la dirección del tejido en que se realice el corte histológico, de lo que se deduce que es tridimensionalmente poliédrico (35).

El hígado está formado por estroma y parénquima. El estroma está constituido por tejido conjuntivo, células de la pared de los vasos sanguíneos, epitelio de los conductos biliares y nervios. El parénquima consta de hepatocitos, células de Kupffer, células de Pit y células endoteliales (36). Los hepatocitos forman filas de una sola célula de espesor; una parte de ellos colinda con un conductillo biliar y la otra lo hace con un sinusoides. Estos sinusoides están alineados por filamentos discontinuos de células y desembocan en la vena central de los lobulillos hepáticos.

Los hepatocitos y las células de recubrimiento de los sinusoides se sostienen por fibras de reticulina, las cuales se extienden alrededor de la vena central de cada lóbulo (35).

Los procesos metabólicos que desempeña el hígado son esenciales para proveer de energéticos al cerebro, músculo y otros órganos corporales. Las vías metabólicas principales del hígado son: el ciclo de Krebs, que utiliza la acetil coenzima A como fuente de carbono; la gluconeogénesis, transaminación, desaminación y lipogénesis. Algunos de estos procesos se llevan a cabo en casi todos los tejidos, pero el tejido hepático es el único en donde ocurren todos ellos con importancia extrema.

Los componentes celulares del hígado se pueden dividir en tres categorías: A) células parenquimatosas, B) células sinusoidales y C) una fracción menor de otros tipos celulares(37). Daremos importancia a los primeros ya que son la base del presente trabajo.

Las células parenquimatosas son llamadas también hepatocitos y constituyen una población homogénea de células de origen endodérmico, que representa del 60% al 65% del total de células del hígado; son células relativamente grandes ya que su diámetro es de 10 a 30 μm , por ello ocupan cerca del 80% del volumen del órgano (37). Su forma es poliédrica, con una apariencia citoplasmática que varía de acuerdo con el estado de nutrición del individuo. En organismos bien nutridos estas células son las encargadas de almacenar glucógeno y de sintetizar lípidos; su núcleo es generalmente grande, más de la mitad de los hepatocitos son tetraploides y algunos llegan a tener hasta 8 veces el juego cromosómico; un 25% de ellos son binucleados (35). Los hepatocitos poseen numerosas mitocondrias, cada célula contiene 1000 o más de ellas; los polirribosomas son también abundantes, se encuentran libres y unidos a la membrana del retículo endoplásmico, poseen complejo de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso, contienen lisosomas de todos tipos, muchos de los cuales se encuentran cercanos a la membrana celular en la vecindad de los conductillos biliares. También

presentan microcuerpos, los cuales poseen un núcleo cristalino, característica que es dada por la uricasa, enzima que interviene en el metabolismo del ácido úrico.

La membrana del hepatocito se puede dividir en tres regiones: a) la que se encuentra en contacto con el espacio de Disse y que posee muchas microvellosidades que le permiten incrementar la superficie de absorción; b) las superficies laterales, que en la mayoría de las especies presentan prolongaciones e indentaciones que facilitan el contacto con los hepatocitos vecinos y c) zonas de contacto con los conductillos biliares, que son zonas de secreción principalmente de bilis (34).

Los hepatocitos llevan a cabo la mayor parte de las funciones del hígado, razón por la cual reaccionan a las hormonas insulina e hidrocortisona, sintetizando glucógeno. Sintetizan albúmina, fibrinógeno y casi todas las globulinas del plasma y muchas otras proteínas que participan en la coagulación de la sangre. Son también los encargados de controlar el nivel de los lípidos en la sangre(34) (Fig.7).

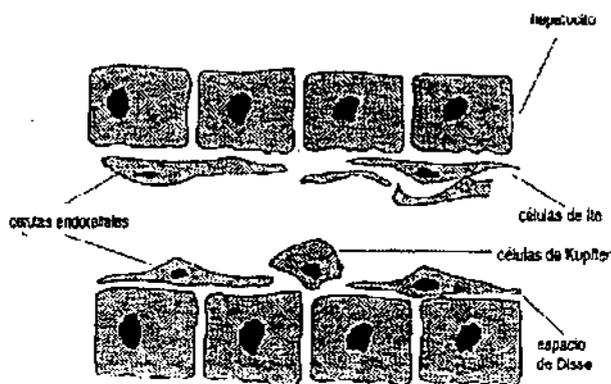


Figura 7. Diagrama de los principales tipos celulares residentes en el hígado.
Tomado de Decker, 1990.

AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS

Para el estudio del metabolismo hepático "in vitro", se han desarrollado varios tipos de sistemas experimentales dentro de los cuales está el modelo de cultivos de hepatocitos en monocapa. En el hígado, los hepatocitos se encuentran firmemente unidos entre sí a través de uniones específicas, así como por un tejido conjuntivo muy compacto, por lo que se había dificultado su aislamiento. La falta de éxito se debió en gran medida a una ignorancia de las propiedades de los componentes responsables de la adhesión célula-célula en el hígado. Ahora se sabe que los hepatocitos se encuentran unidos por 3 tipos de uniones intercelulares, que son las uniones impermeables o estrechas, los desmosomas y la unión tipo comunicante.

Uno de los primeros intentos para aislar hepatocitos fue descrito en 1943 por Scheider y Potter; en dicho método se hacía pasar al hígado a través de una tela de algodón y después por una malla de seda; las células aisladas se separaban de los restos celulares por medio de centrifugaciones diferenciales a bajas velocidades (38). Posteriormente, Bucher *et al* (1951) aislaron hepatocitos a partir de fragmentos de hígado en un medio acuoso, agitándolos con cuentas de vidrio sobre un agitador mecánico; obtuvieron un rendimiento de 10% de células. Mas tarde, se desarrollaron otras técnicas para aislar hepatocitos en las que utilizaron agentes quelantes en el medio de dispersión, tales como el EDTA o los citratos (38). Aunque estas técnicas incrementaban el rendimiento de las células, éstas se dañaban durante el procedimiento, ya que mostraban cambios en su fina estructura (37). En la década de 1960 aún predominaban los métodos mecánicos para la disgregación de las células. En 1967, Howard reporta el primer aislamiento exitoso de hepatocitos no dañados. Este método consistió en inyectar solución salina sin Ca^{2+} y con colagenasa (0.05%) y hialuronidasa (0.1%) a través de los sinusoides del hígado de la rata. La cantidad de células intactas obtenidas por este método fue sólo de 3 al 5 %. Posteriormente, se desarrolló otra técnica que permitió una mayor viabilidad y aprovechamiento del hígado dicha técnica, a diferencia de las anteriores, consistía en una perfusión del hígado con

enzimas proteolíticas. Esta técnica se convirtió en la forma más común de disgregar este órgano (39) (40) (41).

Sin embargo, estos métodos de disgregación se han optimizado. Una de las modificaciones más importantes, fue la perfusión del hígado en dos pasos, propuesta por Seglen en 1972. A partir de entonces, el método que se utiliza frecuentemente comprende dos pasos y las modificaciones incluyen variaciones en la concentración de las sustancias de cada una de las soluciones, en el sistema de amortiguadores para regular el pH, en la velocidad de flujo de las soluciones, en el tipo de enzimas proteolíticas y en su concentración. Las perfusiones se han realizado tanto "in situ" como "in vitro". También se han utilizado diferentes aparatos para llevar a cabo la perfusión (perfusores, bombas peristálticas, etc.).

CULTIVO DE HEPATOCITOS

Uno de los principales objetivos en la década de 1960 fue el lograr el cultivo de líneas celulares del parénquima del hígado normal, meta que no ha sido lograda completamente hasta la fecha. La técnica de cultivo de hepatocitos se empezó a desarrollar a partir de 1969 cuando se diseñó un método de obtención de hepatocitos intactos con altos rendimientos(42). Fue en 1973, cuando Bissell describió un método de cultivo en monocapa; en dicho sistema los hepatocitos conservan algunas actividades metabólicas después de 4 a 6 días de cultivo. Estas actividades incluían síntesis y secreción de albúmina, gluconeogénesis y respuesta a la insulina y glucagon. Sin embargo, el cultivo de hepatocitos por largos periodos ha presentado dificultades especiales, por lo que se ha probado el efecto de varios factores, con el fin de alargar la vida de los hepatocitos en cultivo y mantener las actividades metabólicas características de estas células. Entre los factores que se han adicionado al medio de cultivo, se incluyen varios tipos de hormonas como: la insulina y dexometasona (43), vitaminas tales como el ácido ascórbico , sustancias como el dimetil sulfóxido, etc. También se han utilizado diferentes tipos de medios de cultivo, en presencia o en ausencia de suero de distintas fuentes (44). Se encontró que el suero no autólogo parece ser dañino para los hepatocitos, ya que inhibe la expresión de funciones específicas del hígado.

Un factor que ha sido de gran importancia para mejorar las condiciones de los hepatocitos en cultivo ha sido el sustrato, se utiliza aquel que favorezca una mejor adhesión, de manera que el cultivo primario sea confluyente, ya que los hepatocitos en cultivo no se dividen, salvo en condiciones muy especiales. Por ello, se han probado una serie de sustratos tales como colágena aislada de tendón de rata, seca o en gel hidratado; gel preparado de tumor de Engelbreth-Holm-Swarm (45, 46, 47), laminina, fibronectina, mucopolisacáridos, etc (47).

Los hepatocitos en cultivo de monocapa generalmente adquieren una forma poliédrica, se aplanan y mantienen una relación estrecha con los hepatocitos vecinos, con los cuales llegan a formar uniones intercelulares (44). Se ha demostrado que esta relación con los hepatocitos vecinos es muy importante para mantener las características fenotípicas diferenciadas "in vitro" , al menos durante cortos periodos (48). Los hepatocitos cultivados en altas densidades, sobre geles hidratados de colágena se aplanan y presentan una organización trabecular compacta, mientras que células sembradas sobre el mismo sustrato, pero a bajas densidades, no se extienden y muestran niveles elevados de síntesis de proteínas del citoesqueleto, aunque bajos niveles de síntesis de albúmina (48).

La naturaleza del sustrato de adhesión influye grandemente en la síntesis de proteínas de los hepatocitos y favorece el que se puedan mantener vivos y con características diferenciadas; sin embargo, los cultivos no sobreviven más de 20 días cuando se siembran sobre sustratos de proteínas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han descrito casos aislados de deficiencia de biotina, asociados a la ingesta de grandes cantidades de clara de huevo cruda, con alto contenido de la proteína avidina, en humanos sometidos a alimentación parenteral por tiempo prolongado, humanos en hemodiálisis crónica (25) y en personas afectadas por errores innatos del metabolismo (26,27).

Cuando hay carencia de esta vitamina se establece una deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC), resultando bloqueos en la gluconeogénesis, anaplerosis del ciclo de Krebs, de la síntesis y elongación de los ácidos grasos y el catabolismo de varios aminoácidos y lípidos. Todos estos complejos trastornos metabólicos ocasionan manifestaciones clínicas graves que pueden llevar a la muerte. Estas manifestaciones clínicas incluyen: dermatitis periorificial, conjuntivitis, alopecia, irritabilidad o letargia, inmunodeficiencia, retraso en el crecimiento y desarrollo, además de crisis convulsivas y acidosis metabólica (27).

A pesar de que se sabe que la deficiencia de biotina provoca una disminución en la actividad de las carboxilasas, a la fecha no se sabe el grado de biotinilación y la velocidad de activación de PC, PCC y MCC en cultivos celulares al añadir biotina. Por lo cual se decidió trabajar con estas enzimas realizando el estudio de reactivación y determinando el grado de biotinilación por medio de blots de estreptavidina acoplada a fosfatasa alcalina en cultivos primarios de hepatocitos de ratas deficientes de biotina.

HIPOTESIS

1.-La reactivación enzimática de las carboxilasas PCC y PC será diferente al agregar biotina a cultivos primarios de hepatocitos de ratas deficientes de biotina.

2.- Las diferencias entre cada una de las actividades enzimáticas de las carboxilasas PCC y PC podrían estar relacionadas con sus grados de biotinilación.

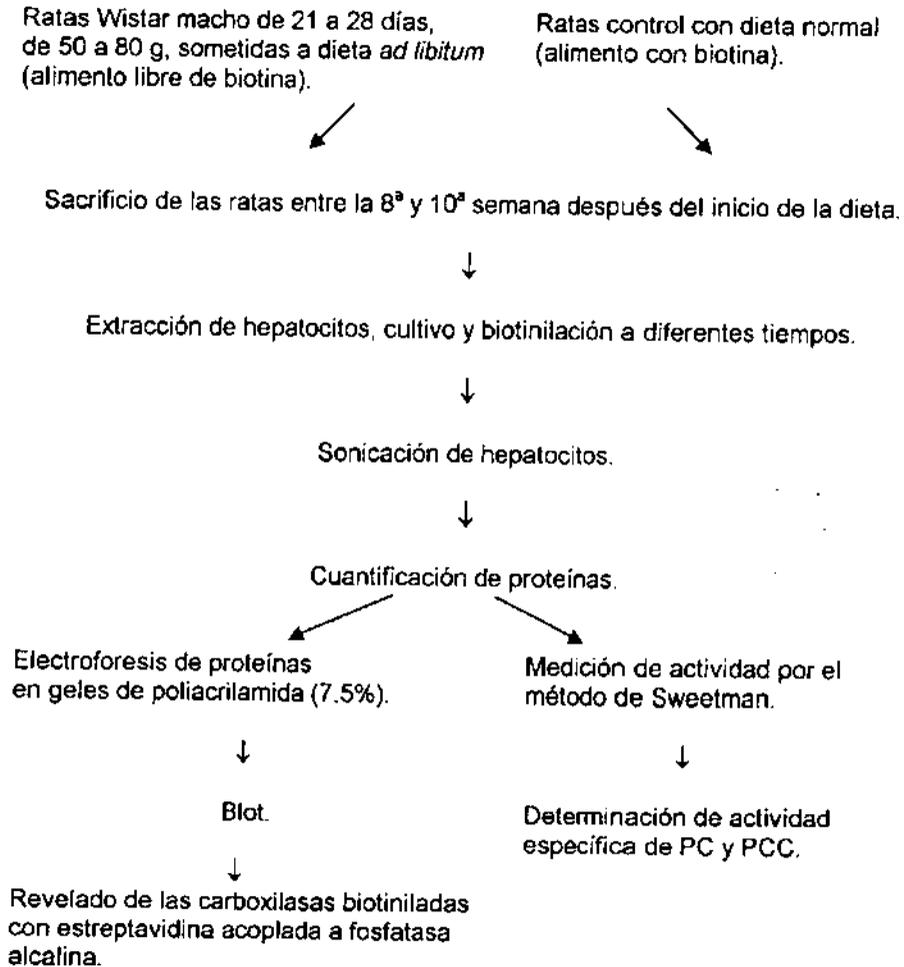
OBJETIVOS

1.-Determinar la actividad específica de las enzimas PCC y PC al agregar biotina a diferentes tiempos en cultivos primarios de hepatocitos de animales deficientes de biotina.

2.-Determinar el grado de biotinilación de PCC y PC en cultivos primarios de hepatocitos deficientes de biotina por medio de blots de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

3.-Determinar la relación que existe entre la actividad y el grado de biotinilación de la PCC y la PC en hepatocitos deficientes de biotina al agregarles esta vitamina.

DISEÑO GENERAL DEL ESTUDIO



MATERIALES Y MÉTODOS

EXTRACCION DE HEPATOCITOS Y CULTIVOS CELULARES

Reactivos.

Solución de Hanks (Gibco BRL)	200 mL
Solución de Hanks con calcio y magnesio (Gibco BRL).	200 mL
Medio de MEM (Gibco BR)	1 L
Colagenasa tipo IV 179 U/mg (Sigma)	20 mg
Azul de tripano al 0. 4%.	100 mL

Técnica

Para la obtención de hepatocitos, se utilizaron 2 ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 50 g de peso, recién destetadas. Estas iniciaron una dieta deficiente de biotina, entre la 8ª y 10ª semanas después de iniciada la dieta, la rata está completamente deficiente de biotina y tiene un peso aproximado de 200 g.

Antes del sacrificio, se anestesió a la rata con una inyección intraperitoneal de 13 mg de pentobarbital sódico; se colocó en una charola de disección, se lavó el abdomen con espuma isodine y se le cortó la piel. Una vez en la cavidad abdominal, se localizó la vena porta, por debajo de ésta se pasaron dos hilos, se anudó el hilo distal (con respecto a la cabeza) para cerrar la circulación; se hizo una pequeña incisión sobre la superficie de la vena por donde se introdujo la cánula con dirección al hígado, se fijó a la vena con el hilo proximal. Para perfundir el hígado (Fig. 8) se utilizó una solución de Hanks sin calcio que se colocó en la esfera del perfusor y una solución de Hanks con calcio que se colocó en el embudo, estas previamente incubadas a 37°C. Primero se dejó pasar la solución de Hanks sin calcio, y una vez lavado el hígado se agregaron 20 mg de colagenasa a la solución de Hanks con calcio y se dejó pasar hasta que el hígado tomara una consistencia pastosa; se procedió a cortar el tejido unido al hígado y

se extrajo colocándolo en una caja Petri con medio MEM se raspó con la boca de un tubo y posteriormente se filtró dos veces a éste se agregaron 30 ml de medio MEM centrifugándolo a 800 r.p.m. por 5 minutos.

Después se determinó la viabilidad de las células por exclusión con azul de tripano y cuando ésta fue del 85 a 90% se sembró 1 mL de células por caja de cultivo que previamente contenía 5 ml de medio MEM incubándose a 37°C (42).

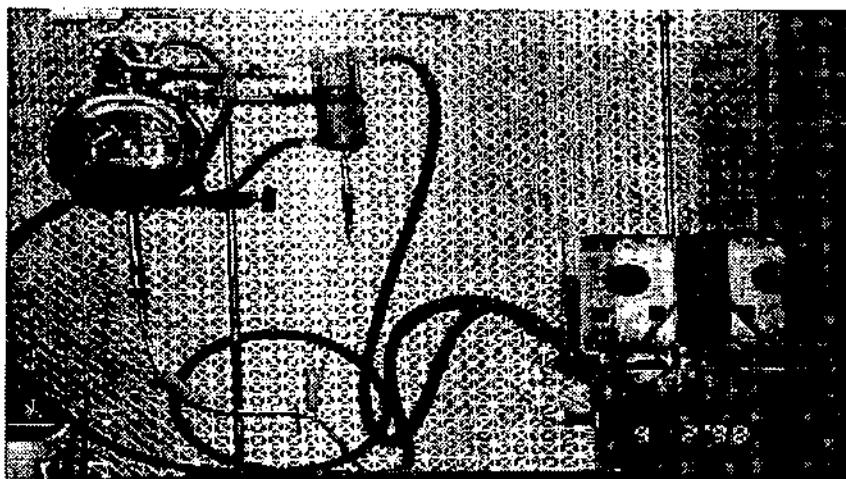


Figura 8. Aparato utilizado para la perfusión del hígado (Perfusor).

BIOTINILACION Y COSECHA DE HEPATOCITOS

Reactivos

Biotina (Sigma) 10 mM	10 mL
Medio de MEM (Gibco BR)	10 mL

Técnica

Se mantuvieron las cajas de cultivo en la incubadora por 6 horas; posteriormente se cambió el medio MEM por fresco y se inició la biotinilación. Se colocó a cada caja 100 μ l de biotina 10 mM con MEM. Posteriormente, de acuerdo al tiempo de cosecha, se raspó cuidadosamente con una espátula, toda la superficie de la caja para despegar a las células; después estas se colocaron en tubos previamente marcados y se centrifugaron a 15000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C. Finalmente, se les retiró el sobrenadante secando con una toalla de papel y se almacenaron en el ultracongelador (49).

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD.

Reactivos

Azul brillante de Coomassie G-250	100 mg
Albúmina de suero bovino	1 mg/mL
Etanol al 95%.	
Ácido fosfórico al 85%.	

Solución stock de Bradford

Azul Brillante de Coomassie G-250	100 mg
Etanol al 95%	50 mL
Ácido fosfórico al 85%	100 mL
Se afora a 1 litro.	

Técnica

La curva estándar se realizó con una dilución 1:10 de albúmina; se tomaron volúmenes equivalentes a 0, 2, 3, 5, 7 y 10 μg , se aforaron a 100 μl con agua bidestilada, se colocó 1ml de solución de Bradford, a cada tubo y finalmente se agitaron (50)(cuadro 1).

Cuadro 1 (curva estándar)

Tubos por duplicado	Albúmina (μg)	Albúmina (μl)	Agua (μl)	Solución de Bradford (mL)
1	0	0	100	1
2	2	20	80	1
3	3	30	70	1
4	5	50	50	1
5	7	70	30	1
6	10	100	0	1

Una vez determinada la curva patrón, se tomó un volumen de 2.5 μl del sobrenadante de los de hepatocitos de cada uno de los tiempos de cosecha; se aforó con 97.5 μl de agua bidestilada y 1 mL de solución de Bradford, se agitaron y se midieron las densidades ópticas en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 595 nm (cuadro 2).

Cuadro 2 (muestras)

Tubos	Muestra (μl)	Agua (μl)	Solución de Bradford (ml)
0	2.5	97.5	1
30 min	"	"	"
1 h	"	"	"
3 h	"	"	"
6 h	"	"	"
12 h	"	"	"
18 h	"	"	"
24 h	"	"	"

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

DETERMINACIÓN DE CARBOXILASAS

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

Reactivos

Amortiguador Tris 10X, pH8

Tris (Merck)	1 M
MgCl_2 (J.T.Baker)	8 mM
KCl (J.T.Baker)	600 mM
EDTA (Merck)	6 mM

Amortiguador de lisis, pH8

Tris (Merck)	50 mM
EDTA (Merck)	0.125 mM

Propionil CoA (Sigma).	40 mM
Acetil CoA(Sigma).	35 mM

Solución stock: Tris 10X + ATP + Glutati3n reducido (GSH)

ATP (Sigma) 28.5 mM

GHS (Merck) 20.0 mM

Amortiguador Tris 10X pH=8

Piruvato de sodio (Sigma) 40 mM

Citrato sintetasa (CS) (Sigma) 40 mM

18.6 unidades/mol de piruvato de sodio

3cido f3rmico (Merck) 15% (v/v)

Bicarbonato de sodio radioactivo (NaH¹⁴CO₃) (Amersham)

Actividad espec3fica: 3.81 (Ci/ μ mol).

Concentraci3n: 0.12 M

Soluci3n de centelleo (Bray)

Naftaleno (J.T.Baker) 180 g

PPO (difeniloxazol) (New England) 12 g

Etilenglicol (Sigma) 60 ml

Metanol (J.T.Baker) 300 ml

Dioxano (J.T.Baker) 3000 ml

Metanol (J.T.Baker) 50% (v/v).

Técnica

En tubos de 500 μ l se prepararon las siguientes mezclas de reacción (MR) correspondientes a cada enzima.

Cuadro 3

Reactivos	Blanco PCC	Blanco PC	PCCII	PCII
H ₂ O	16 μ l	15 μ l	55 μ l	-
ATP + GHS	8 μ l	15 μ l	55 μ l	50 μ l
Coenzima	-	-	55 μ l PCoA	50 μ l ACoA
Citrato sintetasa	-	15 μ l		50 μ l
NaH ¹⁴ CO ₃	8 μ l	15 μ l	55 μ l	50 μ l

Los botones de hepatocitos se descongelaron y se les agregó 200 μ l de amortiguador de lisis, de este modo se acondicionaron para el rompimiento de las mitocondrias y la subsecuente liberación de las enzimas contenidas en éstas. Este proceso se realizó por sonicación (sonicador Branson modelo 200) en frío, descargando 10 pulsos de 0.5 segundos con un descanso intermedio de 50 segundos y una intensidad de 22 Watts. Finalmente, se centrifugaron a 15000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C e inmediatamente se agregaron 10 μ l del sobrenadante a cada tubo incubándose por 1 hora a 37°C en agitación.

La reacción se detuvo al colocar los tubos a una temperatura de 4°C, posteriormente se les agregó 10 μ l de ácido fórmico al 15%, se mezclaron bien y se dejaron destapados 15 minutos para permitir el escape del NaH¹⁴CO₃ en exceso que se desprendió en forma de ¹⁴CO₂.

En tiras de papel Whatman 3MM se marcaron líneas divisorias cada 2.5 cm y cada cuadro formado se marcó con el número del tubo correspondiente. Pasado el tiempo de desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$, se colocaron 30 μl de la mezcla de reacción en su correspondiente cuadro de papel filtro y se secaron con pistola de aire (frío) por 15 minutos. Una vez seco el papel, se procedió a agregar 30 μl de ácido fórmico al 15% y se dejó secando nuevamente por 30 minutos con pistola de aire, de este modo se aseguró la ausencia de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ que no reaccionó.

Las tiras secas se recortaron en pequeños fragmentos; se colocaron en viales que contenían 7 mL de solución de Bray y 1 ml de metano al 50%. Los viales se agitaron con vórtex para extraer la muestra; posteriormente se contaron por 2 minutos en un contador de centelleo líquido (Packard Tri-Carb 4000 Series) con estándar externo.

CALCULOS DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS CARBOXILASAS.

Con las concentraciones de las proteínas y de el tiempo de incubación, se calculó la actividad específica de cada una de las enzimas con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{dpm}}{60 \text{ min}} \times \frac{5 \mu\text{l homogenado}}{\mu\text{l}} \times \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg prot.}} \times \frac{1 \text{ pmol}}{13.5 \text{ dpm}} = \text{pmol } ^{14}\text{CO}_2 \text{ fijadas / mg de prot.}$$

ELECTROFORESIS Y BLOT DE ESTREPTAVIDINA-FOSFATASA ALCALINA

Reactivos.

Acrilamida/ bis (30% t, 2.67% c)

Acrilamida (Bio-Rad)	146.0 g
Bis(N,N - metileno - bis Acrilamida) (Bio-Rad)	4.0 g
Tris HCl pH 8.8 (Sigma)	1.5 M
Tris HCl pH 6.8 (Sigma)	0.5 M
SDS (USB)	10%
Persulfato de amonio (Bio-Rad)	10%
N,N,N',N' - Tetrametiletilendiamina TEMED (Bio-Rad).	

Buffer de muestra

Agua destilada.	
Tris HCl pH 6.8 (Sigma)	62.5 mM
Glicerol (Baker)	20%
SDS (USB)	10%
2-Mercaptoetanol (Merck)	5%
Pironina	0.5%

Diluir la muestra de hepatocitos 1:4 con el buffer de muestra a 95°C por 4 minutos.

Buffer de corrida 5X

Tris base (Sigma)	25 mM
Glicina (Gibco)	192 mM
SDS (USB)	0.1%

Ajustar el pH a 8.3 con NaCl.

Buffer de transferencia

Tris base (Sigma)	48 mM
Glicina (Gibco)	39 mM
SDS (USB)	1.3 mM
Metanol (Merck)	20 %

Se afora a un litro con agua destilada.

Buffer blotto al 5%

Acido bórico (Baker)	100 mM
Tetraborato de sodio (Sigma)	47 mM
NaCl (Baker)	75 mM
Leche en polvo (Nido)	5 %

Aforar a 500 ml con agua destilada.

Buffer de incubación de replica

NaCl (Baker)	9 %
Tris HCl pH 7.4 (Sigma)	10 mM
Tween 20 (Research Organics)	0.05 %

Aforar a 1 litro con agua destilada.

Buffer 1 de lavado.

NaCl (Baker)	0.15 M
Tritón X 100 (Equipar)	0.25 %
Fosfato de sodio dibásico (Baker)	20 mM

Aforar a 200 ml con agua destilada.

Buffer 2 de lavado.

Tris-HCl pH 8 (Sigma).	0.15 M
------------------------	--------

Buffer AP

Tris base (Sigma)	100 mM
NaCl (Baker)	100 mM
MgCl ₂ (Merck)	5 mM

Ajustar el pH a 9.5 con NaCl y aforar a 200 ml, con agua destilada.

BCIP (5-Bromo-4 cloro 3-indol-sal de Fosfato-Toluidina)(Bio-Rad)

1.5% en DMF (N,N-Dimetilformamida).

NBT (cloruro tetrazolium nitroazul) (Bio-Rad) 3% en DMF al 70%.

Membrana de nitrocelulosa de 0.45 micras (Bio-Rad, Hercules, CA).

Técnica

Se ensamblaron los vidrios con los separadores de 0.75 mm y se vertió entre estos la mezcla de poliacrilamida que previamente se preparó. Una vez que polimerizó, se colocó el peine y se vertió la segunda mezcla dejándola polimerizar por 3 minutos. Después se retiró el peine y cada carril se secó con tiras de papel filtro e inmediatamente se les añadió agua para que no se cerraran; el gel ya formado se colocó en la cámara de electroforesis a la cual se le añadió buffer de corrida. Las muestras de hepatocitos biotinilados se descongelaron, mezclaron con buffer de muestra 1:1 y calentaron a 95°C durante 5 minutos. Se colocaron 50 µg de proteína (10 µl aproximadamente) en cada carril y finalmente se migró a 80 volts. Cuando las muestras llegaron a la parte inferior, se detuvo la migración y el gel se marcó por el frente (49).

Transferencia a la membrana de nitrocelulosa

El gel se lavó con buffer de transferencia durante 5 minutos a temperatura ambiente y en éste se humedeció la membrana de nitrocelulosa junto con 6 pedazos de papel filtro. Primero se colocaron 3 papeles en el ánodo de la cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad), eliminando las burbujas de aire, enseguida se colocó la membrana de nitrocelulosa 0.45 μm (Bio-Rad, Hercules, CA), después el gel de acrilamida y finalmente se colocaron los 3 papeles restantes. La transferencia se realizó a 17 volts durante 30 minutos. Una vez terminada la transferencia, la membrana se incubó en 50 mL de amortiguador Blotto al 5%, a 25°C por 1 hora con agitación suave.

Terminando el tiempo de incubación, la membrana se lavó con 80 ml de amortiguador de incubación de réplica 3 veces durante 5 minutos a 25°C con agitación suave. Posteriormente se colocó en un refractario con 10 μl de estreptavidina fosfatasa-alcalina y 100 ml de amortiguador de lavado, se cubrió con papel aluminio incubando a 25°C con agitación suave durante toda la noche. Al día siguiente, se lavó tres veces con amortiguador de incubación de replica a 25°C con agitación suave por 5 minutos; posteriormente se lavó con 50 ml de Tris HCl 0.15 M pH 8 y se tñó con 100 mL de amortiguador AP, 100 μl de NTB y 100 μl de BCIP (Fig. 9). Incubando con agitación continua se cubrió con papel aluminio, al aparecer las bandas se lavó con abundante agua de la llave y posteriormente se dejó secar sobre papel (49).

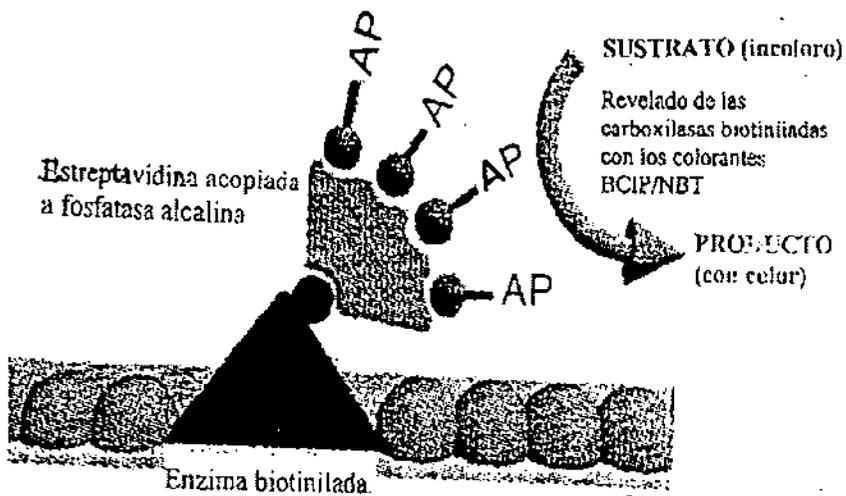


Figura 9. Esquema de un blot de estreptavidina acoplada a fosfatasa alcalina (AP).

RESULTADOS

ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS CARBOXILASAS MITOCONDRIALES.

Las ratas cepa Wistar, recién destetadas, fueron sometidas a una dieta deficiente de biotina. Entre la 8ª y 10ª semana se consideraron ratas deficientes.

Al determinar la actividad específica de las enzimas mitocondriales se encontró que la PCC se reactivó lentamente ya que transcurrieron 24 horas desde que se le agregó biotina a los cultivos primarios de hepatocitos para que alcanzara el valor normal de actividad (gráfica 1); por otra parte, en el caso de la PC la reactivación fue más rápida, ya que comienza desde los primeros 5 minutos con una curva ascendente hasta que en las primeras 2 horas casi alcanza el valor normal; finalmente llega a estos valores y se mantiene a partir de las 18 horas (gráfica 2).

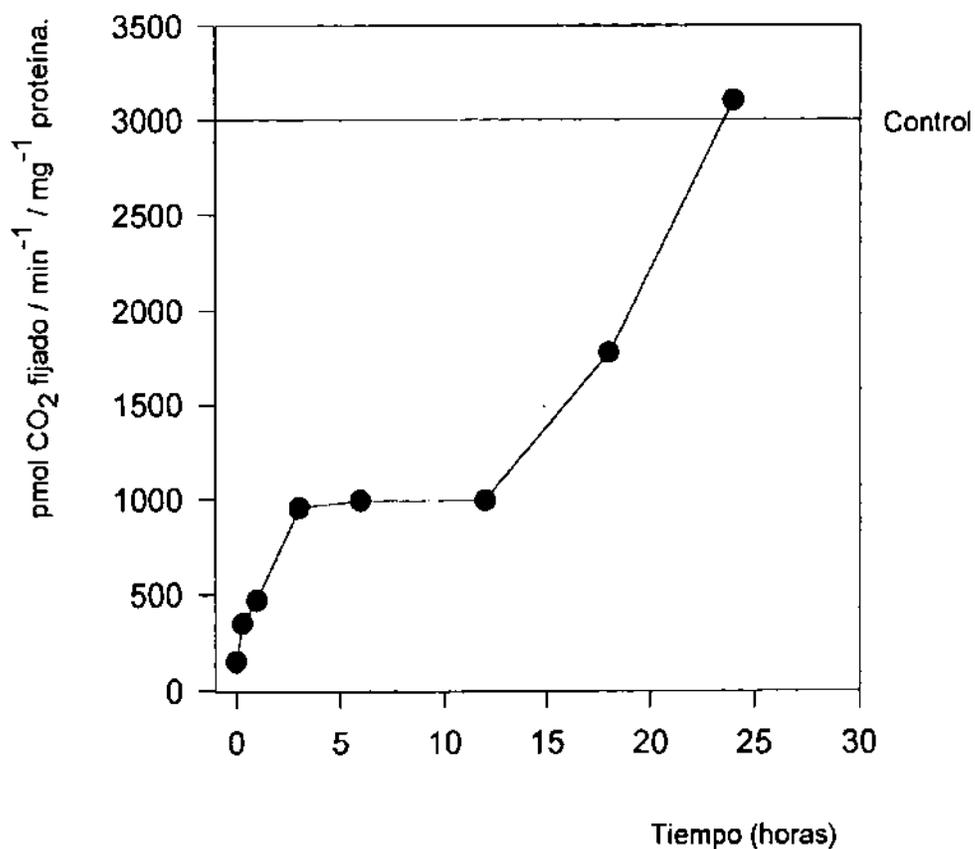
ANÁLISIS DE PROTEÍNAS BIOTINILADAS POR BLOT DE ESTREPTAVIDINA

Se realizó una electroforesis de las muestras y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm , usando estreptavidina como una alternativa de inmunoblots, se sabe que la unión estreptavidina-biotina es tan específica como lo es la de un antígeno-anticuerpo, lo cual hace que las enzimas cuyas subunidades contengan un sitio de unión a la biotina sean reconocidas rápidamente.

Las subunidades unidas a la biotina de la PCC y MCC tienen pesos moleculares similares (72,000 y 76,000 Daltons respectivamente), estas se separan muy poco en SDS-PAGE de hecho en un gel de baja concentración (7.5%).

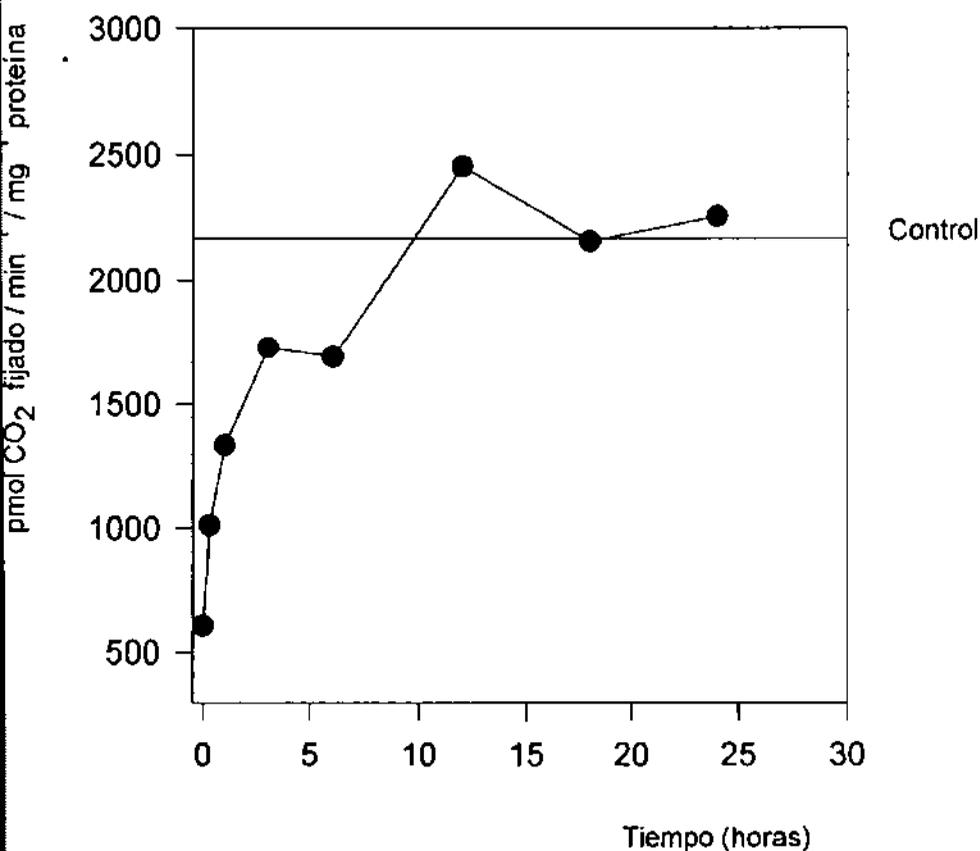
Se encontró que la banda correspondiente a la holo-PC alcanza una intensidad similar a la del control en una hora, manteniéndose más o menos constante hasta las 24 horas. Mientras tanto la holo-PCC y la holo-MCC permanecieron por debajo del control hasta las 24 horas después de la adición de biotina a los cultivos primarios de hepatocitos deficientes de biotina (figura 10).

ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA PCC



Gráfica 1. Reactivación de la PCC en cultivos primarios de hepatocitos deficientes de biotina, después de agregar biotina a diferentes tiempos.

ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA PC



Gráfica 2. Reactivación de la PC en cultivos primarios de hepatocitos deficientes de biotina, después de agregar biotina a diferentes tiempos.

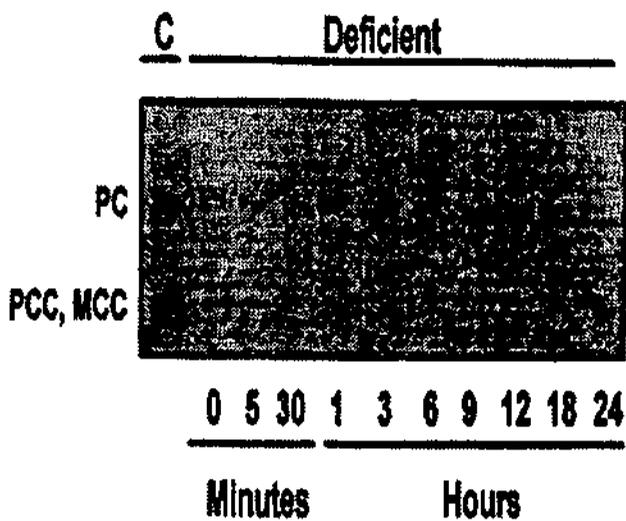


Figura 10. SDS, PAGE al 7.5% de enzimas biotiniladas. Cinética de biotinilación de la PC, PCC y MCC después de añadir biotina a cultivos primarios de hepatocitos deficientes (N = Normal).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se eligieron hepatocitos debido a que el hígado es el principal órgano de síntesis y actividad de las enzimas PC y PCC, relacionadas en el metabolismo de biotina.

PC mostró un comportamiento diferente al de la PCC cuando se agregó biotina a los cultivos primarios de hepatocitos deficientes de biotina. La PCC requirió cerca de 24 horas después de la adición de biotina para alcanzar la actividad del control, mientras que la PC llegó a los niveles del control dentro de las 2 horas primeras. Para complementar este estudio se realizaron blots de estreptavidina-fosfatasa alcalina, y se observó que el comportamiento de biotilación para la banda correspondiente a la holo-PC de células deficientes alcanzó una intensidad similar a la del control en una hora; sin embargo la holo-PCC y la holo-MCC permanecieron por debajo de la intensidad del control hasta las 24 horas después de la adición de biotina a los cultivos primarios de hepatocitos. No hubo cambios en las bandas de las células control ni en las actividades específicas de la PCC y la PC después de la adición de biotina a los cultivos.

Estos resultados nos hacen pensar que como PC es una enzima clave en la gluconeogénesis y durante la deficiencia de biotina es más estable o se degrada menos al igual que su apoproteína no se afecta y biotinila preferentemente, lo que con la PCC no sucede, probablemente se reduce la síntesis y puede existir una menor estabilidad o una alta tasa de degradación en su forma apo. Estas aseveraciones se pueden corroborar haciendo los mismos experimentos en diferentes órganos de rata y determinar si existe el mismo comportamiento enzimático.

Otra posible explicación de las diferencias en los resultados entre las dos enzimas es el hecho de que la masa de PCC pudiera estar disminuida durante la deficiencia de biotina lo cual no sucedería con la PC, por lo cual se realizaron estudios paralelos para determinar las masas enzimáticas de cada una de las enzimas en hígados de ratas normales y deficientes de biotina. Se encontró que efectivamente la masa enzimática de PCC y MCC disminuyó al haber deficiencia de biotina, lo cual no sucedió para PC; estos resultados pueden explicar el rápido aumento de la actividad de la PC y el de su forma biotinilada cuando agregamos la vitamina a los cultivos primarios de hepatocitos deficientes de biotina; y para la PCC su lenta reactivación y biotinilación.

La técnica de blot de estreptavidina-fosfatasa alcalina, fue utilizada para detectar a todas las carboxilasas en su forma holo después de biotinifarse, y es una alternativa mas ya que no contábamos con un anticuerpo específico para cada una de estas enzimas.

Es importante señalar que en la membrana de nitrocelulosa solo se observaron dos bandas, una superior que corresponde a la holo-PC y una inferior perteneciente a la holo-PCC y la holo-MCC, ya que ambas tienen pesos similares (72,000 y 76,000 Da respectivamente) y se separan muy poco. Debido al tiempo de corrimiento de la electroforesis la ACC cuyo peso molecular es de 260,000 Da no se observó.

Nuestros resultados son similares a los de Shriver *et al* (52), quienes observaron una rápida reactivación de la PC en comparación a la PCC (y MCC) después de inyectar biotina a ratas deficientes de ésta. En otros estudios solo una carboxilasa presentó resultados similares a los nuestros, ya que la PC comenzó a restablecerse en las 2 primeras horas (53) y la PCC requirió de 12 horas (54). Sin embargo otros autores, han reportado una lenta reactivación para ambas carboxilasas después de inyectar a ratas deficientes de biotina (55) ó después de la adición de biotina a cultivos primarios de hepatocitos deficientes (56).

Estas discrepancias podrían reflejar diferencias en las técnicas experimentales utilizadas o la dificultad para detectar un factor biológico.

Por otra parte en otros estudios del laboratorio se estudiaron los ARN mensajeros de estas enzimas y no se encontraron cambios apreciables durante la deficiencia de biotina, por lo cual se cree que las diferencias en la regulación de las proteínas enzimáticas PCC y MCC se dan a nivel post-transcripcional (57).

Esta es la primera vez que se observa un efecto diferencial de la biotina sobre la expresión de las carboxilasas mitocondriales. Nuestros resultados sugieren que la biotina regula la expresión de las carboxilasas catabólicas (PCC y MCC), esta regulación ocurre a nivel post transcripcional y la PC, una enzima clave para la gluconeogenesis, anaplerosis del ciclo de Krebs y síntesis de ácidos grasos, esta fuera de este control.

CONCLUSIONES

- La piruvato carboxilasa (PC) mostró una rápida cinética reactivación con respecto a la de la propionil CoA carboxilasa (PCC) durante la deficiencia de biotina.

- La diferencia entre la cinética de reactivación de cada una de las carboxilasas está relacionada a los grados de biotinilación.

- La técnica por blots fue una alternativa muy eficaz al no contar con un anticuerpo específico para cada una de las carboxilasas.

PERSPECTIVAS

- Realizar los mismos estudios en otros órganos tales como: riñón, corazón, músculo, etc., para conocer la respuesta después de la adición de biotina.

- Estudiar la cinética de reactivación y grado de biotinilación de otras carboxilasas como la ACC ya que es una enzima citosólica y para la holocarboxilasa sintetasa que es la enzima responsable de la unión de la biotina con las carboxilasas.

1954

1954

REFERENCIAS

1. Dakshinamurti K, Chahuan J. Biotin. *Vitamins and hormones* 1989;45:3338.
2. Friedrich W. Biotina. En: *Vitaminas*. Berlin: Walter de Gruyter, 1998: 753-805.
3. Kogl F, Tonnis B. Plant growth substance XX. The bios problem. Isolation of crystalline biotin from egg yolk. *Physiol Chem* 1936;242:43-73.
4. Gyorgy P. The curative factor (vitamine H) for egg white injury, with particular reference to its presence in diferent foodstuffs and in yeast. *J Biol Chem* 1940;131:733-744.
5. Du Vigneaud V. On the structure of biotin. *J Am Chem Soc* 1942;64:188-189.
6. Harris S, Wolf D. Syntetic biotin. *Science* 1943;97:447-448.
7. Du Vigneaud V. Growth stimulating effect of biotin for difteria bacillus in absence of pimelic acid. *Science* 1942;96:183-187.
8. Moss J, Lane MD. The biotin-dependent enzymes. *Adv Enzymol*. 1971;35:321-398.
9. Siegel L, Foote JL, Christner JE, Coon MJ. Propionyl -CoA holocarboxylase synthesis from biotinyl adenylate and the apocarboxylase in the presence of an activating enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1963;3:307.
10. Gruckhait R. Acetyl Coenzyme A carboxylase subunit structure of the protomeric form of the avian liver enzyme. *J Biol Chem* 1974;249:4776-4780.
11. Ballard FJ, Hanson RW. The citrate cleavage pathway and lipogenesis in rat adipose tissue: replenishment of oxaloacetate. *J. Lipid Res*. 1967;8:73-79.
12. Nakano E. The identification of a serum viability factor for SV3T3 cell as biotin and its possible relationships to the maintenance of Krebs cycle activity. *Arch Biochem Biophys* 1982;215:556-563.
13. Rosenberg LE. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. 5th edition. New York: 1983. (Hill MG, ed.
14. Achuta M, Mistry S. Some aspects of biotin binding to protein catalized by biotin deficient chicken liver preparations. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;145:564-570.
15. Chiang Gs, Mistry S. A comparative study of pyruvate holocarboxilase synthesis in rat liver and kidney preparation. *Int J Biochem* 1975;6:527-531.

16. Sanders ME, Sherwood WG. Evidence for a defect of holocarboxylase synthetase activity in culture lymphoblasts from a patient with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *J Clin Invest* 1981;68:1491-1495.
17. Thomas RW, Peterson WH. The enzymatic degradation of soluble bound biotin. *J Biol Chem* 1954;210:569-579.
18. Wright L. Byocitinase and enzyme concerned with hydrolytic cleavage of byocitin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1954;86:335-337.
19. Koivusalo S. Bacterial biotinidase. *J Biol Chem* 1963;238:1038-1042.
20. Chauhan J, Dakshinamurti K. Purification and characterization of human serum biotinidase. *Biol Chem* 1986;261:4268-4276.
21. Craft D, NH G. *et al.* Purification of biotinidase from human plasma and its activity on biotinyl peptides. *Biochem* 1985;24(10):2471-2476.
22. Williams RH. Clinical biotin deficiency. *N Engl J Med* 1943;228:24.
23. Sweetman L, Surh L. *et al.* Clinical anomalies in a boy with dietary deficiency of biotin. *Pediatrics* 1981;68:553.
24. Scott D. Clinical biotin deficiency (egg white injury) report of a case with some remarks on serum cholesterol. *Acta Med Scand* 1951;162:69-72.
25. Velázquez A, Zamudio S. *et al.* Indicators of biotin status: a study of patients on prolonged total parenteral nutrition. *Eur J Clin Nutr* 1990;43:11-16.
26. Wolf B, Feldman G. The biotin-dependent carboxylase deficiencies. *Am J Genet* 1982;34:699.
27. Nyhan M. In born errors of biotin metabolism. *Arch Dermatol* 1987;123:1696-1698.
28. Burry B, L S. *et al.* Heterogeneity of holocarboxylase synthetase in patients with biotin responsive multiple carboxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985;34:326-337.
29. Wolf B, Grier R. *et al.* Biotinidase deficiency: The enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clin Chim Acta* 1983;131:273-281.
30. Wolf B. Deficient biotinidase activity in late onset multiple carboxylase deficiency. *N Engl J Med* 1983;308:161.
31. Velázquez A, Terán M. *et al.* Biotin supplementation affects lymphocyte carboxylases and plasma biotin in severe protein-energy malnutrition. *Am J Clin Nutr* 1995;61:385-391.
32. Whitehead C. Assesment of biotin deficiency in animals. *Ann NY Acad Sci* 1985;447:86-96.

33. Leeson CR. Histologia. México: 1987. Interamericana
34. Ham AD. Histologia. México: 1983. Interamericana
35. Wheater PR. Functional Histology. Londres: 1986. Livingstone C.
36. Glaumann HP, Peters T. *et al.* Plasma protein secretion by the liver. New York: 1983. press A
37. Philliphs S. The liver. New York: 1987. Press R.
38. Berry MN. Isolated hepatocytes preparation properties and applications. Elseviere Netherlands 1991:460.
39. Bissell DM, Hammaker L. Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. J Cell Biol 1973;59:722-734.
40. Howard RB, Lee JC. *et al.* The fine structure potassium content and respiratory activity of isolate rat liver parenchymal cells prepared by improved enzymatic techniques. J Cell Biol 1973;57:642-658.
41. Tanaka K, Sato M. *et al.* Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats. J Biochem 1978;84(4):937-946.
42. Berry M, DS F. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cell. A biochemical and fine structural study. J Cell Biol 1969;43:506-520.
43. Kuri W. Cultivation of adult rats hepatocytes on 3T3 cells: expression of various liver differentiated functions. Differentiation 1989;41:148-157.
44. Enat R. Hepatocyte proliferation in vitro its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrate of extracellular matrix. Proc Natl Acad Sci 1984;81:1411-1415.
45. Strom S, Michalopoulos G. Collagen as a substrate for cell growth and differentiation. Methods Enzymol 1982;82:544-555.
46. Ben-Ze'ev A, Robinson GS. *et al.* Cell-cell and matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. Proc Natl Acad Sci 1988:2161-2165.
47. Rojkind M, Gatmaitan Z. *et al.* Connective tissue biomatrix: Its isolation and for long-term cultures of normal hepatocytes. J Cell Biol 1980;87:255-263.
48. Obrink B. Hepatocyte-collagen adhesion. Methods enzymol 1982;82:513-529
49. LeClerc, Daniel, Comunicación personal.
50. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254, 1976.

51. Sweetman L. Protocol miniaturized. Comunicación personal.
52. Shriver BJ, Roman SC. *Et al.* Depletion and repletion of biotinyl enzymes in liver of biotin-deficient rats: evidence of a biotin storage system. *J. Nutr.* 1993;123:1140-1149.
53. Deodhar AD, Mistry SP. Gluconeogenesis in biotin deficiency: in vivo synthesis of pyruvate holocarboxylase in biotin deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1969;34:755-759.
54. Kosow DP, Lane MD. Restoration of biotin-deficiency-induced depression of propionyl carboxylase activity in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1961;4:92-95.
55. Weiner D, Wolf B. Biotin uptake, utilization, and efflux in control and biotin-deficient rat hepatocytes. *Biochem Med & Metab Biol* 1991;46:344-363.
56. Weiner D, Wolf B. Biotin uptake in cultured hepatocytes from normal and biotin deficient rat hepatocytes. *Metab Biol* 1990;44:271-281.
57. Rodríguez-Meléndez R, Pérez-Andrade ME, *et al.* Differential effects of biotin deficiency and replenishment on rat liver pyruvate and propionyl CoA carboxylases and on their mRNAs. *Mol Genet Metab* 1999;66(1):16-23.