



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ALIMENTACIÓN CON DIETAS QUE APORTAN DISTINTAS  
CANTIDADES DE BIOTINA. ACCIONES AGUDAS SOBRE  
LAS CARBOXILASAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:  
MARCO ANTONIO PARRA MONTES DE OCA**

**MÉXICO, D.F**

**2011**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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:** Profesor: DR. JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

**VOCAL:** Profesor: M. en C. LUCIA CORNEJO BARRERA

**SECRETARIO:** Profesor: DRA. ARMIDA BÁEZ SALDAÑA

**1er. SUPLENTE:** Profesor: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

**2° SUPLENTE:** Profesor: M. en C. ARGELIA SÁNCHEZ CHINCHILLAS

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS. UNAM**  
Tercer Circuito Escolar S/N Ciudad Universitaria, UNAM Código Postal  
04510 Del. Coyoacán México D.F.

---

---

Asesora del tema: Dra. Armida Báez Saldaña

---

Sustentante: Marco Antonio Parra Montes de Oca

El presente trabajo se desarrolló con apoyo el financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA/PAPIIT IN215311) de la Universidad Nacional Autónoma de México y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (82879).

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por permitirme realizar mis estudios en sus instalaciones durante estos últimos años.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA/PAPIIT IN215311) como becario para la elaboración de tesis de licenciatura.

A la MVZ Georgina Díaz Herrera y al MVZ Jorge Omar García Rebollar por los cuidados y enseñanza en el manejo de los ratones en el bioterio.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina y a la C. a Dra. Margarita Gómez Chavarín por el apoyo brindado en el laboratorio.

A la Dra. Armida Báez Saldaña por su paciencia, dedicación, apoyo y enseñanzas durante todo este trabajo de tesis.

## DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico especialmente a mi familia: mi madre Irma Montes de Oca que me ha enseñado a no rendirme ante cualquier adversidad, además de todo el apoyo y cariño que me ha proporcionado todos estos años; mi padre José Luis Parra, por todo su apoyo, perseverancia y cariño que sólo un padre puede dar y mi hermano Julio Cesar Parra que siempre ha sido un ejemplo para mí.

A mis amigos de la preparatoria y especialmente a Edith, Carolina y Masao que hicieron mi último año en la prepa uno de los mejores.

A mis amigos de la universidad, empezando con los de “La banda 17”: Gaby, Ximena, Thalia GT, Mariana, Paulina, Lluvia, Laura, Karen, Thalia GR, Ricardo, Alejandro M, Andrés, Pedro, Ivan P, Eduardo L, Diego, Carlos, Julio, Javier, Eduardo A, Yair, Alejandro A, Ivan N, Efrain y demás personas que me faltan mencionar que, por más de 4 años, hicieron mi estadía en la facultad una de las mejores experiencias de vida.

A mis amigos QA y de otras carreras que estuvieron conmigo a lo largo de la carrera y me hicieron pasar buenos ratos.

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
<b>1. Marco teórico</b>	
1.1. Biotina.....	1
1.2. Carboxilasas: enzimas dependientes de biotina.....	3
1.2.1. Acetil CoA carboxilasa.....	5
1.2.2. $\beta$ -Metilcrotonil CoA carboxilasa.....	6
1.2.3. Propionil CoA carboxilasa.....	7
1.2.4. Piruvato carboxilasa.....	7
1.2.5. Deficiencia múltiple de carboxilasas y deficiencia aislada de carboxilasas.....	8
1.3. Deficiencia de biotina y efectos en el crecimiento corporal.....	10
1.4. Músculo esquelético.....	12
1.5. Carboxilasas en músculo esquelético.....	14
<b>2. Justificación.....</b>	<b>15</b>
<b>3. Hipótesis.....</b>	<b>15</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>16</b>
<b>5. Materiales y métodos.....</b>	<b>17</b>
<b>6. Resultados.....</b>	<b>23</b>
<b>7. Discusión.....</b>	<b>31</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>36</b>
<b>9. Referencias.....</b>	<b>37</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>4</b>

# 1. Marco teórico

## 1.1. Biotina

La biotina es una vitamina hidrosoluble que pertenece al complejo B, también es conocida como vitamina B<sub>7</sub>, vitamina H (del alemán, *haut*, piel), coenzima R (factor de crecimiento para *Rhizobium*) o Bios II (Hernández-Rodríguez y Sastre-Gallego, 1999).

En 1936, Kögl y Tönnis, identificaron a la biotina en la yema de huevo, fue reconocida como un factor de crecimiento para levaduras y algunas bacterias, así como protector contra la toxicidad que producía la clara de huevo en algunas dietas para ratas (Melo-Ruiz y Cuamatzi, 2007), su estructura fue determinada por Vigneaud y colaboradores en 1942 y dos años después fue sintetizada por Harris y colaboradores (Levert, 2002).

La estructura de esta vitamina está constituida por un anillo de ureido unido a un tetrahidrotiofeno y en este último con una cadena lateral de ácido valérico. Al tener 2 carbonos quirales podrían existir 8 isómeros para esta vitamina, pero sólo el isómero d-biotina se encuentra en la naturaleza y tiene actividad como vitamina (Wolf, 1982). Los vertebrados no pueden llevar a cabo la síntesis de biotina, por lo que se considera una vitamina esencial.

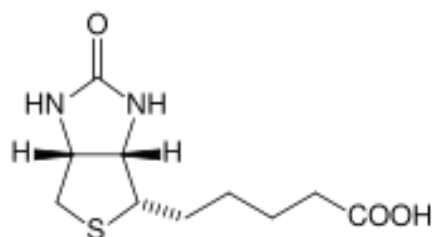


Figura 1. Estructura de la biotina

Los alimentos con mayor cantidad de biotina son hígado, riñón, levadura, yema de huevo, leche y productos lácteos, cereales, coliflor, guisantes y legumbres (Biesalski y Grimm, 2007). En la mayoría de los alimentos, la biotina se encuentra ligada a proteínas; al efectuarse la digestión de proteínas que contienen biotina, se liberan péptidos y el dímero de biotina-lisina denominado biocitina (Hernández-Rodríguez y Sastre-Gallego, 1999). La biotina libre se absorbe en el intestino por la acción de un transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT) que no puede operar sobre la biocitina, por lo que ésta debe hidrolizarse con ayuda de la biotinidasa, que es una enzima segregada por el páncreas (Zempleni, 2008). En la sangre humana, la concentración de biotina puede estar entre 200 a 1200  $\mu\text{g/L}$ , la mayor parte se encuentra en forma libre y cerca del 10 % dentro de los eritrocitos (Biesalski y Grimm, 2007).

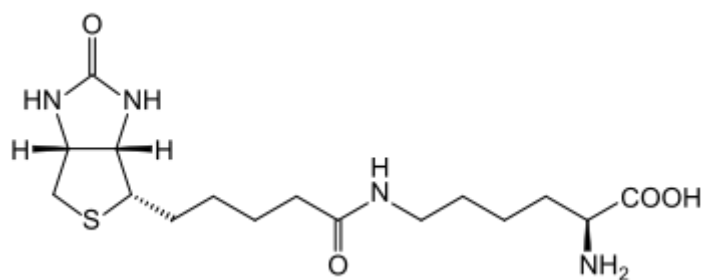


Figura 2. Estructura de la biocitina

En 1998, la organización Food and Nutrition Board de los Estados Unidos consideró que la evidencia científica que existía era insuficiente para calcular un ingesta diaria recomendada para la biotina, por lo que propuso que de 5 a 35  $\mu\text{g/día}$  eran convenientes para las distintas etapas de la vida (Food and Nutrition Board, Estados Unidos, 1997-1998). Con base en esta propuesta, en



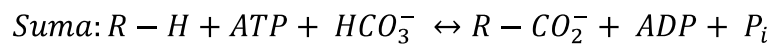
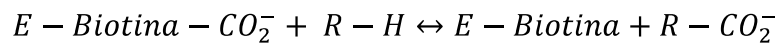
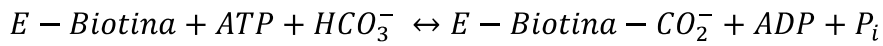
la Tabla 1 de este trabajo se presenta el cálculo de la ingesta específica recomendada para la población mexicana, misma que se encuentra en la 3ª columna.

<b>Edad</b>	<b>Ingesta sugerida de biotina (µg/día)</b>	<b>Ingesta de biotina por peso corporal (µg/kg p.c.)</b>	
0-6 meses	5	0.6	
7-12 meses	6	0.7	
1-3 años	8	0.7	
4-8 años	12	0.6	
9-13 años	20	0.6	
14-18 años	25	0.5	
19-más de 70 años	30	Hombres 0.5	Mujeres 0.6
Embarazo	30	0.6	
Lactancia	35	0.6	

Tabla 1. Ingesta diaria sugerida de biotina (Food and Nutrition Board, Estados Unidos, 1997-1998). Para los valores de peso corporal se tomaron en cuenta los valores indicados en la NOM-031-SSA2-1999, el peso promedio para mujeres mexicanas se considera de 52.9 kg y para hombres mexicanos de 60.6 kg.

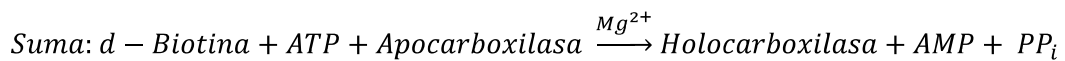
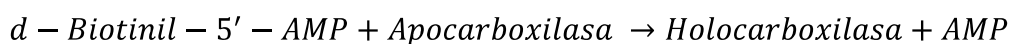
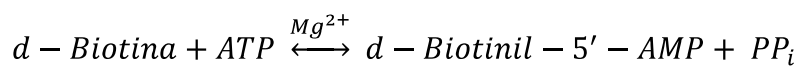
## 1.2. Carboxilasas: enzimas dependientes de biotina

La función clásica de la biotina, es participar como grupo prostético de las carboxilasas. Las carboxilasas son un grupo específico de enzimas que efectúan diferentes reacciones del metabolismo intermedio de hidratos de carbono, ácidos grasos y proteínas. Estas son activas solamente cuando en el sitio activo tienen unida covalentemente a la vitamina biotina. Las carboxilasas comparten el mismo mecanismo y se lleva a cabo por dos reacciones parciales (Samols et al., 1988).



Las carboxilasas comparten tres dominios, una subunidad donde se carboxila la biotina (primera reacción), una subunidad carboxitransferasa (segunda reacción) y una subunidad acarreadora de biotina. En esta última, la biotina se une covalentemente por un enlace amida entre el grupo carboxilo del ácido valérico que se encuentra en la vitamina y el amino  $\epsilon$  de un residuo de lisina localizado en la secuencia de aminoácidos Alanina-Metionina-Lisina-Metionina, específica de esta subunidad (Johnson, 2002).

Para la homeostasis de las carboxilasas, se ha propuesto un mecanismo denominado "ciclo de la biotina". La biotina que proviene de la dieta entra a la célula con ayuda del transporte multivitamínico dependiente de sodio (SMVT); una vez dentro de la célula, la biotina se une a las apocarboxilasas (enzimas inactivas) por la acción de la holocarboxilasa sintetasa:



Las holocarboxilasas (enzimas activas), ejercen sus diferentes funciones y al cumplir su vida útil, son degradadas y se liberan péptidos biotinilados, así como biocitina que por acción de la biotinidasa son hidrolizados para liberar la biotina y continuar el ciclo (Wolf, 1995).

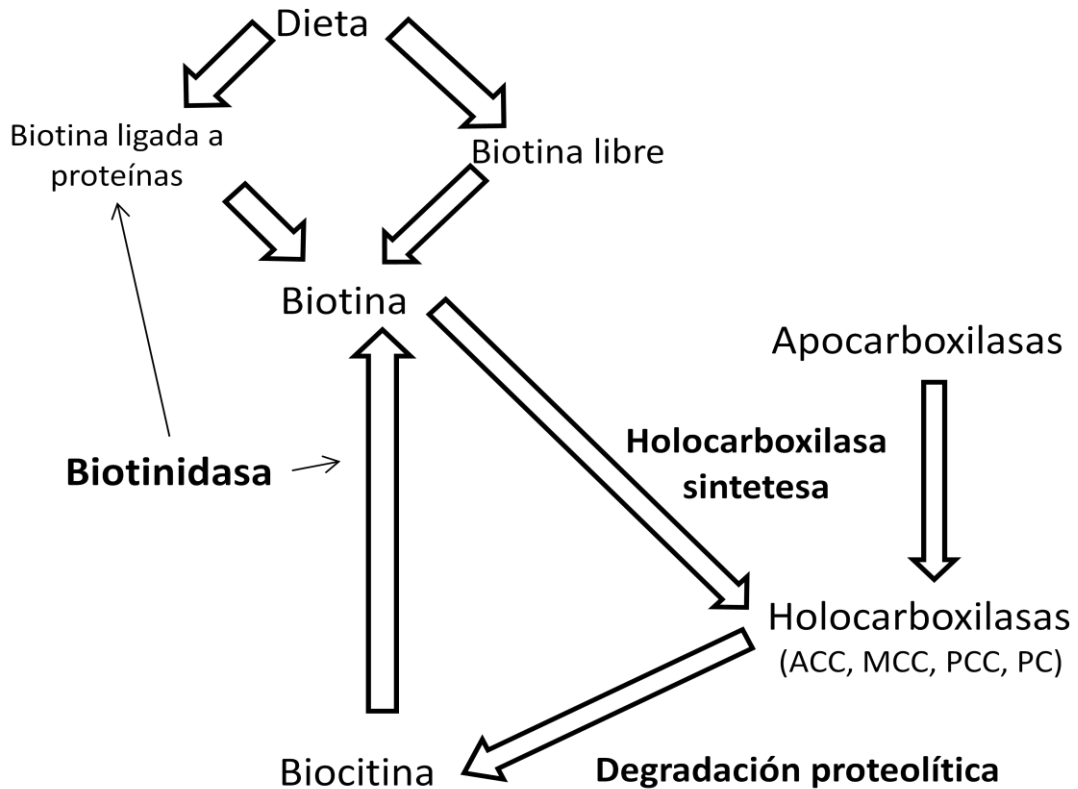


Figura 3. Ciclo de la biotina

En los mamíferos se conocen 5 diferentes enzimas dependientes de biotina ubicando a 3 de ellas en la mitocondria y las otras 2 en el citoplasma.

### 1.2.1. Acetil CoA carboxilasa

La acetil CoA carboxilasa (ACC) es un enzima que cataliza la carboxilación de la acetil CoA para dar como producto malonil CoA. Existen dos isoformas de esta enzima denominadas ACC1 y ACC2.

La isoforma ACC1 tiene un peso molecular de 265 kDa, se expresa mayoritariamente en tejidos lipogénicos como hígado, tejido adiposo y glándulas mamarias y se encuentra en el citosol (Bianchi et al., 1990). El malonil CoA que produce está destinado a la síntesis de ácidos grasos

donando unidades  $C_2$  para la elongación de los mismos (Abu-Elheiga et al., 1997).

La ACC2 tiene un peso molecular de 280 kDa, se encuentra principalmente en músculo esquelético y corazón en donde se localiza asociada a la membrana externa de las mitocondrias (Abu-Elheiga et al., 2000). Aunque esta enzima produce también malonil CoA, esta sustancia se asocia a la carnitina palmitoil transferasa I (CPT I), enzima encargada de inhibir el transporte de los ácidos grasos del citosol al interior de la mitocondria, donde se lleva a cabo la  $\beta$ -oxidación de los mismos. En este caso, el malonil CoA unido a la CPT I inhibe su actividad, por lo que no hay regulación de la  $\beta$ -oxidación (Power y Newsholme, 1997).

La diferencia entre el peso molecular de estas enzimas se debe a que la isoforma ACC2 tiene un péptido N-terminal de aproximadamente 114 aminoácidos, de los cuales 20 son de carácter hidrofóbico y se considera que le permiten colocarse en la membrana externa mitocondrial (Abu-Elheiga et al., 1997).

### **1.2.2. $\beta$ -Metilcrotonil CoA carboxilasa**

La  $\beta$ -metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC) se encuentra en la matriz mitocondrial y cataliza la reacción de carboxilación de la 3-metilcrotonil CoA para formar 3-metilglutaconil CoA, acción que consiste en un paso intermedio del catabolismo de la leucina (Baumgartner et al., 2001). Por medio de este proceso, los 6 átomos de carbono de la leucina pueden convertirse en acetil

CoA. La MCC está compuesta por dos subunidades con diferente masa molecular: la subunidad MCC-A es de 80 kDa y es la única que contiene a la biotina; mientras que la subunidad MCC-B es de 65 kDa (McKean et al., 2000).

### **1.2.3. Propionil CoA carboxilasa**

La propionil CoA carboxilasa (PCC) actúa en la propionil CoA para formar metilmalonil CoA, sustancia que interviene en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos de cadena impar, así como en el catabolismo de isoleucina, valina, treonina y metionina (Browner et al., 1989). Además participa en la anaplerosis del ciclo de Krebs a través de la producción de metilmalonil CoA. Esta última es transformada en succinil CoA por la acción de la metilmalonil CoA mutasa, cuyo producto posteriormente participa en este ciclo (Davis, 1980; Koolman, 2005).

Es una proteína heteropolimérica de una masa molecular de 560 kDa de la que se han descubierto dos subunidades denominadas  $\alpha$  y  $\beta$  y que se piensa que están en proporciones iguales (Browner et al., 1989).

### **1.2.4. Piruvato carboxilasa**

La piruvato carboxilasa (PC) es la enzima encargada de catalizar la reacción de piruvato a oxaloacetato, compuesto que por una parte es el sustrato para la primera reacción de la gluconeogénesis y por la otra, se utiliza para la anaplerosis del ciclo de Krebs (Utter y Keech, 1963, Jitrapakdee et al., 2005).

Se conocen dos formas de la PC, la  $\alpha_4$  y la  $\alpha_4\beta_4$ . La forma  $\alpha_4$  tiene cuatro subunidades idénticas, tiene un peso molecular entre 120 y 130 kDa y esta forma se encuentra particularmente en eubacterias, hongos, invertebrados y vertebrados. La forma  $\alpha_4\beta_4$  está compuesta por cadenas polipeptídicas de aproximadamente 55 kDa ( $\alpha$ ) y 70 kDa ( $\beta$ ), la segunda es la que contiene biotina; esta forma sólo se encuentra en arqueobacterias (Jitrapakdee et al., 2008).

#### **1.2.5. Deficiencia múltiple de carboxilasas y deficiencia aislada de carboxilasas en humanos**

Se han descrito errores congénitos que presentan bajas actividades de todas las carboxilasas así como de una sola.

La deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC) es una enfermedad que se caracteriza por presentar errores en el metabolismo de todas las enzimas biotiniladas y que se puede presentar en las formas neonatal y juvenil. Clínicamente estos dos errores congénitos se expresan como fracaso metabólico con cetoacidosis severa, acompañada de hiperamonemia, acidosis láctica y en algunas ocasiones hipoglucemia (Hernández-Rodríguez, 2001). La DMC temprana o neonatal es una enfermedad autosómica recesiva debida a la disfunción de la holocarboxilasa sintetasa y la DMC tardía o juvenil se produce por una alteración genética que involucra la síntesis de biotinidasa inactiva por lo que se bloquea la disponibilidad de biotina libre para la síntesis de las holocarboxilasas además de la consecuente disminución de los niveles séricos y úricos de biotina (Ortega-Anta y Requejo-Marcos, 2003).

La deficiencia de ACC, así como la baja actividad de la misma, se estudió por Bloom y colaboradores en 1981 en una niña recién nacida con miopatía hipotónica y daño neuronal, siendo el único caso registrado que se puede mencionar en este trabajo (Wolf y Feldman, 1982).

La deficiencia de MCC o 3-metilcrotonil glicinuria, se presenta en recién nacidos y en infancia temprana. Los síntomas más comunes en recién nacidos son convulsiones, dificultad para comer, retraso en el desarrollo e hipotonía. Cuando se alimenta a un paciente con una dieta rica en proteínas, desarrolla manifestaciones neurológicas, junto con hipoglucemia, cetoacidosis, hiperamonemia y una concentración muy baja de carnitina en el plasma. Las manifestaciones en pacientes de infancia temprana incluyen hipotonía muscular, convulsiones, retardo psicomotor, derrame cerebral, signos de leucodistrofia y cardiomiopatía dilatada. Para diagnosticarla, se realiza un perfil urinario de ácidos orgánicos, donde se detectan altas concentraciones de ácido 3-hidroxi-isovalérico y 3-metilcrotonil glicina (Fernandes et al., 2006).

La acidemia propiónica (enfermedad causada por la deficiencia de PCC) puede manifestarse en los primeros días de vida provocando dificultad para alimentarse, vómito, hipotonía, letargo, deshidratación y signos de cetoacidosis grave que pueden inducir al coma y posteriormente la muerte. En infantes de más edad, se presenta retraso mental moderado o grave y alteraciones neurológicas. El diagnóstico para esta enfermedad se basa en la identificación de altas concentraciones de propionato y metilcitrato en el plasma y la orina, además de encontrar ácido 3-hidroxi-propiónico, propionilglicina y otros metabolitos de la isoleucina en la orina. Para obtener un diagnóstico definitivo

se debe medir la actividad de la PCC en leucocitos y cultivos de fibroblastos (Behrman et al., 2004).

La deficiencia de PC provoca diferentes manifestaciones clínicas que varían desde la acidosis láctica neonatal grave acompañada de hiperamonemia, citrulinemia e hiperlisinemia (tipo B) hasta la acidosis láctica moderada o leve de inicio tardío con retraso en el desarrollo (tipo A). En ambos tipos, los pacientes que sobreviven suelen tener un retraso psicomotor grave con crisis epilépticas, espasmos y microcefalia. El déficit de PC, se ha determinado midiendo la actividad de la enzima en hígado o en cultivos de fibroblastos cutáneos (Behrman et al., 2004).

### **1.3. Deficiencia de Biotina y efectos en el crecimiento corporal**

La deficiencia nutricional de biotina se produce principalmente por la ingesta de clara de huevo cruda durante periodos prolongados (Insel et al., 2010), aunque también se ha identificado en individuos que reciben dietas parenterales totales que son deficientes de biotina (Delgado-López y Díaz, 2005). La clara de huevo contiene una glicoproteína llamada avidina con cuatro subunidades idénticas cada una de las cuales se unen a una molécula de biotina. El complejo que se produce entre la avidina y las 4 biotinas no puede ser degradado por acción enzimática del tracto digestivo. La avidina es sensible al calor, por lo que al aplicar un tratamiento térmico se desnaturaliza la proteína y se puede liberar la biotina (Hernández-Rodríguez y Sastre-Gallego, 1999). Los síntomas que produce la deficiencia de esta vitamina son dermatitis, dolores musculares, trastornos neurológicos (como la depresión), náusea, insomnio y alteraciones



en el sistema inmune (Báez-Saldaña et al., 1998, Melo-Ruiz y Cuamatzi, 2001). El indicador bioquímico que define mejor la deficiencia nutricional de biotina es la actividad específica de carboxilasas. En el hígado de ratones, la actividad de PCC y PC se ve disminuida en 80% después de 4 semanas de recibir una dieta agotante de biotina (Báez-Saldaña et al., 1998). Cabe mencionar que los Infantes que nacen con deficiencia múltiple de carboxilasas, como su nombre lo indica, presentan bajas actividades de las enzimas aunque no se deben a la falta de suministro en la dieta sino a un mal sistema de su aprovechamiento.

Se ha demostrado que la deficiencia de biotina afecta el crecimiento en todos los modelos animales estudiados (Friedrich, 1988). Publicaciones del laboratorio han señalado que en ratones alimentados con dietas carentes de biotina, inicialmente se reduce la velocidad de crecimiento y en la etapa crónica hay además pérdida de masa corporal (Báez-Saldaña et al., 1998). Metabólicamente, el hígado es el tejido que presenta la mayor actividad de carboxilasas y además se encarga de suministrar glucosa y aminoácidos a órganos como el cerebro y los componentes del sistema inmune cuando hay condiciones de ayuno o de deficiencias energéticas. Está descrito que esta función la ejerce a costa del músculo esquelético, ya que este tejido es el principal almacén de proteínas en un individuo (Stryer, 1995). Así, se puede entender que los ratones deficientes de biotina pierden peso, principalmente a costa de la masa muscular. Por otra parte, se ha estudiado que el sistema que controla el crecimiento general del organismo y que comprende a la hormona de crecimiento (GH) y al factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-I) (LeRoith, 2001), está desacoplado en condiciones de deficiencia de biotina. Los ratones alimentados con una dieta con avidina y carente de esta vitamina

tienen menor concentración sérica de IGF-I sin alterar las de la GH (Báez-Saldaña et. al., 2009a). No obstante, cuando a estos ratones se les administra sistémicamente IGF-I, no se observa la recuperación de la masa corporal sugiriendo una alteración autocrina / paracrina específica del IGF-I en este tejido, o alteraciones en el metabolismo de las carboxilasas, o una combinación de ambas (Antonio, 2011).

#### **1.4. Músculo esquelético**

La musculatura esquelética proporciona el movimiento del esqueleto articulado además de que permite el mantenimiento de la postura. La propiedad básica del músculo esquelético es la contractilidad del sarcoplasma (citoplasma de la célula muscular), mismo que permite el acortamiento de cada músculo produciendo movimiento de una articulación, la cual se conoce como contracción isotónica; también puede ocurrir la contracción isométrica que es cuando no ocurre movimiento y el músculo no se acorta, manteniendo una tensión (Salter, 2000; Thibodeau y Patton, 2008).

El tamaño, la forma y la estructura macroscópica de los músculos esqueléticos varía de acuerdo a su función particular y necesidad mecánica, pero la estructura celular básica es la célula muscular, también llamada fibra muscular por su forma alargada, delgada y filiforme. Estos músculos se consideran por una parte voluntarios, porque están bajo control de la voluntad y por la otra, estriados por su aspecto microscópico característico de rayas. Los componentes del tejido conectivo del músculo esquelético sirven de medio a través del cual discurren la inervación y vascularización de las fibras

musculares; además, representan un marco no contráctil a través del cual la contracción de las fibras nerviosas se transmite al hueso (Córdova, 2003).

El músculo esquelético es el tejido donde principalmente se utilizan los triglicéridos y la glucosa y para la obtención de energía. A través de la actividad de la lipoproteína lipasa y del transportador GLUT-4, el músculo moviliza los excesos de energía desde la sangre hasta el interior de sus células (Baynes y Dominiczak, 2005).

En el músculo en reposo, la energía necesaria para su mantenimiento se obtiene de los ácidos grasos que se oxidan y degradan a acetil CoA, misma que entra en el ciclo de Krebs para ser oxidada hasta CO<sub>2</sub>. Los músculos moderadamente activos utilizan primeramente ácidos grasos y después glucosa, la cual se fosforila y a través de la glucólisis se degrada hasta piruvato y éste a su vez se convierte en acetil CoA que entra al ciclo del ácido cítrico. Durante la actividad intensa, los músculos utilizan principalmente a la glucosa. Como la demanda de ATP es excesiva, el flujo sanguíneo no puede suministrar el oxígeno y los combustibles lo bastante rápido para producir ATP por la vía aerobia. En estas circunstancias, el glucógeno almacenado en el músculo se degrada a lactato por la vía anaerobia proporcionando 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa degradada. En la recuperación del músculo, después del trabajo activo, parte del lactato formado se transporta al hígado que lo convierte en glucosa, la que se libera en el torrente sanguíneo y vuelve al músculo para compensar las reservas de glucógeno. Esta ruta glucosa→lactato→glucosa se le conoce como ciclo de Cori (Lehninger, 1995). También en la musculatura esquelética es donde ocurre principalmente la

degradación de los aminoácidos de cadena ramificada, esto sucede especialmente en estado de inanición o durante largos periodos de ejercicio. Debido a que el músculo carece de las enzimas que participan en el ciclo de la urea, aquí intervienen diferentes reacciones para eliminar los grupos amino por medio de la síntesis de alanina y glutamina, que son liberados en la sangre. Estos compuestos transportan el nitrógeno hacia el hígado, donde se lleva a cabo el ciclo de la urea para posteriormente eliminarla a través de la orina (Koolman, 2005; Berg et al., 2008).

### **1.5. Carboxilasas en músculo esquelético**

Se ha demostrado que la actividad de la ACC en el músculo esquelético, se ve disminuida por la contracción muscular y esta va disminuyendo de acuerdo al grado de intensidad del ejercicio (Rasmussen y Winder, 1997). Esta reducción en la actividad se debe a una fosforilación de la ACC, que tiene prioridad y es independiente de la activación de esta enzima por parte del citrato (Vavvas et al., 1997; Dean et al., 2000). Estos estudios se han realizado en ratas (Rasmussen y Winder, 1997; Vavvas et al., 1997) y en humanos (Dean et al., 2000).

La actividad de PCC y PC también se ha estudiado en el músculo esquelético de rata, observando que la expresión de estas carboxilasas disminuye después de un periodo de 8 semanas con una alimentación carente de biotina, lo que indica que la deficiencia de esta vitamina reduce la síntesis de estas dos enzimas y en consecuencia su actividad (Rodríguez-Melendez et al., 2001).

## **2. Justificación**

Se ha demostrado que la deficiencia de biotina afecta el crecimiento corporal y que produce una disminución significativa en las actividades de las carboxilasas hepáticas. Debido a que la pérdida de peso es principalmente a costa del músculo esquelético, en este trabajo se propone estudiar el comportamiento de la actividad específica de las carboxilasas presentes en este tejido, durante el periodo inicial en el que ratones de experimentación son alimentados con dietas que contienen diferente aporte de biotina.

## **3. Hipótesis**

La actividad específica de las carboxilasas en el músculo esquelético es directamente proporcional a la cantidad de biotina que se ingiere en la dieta.

## 4. Objetivos

### Objetivo general

Realizar una curva temporal de la actividad específica de las enzimas ACC, MCC, PCC y PC en el músculo esquelético de ratones alimentados con dietas que aportan diferentes cantidades de biotina.

### Objetivos particulares

En este trabajo se analizaron a los 0, 1, 4 7 y 14 días de experimentación los siguientes parámetros:

- Crecimiento corporal de los ratones
- Consumo de agua y alimento
- Actividad específica de las carboxilasas del músculo *vastus lateralis*
- Cantidad de proteínas presentes en el músculo *vastus lateralis*

## **5. Materiales y métodos**

### **Modelo animal**

Se utilizaron 39 ratones macho de la cepa Balb/cAnN con tres semanas de edad obtenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los ratones se mantuvieron en ciclos de 12 horas de luz-oscuridad y barreras microbiológicas; se ofreció agua y alimento *ad libitum*. Todos los animales tuvieron un manejo de acuerdo a los lineamientos del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del IIB ([www.biomedicas.unam.mx](http://www.biomedicas.unam.mx)).

Al momento de la recepción, los ratones se pesaron y se dividieron en tres grupos de 12 ratones, de manera tal que el promedio y la dispersión del peso corporal fuera equivalente entre ellos, la experimentación se llevo a cabo por 2 semanas y se sacrificaron 3 ratones de cada grupo en los días 1, 4, 7 y 14. Para determinar los parámetros iniciales del lote, se sacrificaron tres ratones al momento de su recepción (tiempo 0). A cada grupo se le suministró una de tres dietas en pellets con diferente aporte de biotina y conteniendo 30% de sólidos de clara de huevo desecada como única fuente de proteína. La dieta deficiente (TD. 06682) no tiene biotina, la suficiente (TD. 06681) contiene 0.004 g de biotina y la suplementada (TD. 96075) contiene 0.1 g de biotina.

### **Consumo de alimento y agua**

El registro del consumo de alimento y agua se realizó 3 veces por semana. Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

$$C_d = \frac{(A_i - A_f)}{n/d} \quad C_e = \frac{C_d}{P}$$

Donde  $C_d$  es el consumo por ratón por día,  $A_i$  es alimento o agua ofrecida (a),  $A_f$  es alimento o agua restante,  $n$  es el número de ratones por grupo,  $d$  son los días transcurridos y  $P$  es el peso promedio de los ratones en el grupo.

### Sangrado, sacrificio y disección de tejidos

El día del experimento, cada ratón se anestesió profundamente con éter etílico y rápidamente se pesó y se sangró a blanco por el plexo axilar. Después de colectar la sangre, el ratón se sacrificó por dislocación cervical y enseguida se extrajeron los músculos *vastus lateralis* localizados en cada pierna (figura 4). Los tejidos extraídos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

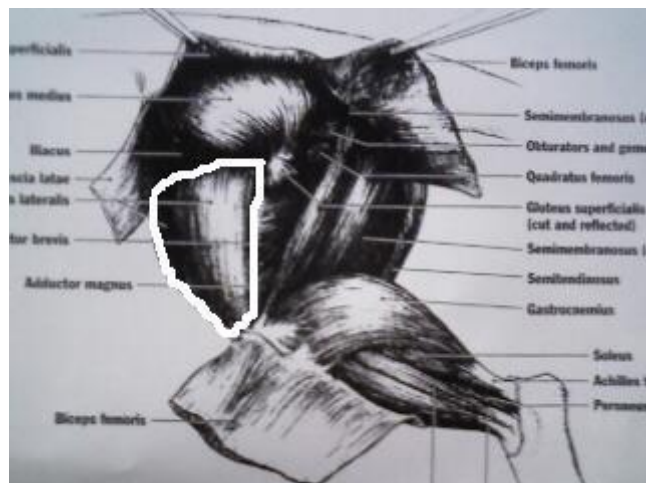


Figura 4. Localización del músculo *vastus lateralis* (Walker y Homberger, 1997)



## Homogeneización del músculo

- Solución para homogeneizar el músculo: sacarosa 290 mM, tricina 11.57 mM, EDTA sal disódica 0.058 mM y citrato de sodio 5.78 mM a pH 7.5.
- Solución de lisis: tricina 50 mM y EDTA sal disódica 0.025 mM a pH 8.0

Todo el procedimiento se hizo en baño de hielo. Con un homogeneizador PRO 200, la muestra se homogeneizó por 4 ciclos de 30 segundos intercalando 1 minuto de reposo entre cada ciclo. El homogeneizado se diluyó 1:6 con solución de lisis y las células se rompieron con un equipo Ultrasonic Processor GE130PB por 3 series de 30 pulsos intercalando 1 minuto de reposo entre cada serie. Las partículas insolubles se sedimentaron por centrifugación en una centrífuga Eppendorf 5415 R a 12000 rpm por 1 minuto y se recuperó el sobrenadante.

## Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford

**Fundamento:** Los residuos aromáticos y de arginina de las proteínas interaccionan con el colorante Azul de Coomasie originando un color azul intenso cuya absorbancia se lee a una longitud de onda de 595 nm y que es proporcional a la cantidad de proteínas en el medio (Bradford, 1976).

## Reactivos

- Solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) 0.1mg/mL
- Reactivo de Bradford Bio-Rad 43622A

**Curva patrón:** En una microplaca de 96 pozos se depositaron por triplicado 10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{L}$  de una solución de albúmina con 0.1 mg/mL, el volumen final de los estándares se ajustó a 160  $\mu\text{L}$  y se agregaron 40  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford a cada pozo.

**Procedimiento:** Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra de músculo se depositaron en una microplaca de 96 pozos y se añadió agua mQ hasta completar 160  $\mu\text{L}$ . A cada pozo se le adicionaron 40  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford, la placa se incubó a T.A. por 10 min con agitación constante en un agitador de micro placas Boekel Scientific Microjive y se midió la absorbancia a 595 nm con un lector de microplacas Biotek EL808 dentro de los 30 min posteriores a la incubación.

### **Ensayo radioenzimático**

**Fundamento:** En los ensayos radioenzimáticos o radiométricos se mide la incorporación de radioactividad en los sustratos con un radioisótopo permitiendo el marcaje de los productos. La actividad enzimática se mide por medio de un contador de centelleo (Bergmeyer, 1974).

### **Reactivos**

- Solución de tricina 800 mM, acetato de magnesio 48 mM, acetato de potasio 400 mM, ATP 26.4 mM, glutatión reducido 20 mM a pH 8.0; para el caso de la ACC es la solución anterior con BSA 0.75 g/L.
- Ácido cítrico 80 mM

- Citrato sintasa 186 U/mL + ácido pirúvico 36 mM
- Acetil CoA 1.96 mM (ACC) y 7.2 mM (PC)
- $\beta$ -Metilcrotonil CoA 19.2 mM
- Propionil CoA 19.2 mM
- Bicarbonato de sodio radiactivo 80 mM (16 DPM/pmol)
- Ácido fórmico al 30 %
- Líquido de centelleo Optiphase HiSafe 3 (Cat. 1200-437)
- Las mezclas de reacción se prepararon de tal forma que las concentraciones finales de los reactivos fueron: tricina 200 mM, acetato de potasio 100 mM, acetato de magnesio 12 mM, glutatión reducido 5 mM, ATP 6.6 mM, bicarbonato radiactivo 20 mM, BSA 0.18 g/L (sólo para ACC), ácido cítrico 20 mM (sólo para ACC), ácido pirúvico 9 mM (sólo para PC), citrato sintasa 46.5 U/mL (sólo para PC), acetil CoA 0.49 mM (sólo para ACC), acetil CoA 1.8 mM (sólo para PC),  $\beta$ -metilcrotonil CoA 4.8 mM (sólo para MCC), propionil CoA 4.8 mM (sólo para PCC). En el caso de las mezclas para los blancos no se adicionan las coenzimas.

Las 4 determinaciones enzimáticas se realizaron por duplicado de acuerdo con el procedimiento descrito previamente (Báez-Saldaña et al., 2004) y que se inició combinando 10  $\mu$ L del sobrenadante con 10  $\mu$ L de la mezcla de reacción correspondiente. La mezcla preparada se incubó de acuerdo a la enzima que se desea determinar (ACC y blanco ACC+MCC: 3 min a 37 °C; MCC: 3 min a

30 °C; PCC, PC y blanco PCC+PC: 10 min a 30 °C). Para detener la reacción, los tubos se colocaron en baño de hielo y se les adicionaron 20 µL de ácido fórmico al 30%. Después de secar el producto de la reacción por 15 horas, los viales se contaron con 0.5 mL de agua mQ y 2.5 mL de líquido de centelleo en un equipo Beckman LS 6500.

Para calcular la actividad específica de las enzimas, se utilizó la siguiente fórmula:

$$Actividad\ específica = \frac{DPM_{neta} \left( \frac{1000}{act.\ bicarbonato} \right)}{min_{incub.} (\mu g\ de\ proteina)}$$

La actividad del bicarbonato para este experimento fue de 15.53 DPM/pmol.

### **Análisis estadístico**

Para la actividad específica de las carboxilasas (ACC, MCC, PCC y PC) y la concentración de proteínas se realizó un ANOVA de 2 vías utilizando el software Sigma Stat 3.10, considerando un valor de  $P < 0.05$ . Para la diferencia de medias de las proteínas se utilizó la prueba de Bonferroni y la prueba de Tukey para el peso corporal y las carboxilasas.

## 6. Resultados

### Los ratones deficientes de biotina ganaron menos peso corporal

Durante la experimentación se evaluó el crecimiento de los ratones. En el gráfico 1 se muestran los promedios del peso corporal  $\pm$  error estándar (E.E.) para cada grupo (n=3). Los ratones del grupo deficiente de biotina tuvieron una menor ganancia de peso corporal que los grupos suficiente y suplementado a partir del día 7 ( $P < 0.001$ ). No obstante a que sólo se estudiaron 3 ratones, aquí se confirma el efecto característico de la deficiencia de biotina en el arresto del crecimiento corporal desde la primera semana (Báez-Saldaña et al., 1998).

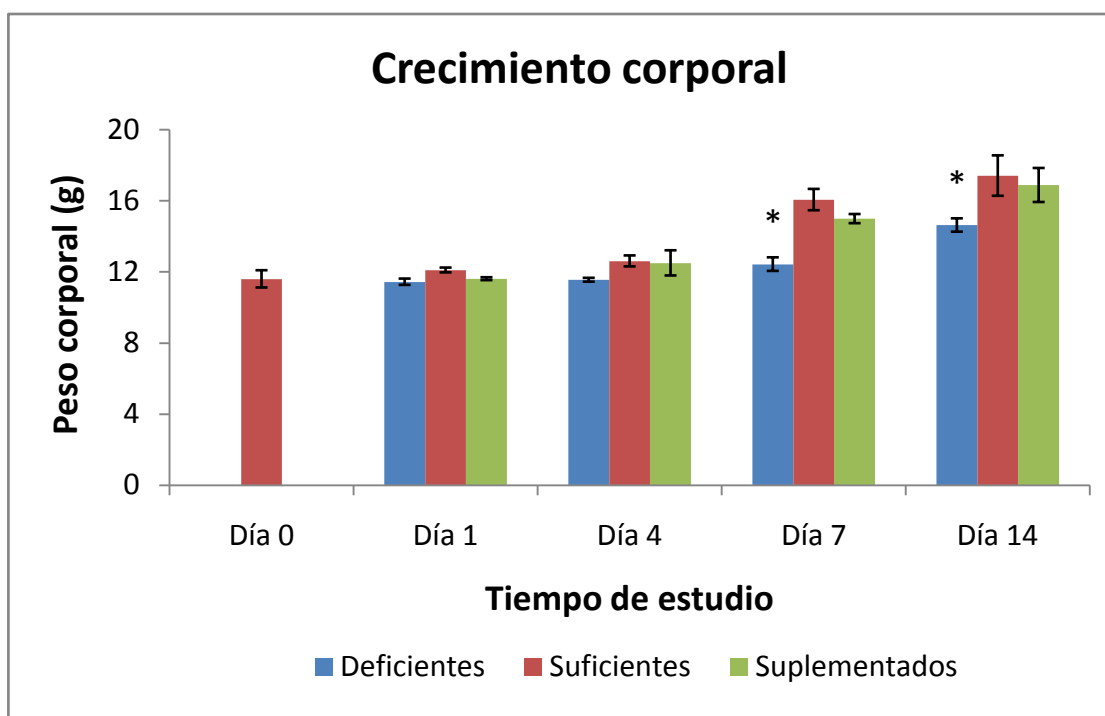


Gráfico 1. Peso corporal de los 3 grupos estudiados (Promedio  $\pm$  E.E.)  
\* $P < 0.001$  suficientes vs. deficientes

## El consumo de alimento y agua no se modifica por las diferentes dietas

Para determinar si existe una correlación entre la masa corporal y la ingesta de agua y alimento, se evaluaron estos parámetros durante el experimento. La cantidad de alimento y el consumo de agua por ratón por día se muestran en la tabla 2, donde se observa que no hubo diferencias significativas. En el gráfico 2 se presenta el consumo específico de alimento y en el gráfico 3 el consumo específico de agua, calculados de acuerdo a las fórmulas presentadas en la sección previa. Es conveniente señalar que debido al diseño experimental se cuenta solamente con un dato grupal para cada determinación. La tendencia que sigue el consumo de alimento es similar a la de un estudio anterior (Báez-Saldaña et al., 2009a). Cabe mencionar, que en este trabajo se reporta por primera vez el consumo de agua.

	Alimento	Agua
Deficientes	2.48 ± 0.51 g	3.88 ± 1.16 mL
Suficientes	2.86 ± 0.65 g	5.51 ± 0.78 mL
Suplementados	2.37 ± 0.34 g	6.37 ± 0.87 mL

Tabla 2. Consumo por ratón por día de alimento y agua (Promedio ± E.E.)

Con base en la determinación del consumo diario de alimento y tomando en cuenta el contenido de biotina libre en las dietas respectivas (Báez-Saldaña et al., 2009b), se calculó que cada ratón del grupo suficiente consumió  $0.005 \pm 0.001$  mg de biotina por día y el grupo suplementado  $0.247 \pm 0.034$  mg de biotina por día (1x vs. 50x, respectivamente).

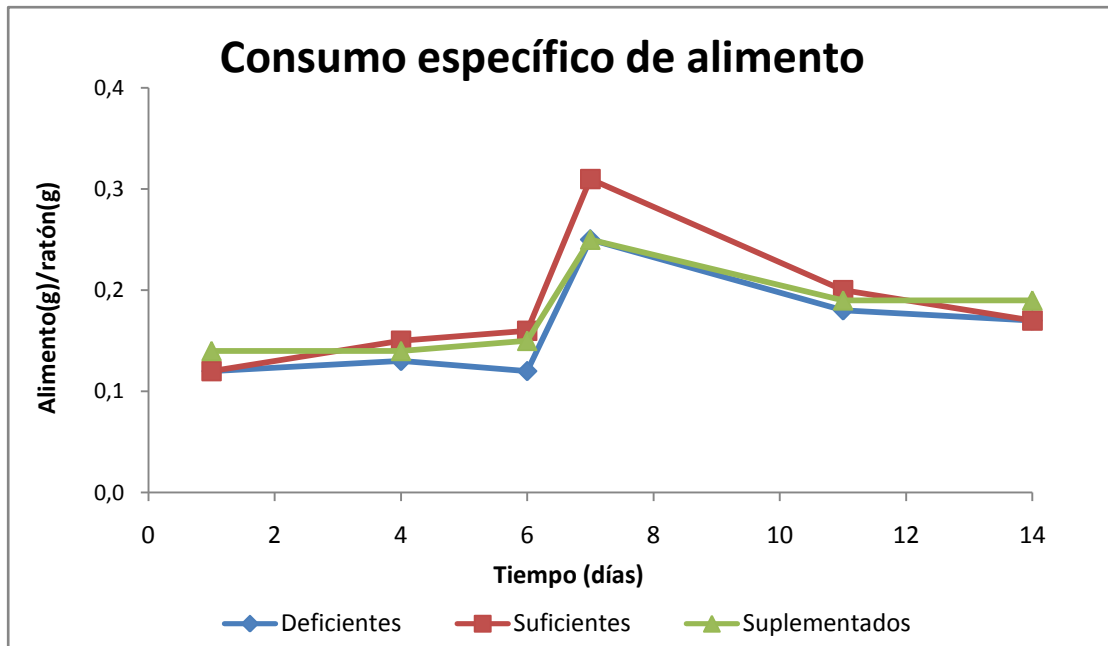


Gráfico 2. Cantidad de alimento consumido con referencia a la masa corporal de los ratones

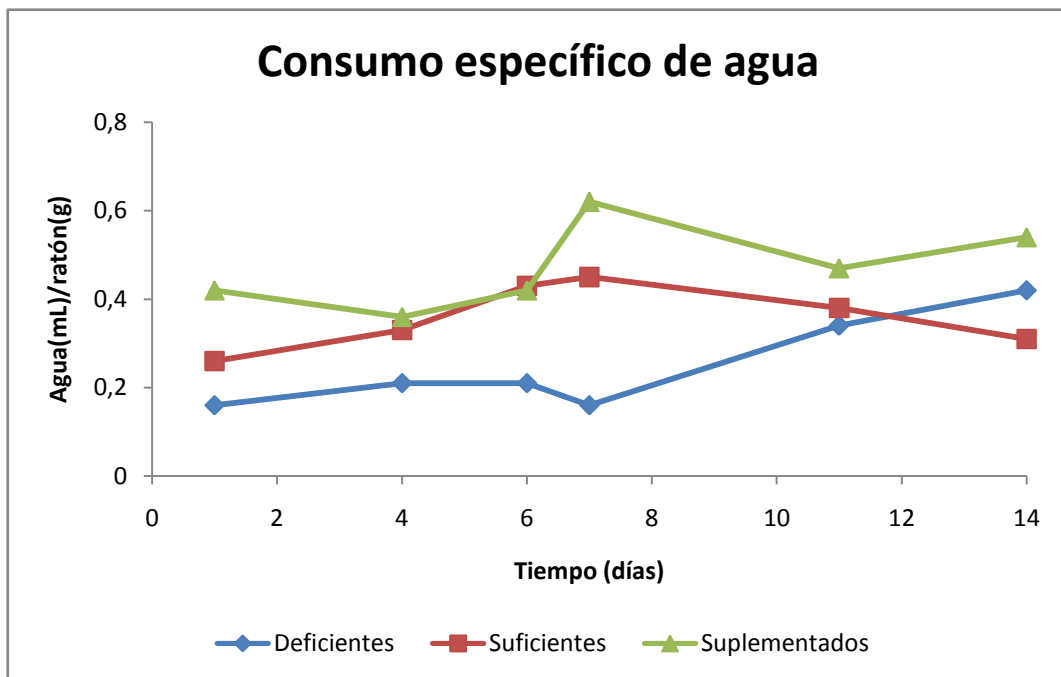


Gráfico 3. Volumen de agua consumida con respecto a la masa corporal de los ratones

## La concentración de proteínas totales en el músculo esquelético responde al contenido de biotina en la dieta

La cantidad de proteínas totales en el músculo se calculó para identificar si la cantidad de biotina afecta este parámetro. En el gráfico 4 se observa que a los 7 y 14 días de experimentación, hay una relacionada con el contenido de biotina en la dieta.

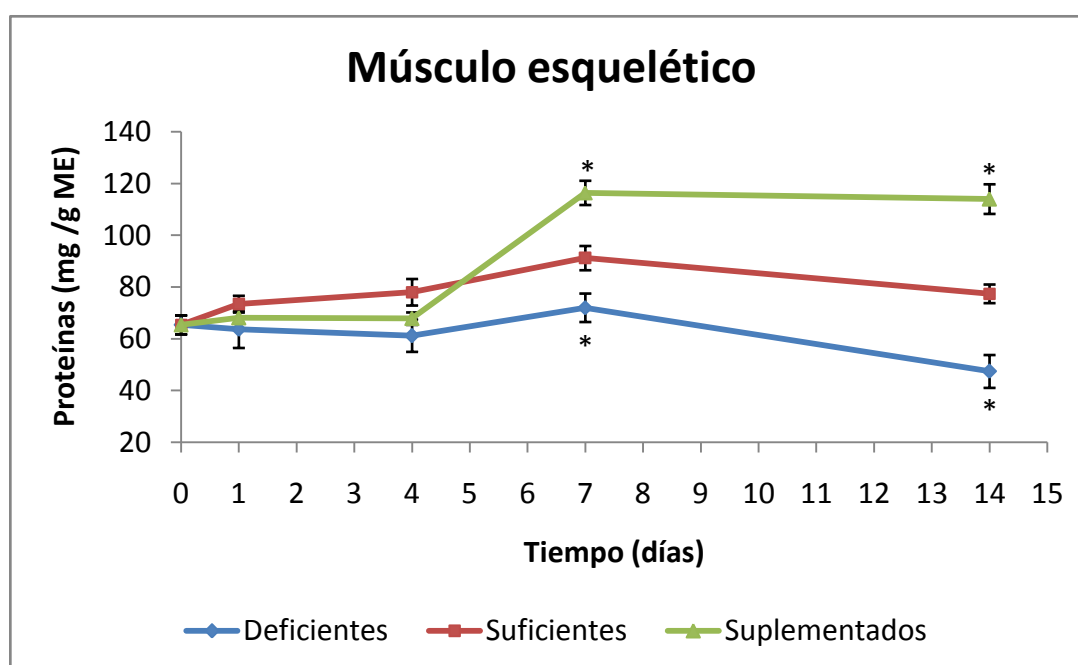


Gráfico 4. Concentración de proteínas en el músculo esquelético (Promedio ± E.E.). \*P<0.001 suficientes vs. deficientes y suplementados

## Solamente la actividad específica de PC se modificó por el aporte de biotina en la dieta

Se midieron las actividades específicas de las carboxilasas para estudiar si la cantidad de biotina ingerida, tiene un efecto sobre estas enzimas en el músculo esquelético.



El comportamiento de las actividades enzimáticas de ACC, MCC y PCC en el transcurso del experimento se pueden observar en los gráficos 5, 6 y 7, respectivamente. En este trabajo no se observaron diferencias para estas 3 enzimas, aunque en el día 7 sí se presentaron algunas tendencias en el grupo suficiente. Posiblemente sea necesario aumentar el número de determinaciones para establecer si pudieran ser significativas. En condiciones normales, la actividad específica de la ACC en el músculo esquelético de rata se encuentra entre 0.1 y 0.8 nmol  $^{14}\text{CO}_2$  fijados/min\*mg proteína (Rasmussen y Winder, 1997; Vavvas et al., 1997); así que los resultados aquí reportados para este tejido en los ratones del grupo suficiente se encuentran en este intervalo. Las actividades medidas para la MCC en los 3 grupos experimentales se encontraron entre 0.9 y 1.7 nmol  $^{14}\text{CO}_2$  fijados/min\*mg proteína y cabe mencionar que hasta donde se sabe, este es el primer estudio en el que se mide la actividad de esta enzima en el músculo esquelético. La actividad de la PCC fue desde 2.5 hasta 4.9 nmol  $^{14}\text{CO}_2$  fijados/min\*mg proteína; valores que están distantes de dos trabajos realizados en músculo esquelético de rata y que reportan actividades de 0.008 nmol  $^{14}\text{CO}_2$  fijados/min\*mg proteína (Rodríguez-Meléndez et al., 2001) y 15.3 nmol  $^{14}\text{CO}_2$  fijados/min\*mg proteína (Davis et al., 1980).

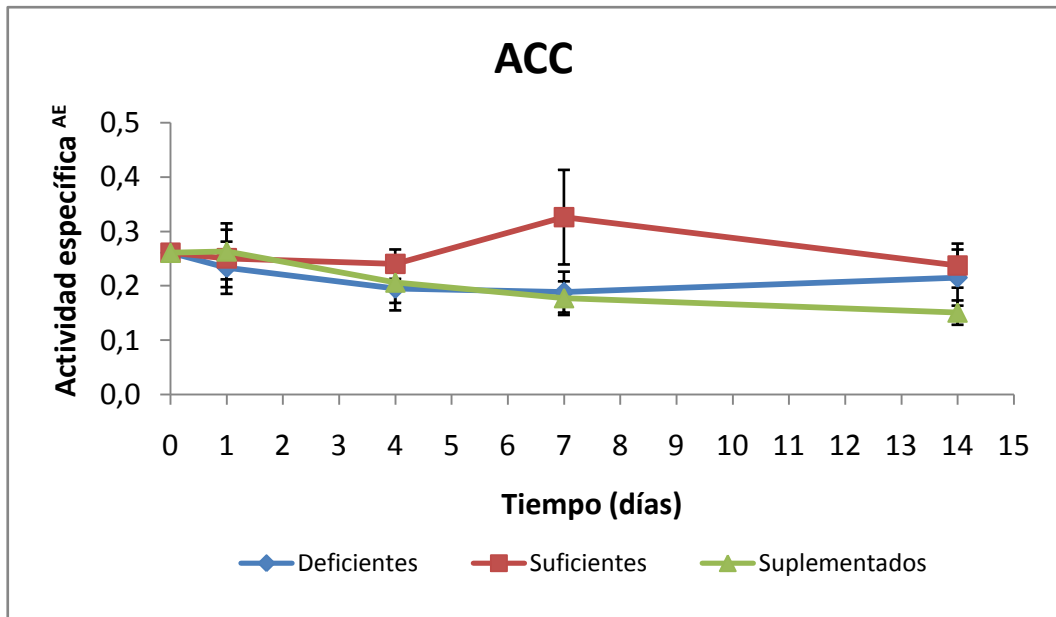


Gráfico 5. Curva temporal para la ACC <sup>AE</sup> Actividad específica expresada en nmol <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fijados / min\*mg proteína (Promedio ± E.E.)

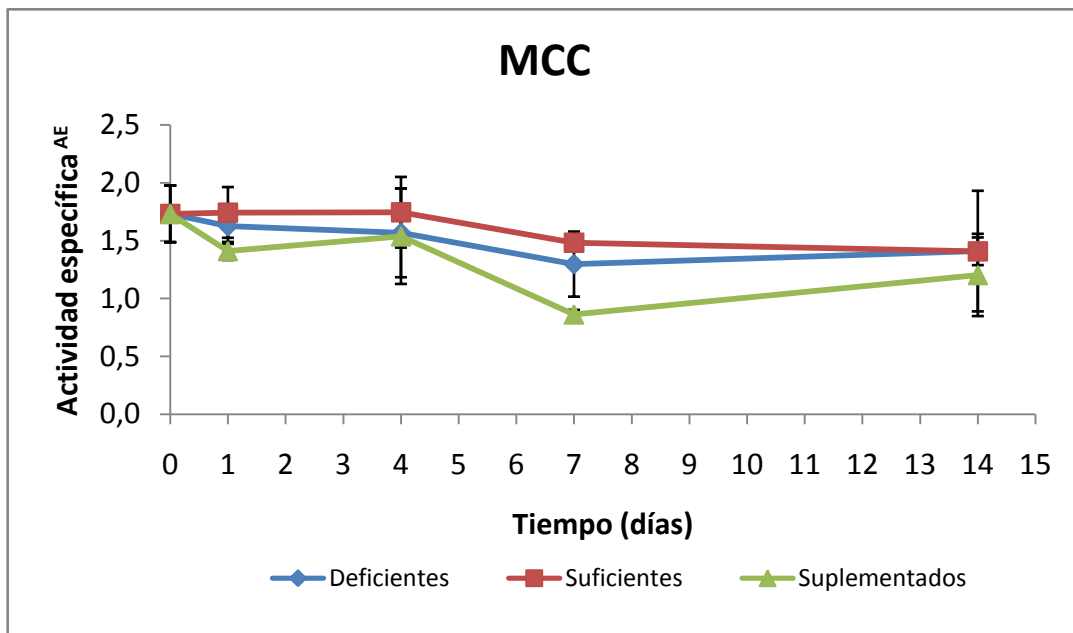


Gráfico 6. Curva temporal para la MCC <sup>AE</sup> Actividad específica expresada en nmol <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fijados / min\*mg proteína (Promedio ± E.E.)

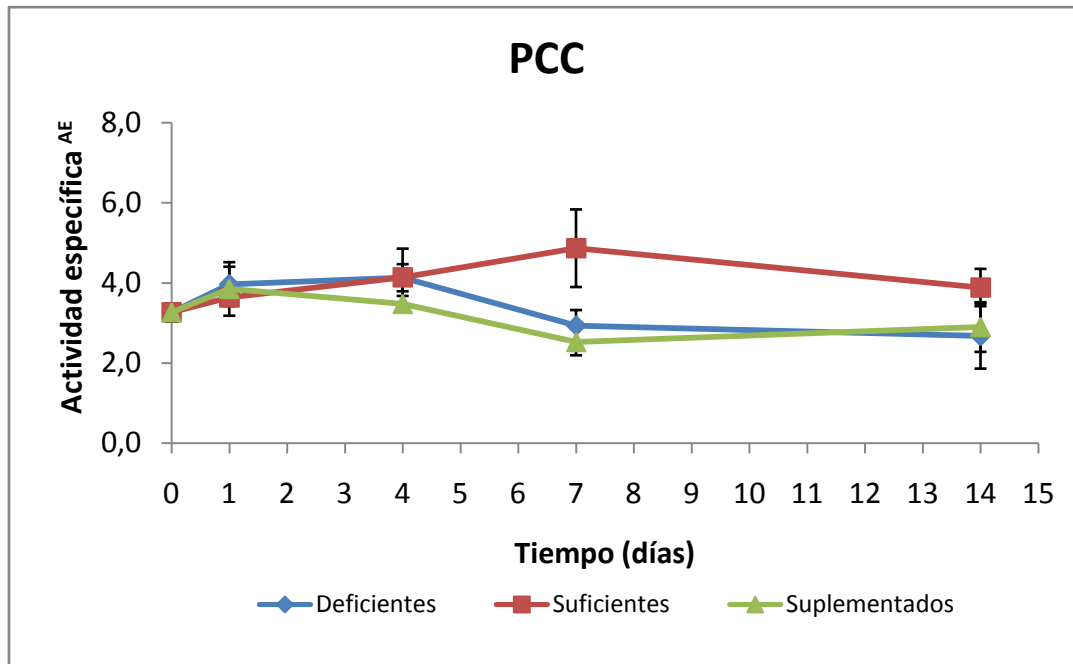


Gráfico 7. Curva temporal para la PCC <sup>AE</sup> Actividad específica expresada en nmol <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fijados / min\*mg proteína (Promedio  $\pm$  E.E.)

La curva temporal de la actividad específica de la PC se presenta en el gráfico 8. Después de 4 días de experimentación las actividades en los grupos deficiente y suplementado mostraron diferencias significativas, aunque para el grupo suplementado a los 14 días esta diferencia desapareció, mientras que para el grupo deficiente se exacerbó ( $P < 0.02$ ). El intervalo de la actividad específica para la PC en el músculo esquelético de ratón fue de 2.5 a 5.8 nmol <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fijados/min\*mg proteína valores que, al igual que para la ACC, también concuerdan con los reportados para este mismo tejido en la rata (Davis et al., 1980; Rodríguez-Meléndez et al., 2001).

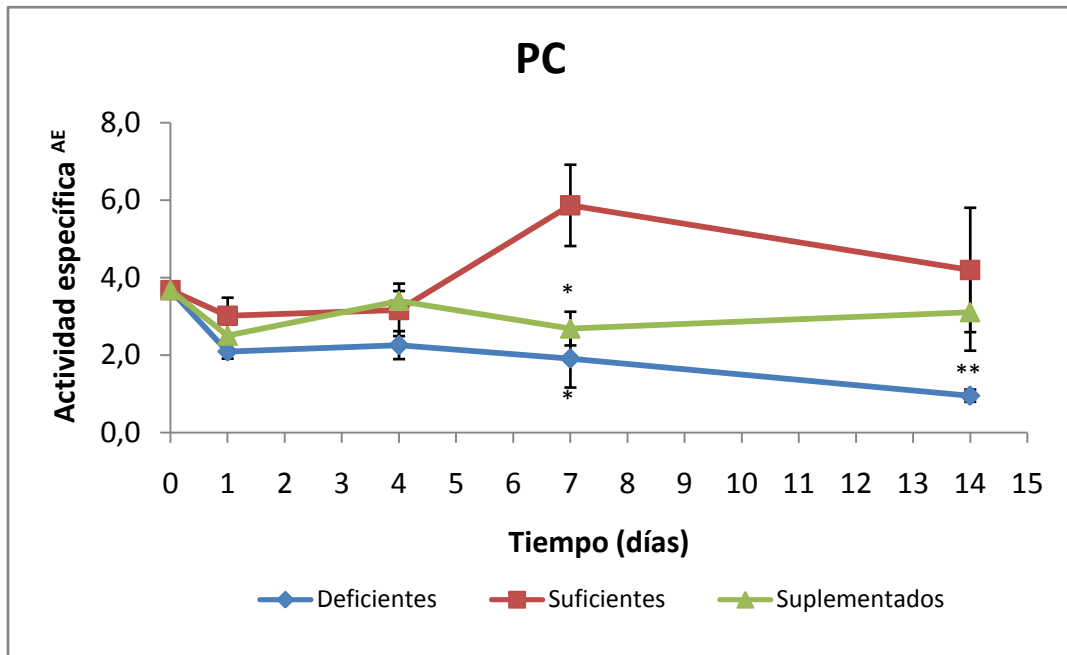


Gráfico 8. Curva temporal para la PC <sup>AE</sup> Actividad específica expresada en nmol <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fijados / min\*mg proteína (Promedio ± E.E.). \* *P*<0.02 suficientes vs. deficientes y suplementados; \*\* *P*<0.02 suficientes vs. deficientes

## 7. Discusión

En este trabajo de tesis se reporta por primera vez la actividad de todas las carboxilasas en el músculo esquelético de ratón cuando se alimentaron con dietas de distinto contenido de biotina, además de analizar si la ingesta de esta vitamina tiene un efecto en la cantidad de proteínas totales de este tejido. La actividad de PC y PCC en hígado de roedores alimentados con dietas de deficientes de biotina corresponde al 20% del control desde las 4 semanas de experimentación (Báez-Saldaña et al. 1998, 2009a y 2009b; Rodríguez-Meléndez et al., 2001); mientras que en condiciones de alimentación normal, la ACC es la carboxilasa más estudiada en el músculo esquelético. En este tejido se encuentran distribuidas un gran número de mitocondrias y en el interior de estos organelos se lleva a cabo la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, el catabolismo de aminoácidos y el ciclo de Krebs; tres vías metabólicas relacionadas directa o indirectamente con la función de las carboxilasas. Por otra parte, el músculo esquelético es uno de los principales tejidos relacionados con la homeostasis del crecimiento corporal, proceso que a su vez se ve afectado por la carencia de biotina en todos los modelos experimentales estudiados.

En un individuo, alrededor del 50% de su peso corporal corresponde al músculo esquelético, tejido que a su vez está compuesto mayoritariamente de proteínas (Salter, 2000). Aunque esta composición sugeriría que pudiera existir una relación entre el peso corporal y la cantidad de proteínas en el músculo esquelético, no es así en estas condiciones experimentales. La concordancia observada entre el contenido de proteínas en el músculo esquelético y la

ingesta de biotina, no se manifestó en la ganancia de peso por los ratones del grupo suplementado. No obstante, este interesante resultado permite proponer una acción específica de la biotina sobre la síntesis de proteínas en el músculo esquelético; misma que además es independiente de su función prostética puesto que no tiene relación con la actividad de las carboxilasas.

Diversos estudios han demostrado que la síntesis de proteínas en el músculo esquelético está regulada tanto por leucina como por insulina (Hong y Layman, 1984; Nair et al., 1992; Anthony et al., 2002; Norton y Layman, 2006). También se ha señalado que el músculo esquelético es el tejido donde ocurre mayoritariamente la degradación de la leucina (Oddesey y Goldberg, 1972; Hutson et al., 1978), por lo que resulta lógico estudiar a la MCC en este tejido; sin embargo, no se han encontrado trabajos que la hayan analizado. Dado que en las condiciones de este trabajo de tesis; la actividad de la MCC no está alterada, se abre la posibilidad de que el mecanismo pudiera ser a través de la insulina. Está descrito que en las células  $\beta$  del páncreas de rata normal, la biotina aumenta la secreción de insulina estimulada por glucosa. Adicionalmente, la deficiencia de biotina disminuye la secreción de insulina en las células de los islotes pancreáticos (Romero-Navarro et. al., 1999; Sone et al., 1999; Sone et al., 2000). Por otra parte, está descrito que el IGF-I estimula la proliferación celular en el músculo esquelético (Coolican et al., 1997) y debido a que el sistema endocrino GH/IGF-I es desajustado por la deficiencia de biotina (Báez-Saldaña et al., 2009a), se podría esperar este mismo efecto en este tejido por un mecanismo autocrino/paracrino. El hecho de que el grupo deficiente gane menor peso y disminuya el contenido de proteínas en el

músculo son resultados que indirectamente apuntan a esta dirección; aunque los estudios pertinentes todavía están en curso en el laboratorio.

La energía que requiere el músculo esquelético en reposo y/o en ayuno se obtiene principalmente de los ácidos grasos, siendo la ACC2 de este tejido la encargada de regular la  $\beta$ -oxidación de estos macronutrientes. Por métodos de biología molecular, se han identificado las dos isoformas ACC1 y ACC2 en el músculo esquelético, siendo esta última la que se encuentra en mayor proporción (Abu-Elheiga et al., 1997). En los experimentos realizados en donde se mide la actividad de esta enzima no se efectuó un fraccionamiento subcelular, de tal forma que se reporta la suma de la actividad de las dos enzimas (Rasmussen y Winder, 1997; Vavvas et al., 1997; Dean et al., 2000). Al no observar cambios en la ACC2, este escenario sugiere que el metabolismo de los ácidos grasos no está afectado durante las primeras 2 semanas de experimentación.

La importancia de la PCC en el músculo esquelético es indudable puesto que en este tejido existe una substancial degradación de aminoácidos ramificados, además de participar en la anaplerosis del ciclo de Krebs (Davis, 1980; Koolman, 2005). La estabilidad en la actividad de la PCC encontrada en este estudio indica que sus funciones sustanciales en el metabolismo intermedio de los miocitos no están involucradas con la síntesis de proteínas, resaltando nuevamente el efecto independiente de la biotina en este proceso.

La función de la PC en el músculo esquelético consiste en la anaplerosis del ciclo de Krebs (Davis et al., 1980; Jitrapakdee et al., 2005). La respuesta

temprana en la reducción de la actividad de esta enzima tanto por la completa ausencia de biotina en la dieta como en la ingesta de 50 veces más, revela un efecto inesperado e indica que el metabolismo energético se ve afectado rápidamente por la cantidad de la vitamina ingerida. Se sabe que la deficiencia de biotina produce una disminución en la actividad de esta enzima después de 8 semanas de experimentación, efecto atribuido a una regulación negativa en su síntesis por esta vitamina (Rodríguez-Melendez et al., 2001). Entonces, sería interesante determinar en las condiciones de este estudio si el mecanismo descrito se presenta desde la primer semana de alimentación tanto con dieta carente como con dieta suplementada de biotina. Es conveniente resaltar que este es el primer estudio que aborda los efectos de la ingesta de dosis farmacológicas de biotina en la actividad de la PC en el músculo esquelético y que los resultados obtenidos fortalecen por una parte, nuestra propuesta de una acción específica de la biotina y no relacionada con las carboxilasas sobre la síntesis de proteínas; y por la otra sugiere un efecto determinado sobre la PC hasta ahora no explorado.

La tendencia en la mayor actividad de las enzimas ACC, PCC y PC que se observó en el día 7 por los ratones del grupo suficiente, puede deberse a que en este día hubo un mayor consumo de alimento y como se explicó anteriormente estas enzimas intervienen en el metabolismo energético de diferentes maneras. En apoyo a esta relación, la MCC no presentó la misma tendencia ya que la vía metabólica en la que participa esta enzima no está involucrada directamente con el metabolismo energético.



Finalmente el análisis general del comportamiento de todas las carboxilasas en el grupo suplementado sugiere una predisposición a la disminución sus actividades, posiblemente a través de una regulación a la baja en la síntesis de estas enzimas; por lo que sería conveniente realizar los experimentos que permitan comprobar este efecto.

## 8. Conclusiones

- La alimentación con dieta deficiente de biotina provoca menor ganancia de peso corporal desde los 7 días de experimentación.
- La ingesta de dosis farmacológicas de biotina no tiene efectos en el peso corporal.
- El consumo de agua y alimento es independiente de la cantidad de biotina presente en la dieta.
- La deficiencia y la suplementación de biotina afectan la cantidad de proteínas en el músculo esquelético a partir de los 7 días de experimentación por un mecanismo independiente de las carboxilasas.
- La deficiencia y las dosis farmacológicas de biotina afectan negativamente la actividad específica de la PC desde los 7 de experimentación.
- La alimentación con dietas de distinto aporte de biotina no modifican la actividad específica de las enzimas ACC, MCC y PCC durante 14 días de experimentación.

## 9. Referencias

1. Abu-Elheiga L, Almarza-Ortega DB, Baldini A, Wakil SJ, Human acetyl-CoA carboxylase 2, 1997, *J Biol Chem*, 272:10669-10677.
2. Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ, The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2, 2000, *Proc Natl Acad Sci*, 97:1444-1449.
3. Anthony JC, Lang CH, Crozier SJ, Anthony TG, MacLean DA, Kimball SR, Jefferson LS, Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine, 2002, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282:E1092-E1101.
4. Antonio Velásquez O, *Interacción de la biotina con el sistema endocrino hormona de crecimiento/factor de crecimiento I similar a la insulina (GH/IGF-I)*, 2011, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM,
5. Báez-Saldaña A, Díaz G, Espinoza B, Ortega E, Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice, 1998, *Am J Clin Nutr*, 67:431-437.
6. Báez-Saldaña A, Zendejas-Ruiz I, Revilla-Monsalve C, Islas-Andrade S, Cárdenas A, Rojas-Ochoa A, Vilches A and Fernández-Mejía C. Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl CoA carboxylase, propionyl CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and in non-diabetic individuals, 2004, *Am J Clin Nutr*, 79: 238-43.
7. Báez-Saldaña A, Gutierrez-Ospina G, Chimal-Monroy J, Fernández-Mejía C, Saavedra R, Biotin deficiency in mice is associated with decreased serum availability of insulin-like growth factor-I, 2009a, *Eur J Nutr*, 48: 137 – 144.
8. Báez-Saldaña A, Camacho-Arroyo I, Espinosa-Aguirre JJ, Neri-Gómez T, Rojas-Ochoa A, Guerra-Araiza C, Larrieta E, Vital P, Díaz G, Chavira R, Fernández-Mejía C, Biotin deficiency and biotin excess: Effects on the female reproductive system, 2009b, *Steroids*, 74:863-869.
9. Baumgartner MR, Almashanu S, Sourmala T, Obie C, Cole RN, Packman S, Baumgartner ER, Valle D, The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency, 2001, *J Clin Invest*, 107:495-504.
10. Baynes J W, Dominiczak MH, *Bioquímica médica*, 2005, Madrid, Ed. Elsevier, 2ª Edición, pp. 265.
11. Berg JM, Strayer L, Tymoczko JL, *Bioquímica*, 2008, Barcelona, Ed. Reverte, 6ª Edición, pp. 767.

12. Bergmeyer HU, *Methods of enzymatic analysis*, 1974, Nueva York, Vol. 4, Ed. Academic Press, pp. 2066.
13. Bianchi A, Evans JL, Iverson AJ, Nordlund AC, Watts TD, Witters LA, Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxilasa, 1990, *J Biol Chem*, 265:1502-1509.
14. Biesalski HK, Grimm P, *Nutrición: texto y atlas*, 2007, Madrid, Ed. Médica Panamericana, pp. 186.
15. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, *Tratado de Pediatría*, 2004, Madrid, Ed. Elsevier, 17ª Edición, pp. 415, 416 y 479.
16. Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, 1976, *Anal Biochem*, 72:248:254.
17. Browner MF, Taroni F, Sztul E, Rosenberg LE, Sequence analysis, biogenesis and mitochondrial import of the  $\alpha$ -subunit of rat liver propionyl CoA carboxylase, 1989, *J Biol Chem*, 284:12680-12685.
18. Coolican SA, Samuel DS, Ewton DZ, McWade FJ, Florini JR, The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways, 1997, *J Biol Chem*, 272:6653-6662.
19. Córdova A, *Fisiología dinámica*, 2003, Madrid, Ed. Elsevier, pp. 77 y 78.
20. Davis EJ, Spydevold O, Bremer J, Pyruvate carboxylase and propionyl CoA carboxylase as anaplerotic enzymes in skeletal muscle mitochondria, 1980, *Eur J Biochem*, 110:255-262.
21. Dean D, Daugaard JR, Young ME, Saha A, Vavvas D, Asp S, Kiens B, Kim K, Witters L, Richter EA, Ruderman N, Exercise diminishes the activity of acetyl CoA carboxylase in human muscle, 2000, *Diabetes*, 49:1295-1300.
22. Delgado López NE, Díaz JA, *Fundamentos de nutrición parenteral*, 2005, Bogota, Ed. Médica Panamericana, pp. 82.
23. Fernandes J, Sudubray JM, van den Berghe G, Walter JH, *Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment*, 2006, Berlin, Ed. Springer, 4ª edición, pp. 256 y 257.
24. Friedrich W, Biotin en: *Vitamins*, 1988, Berlin: Walter de Gruyter, pp. 753-805
25. Garrido Pertierra A, Olmo R, Castel Aznar C, *Bioquímica metabólica*, 2001, Madrid, Ed. Tebar, pp. 223.
26. Hernández Rodríguez M, Sastre Gallego A, *Tratado de nutrición*, 1999, Madrid, Ed. Díaz de Santos, pp. 174 y 175.

27. Hernández Rodríguez M, *Alimentación infantil*, 2001, Madrid, Ed. Díaz de Santos, pp. 116.
28. Hong SC, Layman DK, Effects of leucine on in vitro protein synthesis and degradation in rat muscles, 1984, *J Nutr*, 114:1204-1212.
29. Hutson SM, Cree TC, Harper AE, Regulation of leucine and  $\alpha$ -ketoisocaproate metabolism in skeletal muscle, 1978, *J Biol Chem*, 253:8126-8133.
30. Insel P, Ross D, McMahon K, Bernstein M, *Nutrition*, 2010, Burlington, Ed. Jones & Bartlett Learning, 4ª Edición, pp. 443.
31. Jitrapakdee S, Vidal-Puig A, Wallace JC, Review: Anaplerotic roles of pyruvate carboxylase in mammalian tissues, 2005, *Cell Mol Life Sci*, 63:843-854.
32. Jitrapakdee S, St. Maurice M, Rayment I, Cleland WW, Wallace JC, Attwood PV, Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase, 2008, *Biochem J*, 413(3):369-387.
33. Johnson LC, *The synthesis of new biotin derivatives and their bioactivity*, 2002y, Tesis de maestría, B. S. Southern University.
34. Koolman J, *Bioquímica: texto y atlas*, 2005, Madrid, Ed. Médica Panamericana, 3ª Edición, pp. 338.
35. Le Roith D, Scavo L, Butler A, What is the role of circulating IGF-I?, 2001, *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, 12:48-52
36. Lehninger AL, *Principios de bioquímica*, 1995, Barcelona, Ed. Omega, 4ª Edición, pp. 741-743.
37. Levert KL, *The role of cysteine 230 and lysine 238 of biotin carboxylase in the deprotonation of biotin and synthesis of a bisubstrate analog inhibitor of carboxyltransferase*, 2002, Tesis de doctorado, Universidad del estado de Louisiana.
38. Macarulla JM, Goñi F., *Bioquímica humana*, 1994, Barcelona, Ed. Reverte, 2ª Edición, pp. 297-300.
39. McKean AL, Ke J, Song J, Che P, Achenbach S, Nikolau BJ, Wurtele ES, Molecular characterization of the non-biotin-containing subunit of 3-methylcrotonyl CoA carboxylase, 2000, *J Biol Chem*, 275:5582-5590.
40. Melo Ruíz V, Cuamatzi O, *Bioquímica de los procesos metabólicos*, 2007, México, Ed. Reverte, 2ª Edición, pp. 341 y 342.

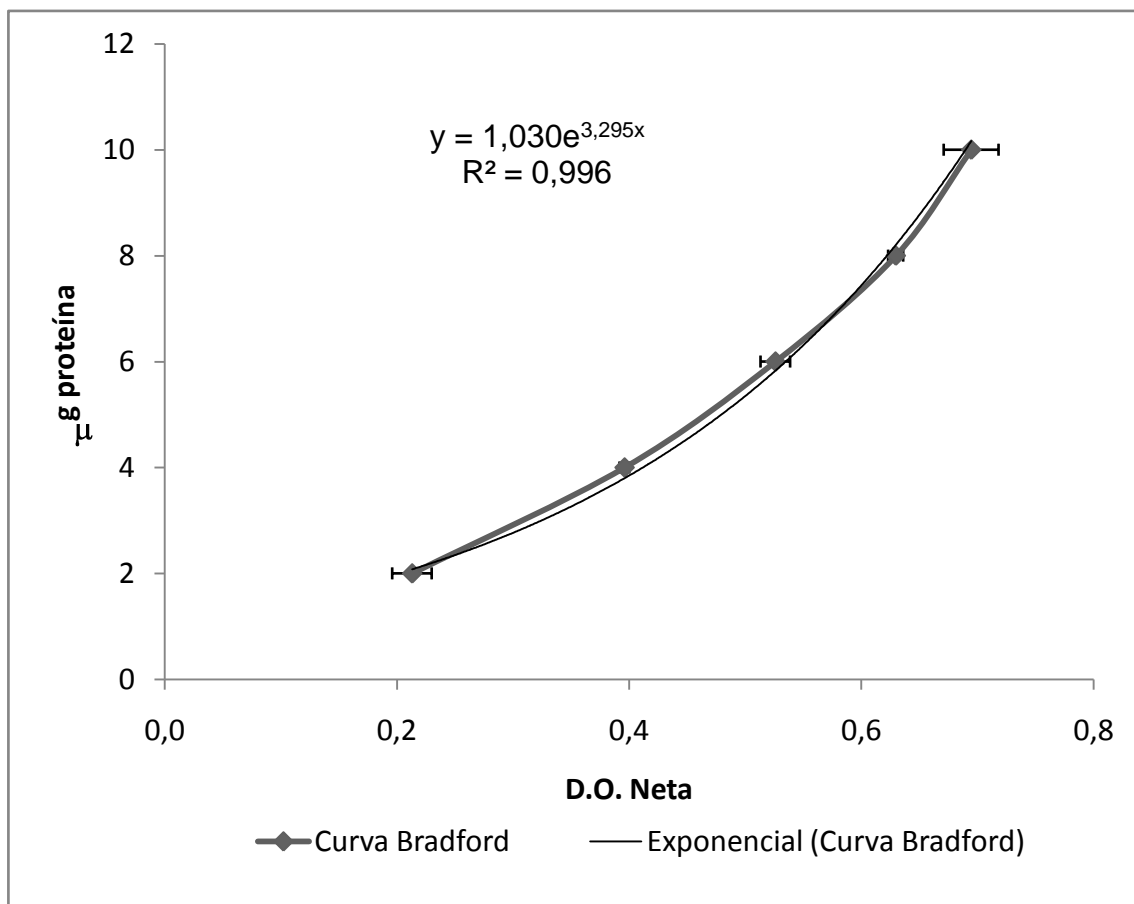
41. Nair KS, Schwartz RG, Welle S, Leucine as a regulator of whole body and skeletal muscle protein metabolism in humans, 1992, *Am J Physiol*, 263(5):E928-E934.
42. Norton LE, Layman DK, Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise, 2006, *J Nutr*, 136:533S-537S
43. Oddesey R, Golberg AI, Oxidation of leucine by rat skeletal muscle, 1972, *Am J Physiol*, 223(6):1376-1383.
44. Ortega Anta RM, Requejo Marcos AM, *Nutriguía: manual de nutrición clínica en atención primaria*, 2003, Madrid, Ed. Complutense, pp. 560.
45. Power GW, Newsholme EA, Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I in rat heart and skeletal muscle, 1997, *J Nutr*, 127:2142-2150.
46. Rasmussen BB, Winder WW, Effect of exercise intensity on skeletal muscle malonyl-CoA and acetyl-CoA carboxylase, 1997, *J Appl Physiol*, 83(4):1104-1109.
47. Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM, Velázquez A, Wang J, Fernández-Mejía C, Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats, 1999, *Endocrinology*, 140:4595-4600.
48. Rodríguez-Meléndez R, Cano S, Méndez ST, Velázquez A, Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats, 2001, *J Nutr*, 131:1909-1913.
49. Salter RB, *Trastornos y lesiones del sistema músculo esquelético: introducción a la ortopedia, fracturas y lesiones articulares, reumatología, osteopatía metabólica y rehabilitación*, 2000, Madrid, Ed. Elsevier, pp. 26 y 27.
50. Samols D, Thornton CG, Murtif VL, Kumar GK, Haase C, Wood HG, Evolutionary conservation among biotin enzymes, 1988, *J Biol Chem*, 263:6461-6464.
51. Sone H, Ito M, Sugiyama K, Ohneda M, Maebashi M, Furukawa Y, Biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat, 1999, *J Nutr Biochem*, 10:237-243.
52. Sone H, Ito M, Shimizu M, Sasaki Y, Komai M, Furukawa Y, Characteristics of the biotin enhancement of glucose-induced insulin release in pancreatic islets of the rat, 2000, *Biosci Biotechnol Biochem*, 64:550-554.
53. Stryer L, *Bioquímica*, 1995, Barcelona, Ed. Reverte, 4ª Edición, pp. 773.

54. Thibodeau GA, Patton KT, *Estructura y función del cuerpo humano*, 2008, Madrid, Ed. Elsevier, pp. 162.
55. Utter MF, Keech DB, Pyruvate carboxylase I Nature of the reaction, 1963, *J Biol Chem*, 238:2603-2608.
56. Vavvas D, Apazidis A, Saha AK, Gamble J, Patel A, Kemp BE, Witters LA, Ruderman NB, Contraction-induced changes in acetyl CoA carboxylase and 5'-AMP-activated kinase in skeletal muscle, 1997, *J Biol Chem*, 272:13255-13261.
57. Walker WF, Homberger DG, *Anatomy and dissection of the rat*, 1997, Ed. W.H. Freeman & Company, 3<sup>a</sup> Edición, pp. 30.
58. Wolf B, Feldman GL, The Biotin-Dependent Carboxylase Deficiency, 1982, *Am J Hum Genet*, 34:699-716.
59. Wolf B, Disorders in biotin metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 1995, Nueva York, Ed. McGraw Hill, 7 edición, pp. 3151-3177.
60. Zempleni J, Hassan YI, Wijeratne SK, Biotin and biotinidase deficiency, 2008, *Expert Rev Endocrinol Metab*, 3(6):715-724.

## Anexos

### Anexo A. Curva Bradford con coeficiente de variación intra ensayo (n=3)

$\mu\text{g}$ proteína	Promedio	E.E.	C.V.	D.O. neta
0	0,273	0,002	1,269	0,000
1	0,368	0,002	1,099	0,095
2	0,486	0,017	6,059	0,213
4	0,669	0,004	1,078	0,396
6	0,799	0,013	2,762	0,526
8	0,903	0,006	1,245	0,630
10	0,968	0,024	4,229	0,695





**Anexo B.** Curva Bradford con coeficiente de variación inter ensayo (n=13)

µg proteína	Promedio	E.E.	CV	D.O. Neta
<b>0</b>	0,264	0,002	2,224	0,000
<b>1</b>	0,349	0,005	5,114	0,085
<b>2</b>	0,447	0,010	7,929	0,183
<b>4</b>	0,623	0,011	6,408	0,359
<b>6</b>	0,766	0,010	4,834	0,502
<b>8</b>	0,873	0,009	3,809	0,608
<b>10</b>	0,964	0,010	3,746	0,700

