



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE LA COMPLEMENTACIÓN CON ALMIDÓN DE  
MAIZ EN RATONES ALIMENTADOS CON DIETAS DE  
DISTINTO APORTE DE BIOTINA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**VANIA ESMERALDA VILORIA ESTEVES**



México D.F.

2012



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:** M. en C. Lucía Cornejo Barrera  
**VOCAL:** Dr. José Eleazar Martínez Barajas  
**SECRETARIO:** Dra. Armida Báez Saldaña  
**1er. SUPLENTE:** Dr. José Pedraza Chaverri  
**2° SUPLENTE:** Dra. Liliana Rocío González Osnaya

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS. UNAM. Laboratorio B-220  
Departamento de Biología Celular y Fisiología. Tercer Circuito Escolar S/N, Ciudad  
Universitaria. Código Postal 04510. Del. Coyoacán, México D.F.

**ASESOR DEL TEMA:**

---

Dra. Armida Báez Saldaña

**SUSTENTANTE:**

---

Vania Esmeralda Vilorio Esteves

Esta Tesis se realizó con el apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del Proyecto PAPIIT IN215311 “Modulación Epigenética de la Homeostasis del Crecimiento Corporal”.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Armida Báez Saldaña por sus enseñanzas, paciencia y apoyo durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Margarita Gómez Chavarín por el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio.

A la M.V.Z. Georgina Díaz Herrera y al M.V.Z. Jorge Omar García Rebollar por sus enseñanzas y participación activa en el manejo adecuado de los ratones en el bioterio así como en la realización de los experimentos reportados en este proyecto de tesis.

A la Ing. Tzipe Silvia Govezensky Zack por las sugerencias y el tiempo dedicado al análisis estadístico del estudio conductual realizado en este trabajo.

## DEDICATORIAS

A mi mejor amigo Jesucristo por el amor, paciencia, guía y consejos dados a lo largo de mi carrera profesional. Por levantarme en cada tropiezo. Mil gracias Dios. Te amo.

A mi madre agradezco por todo el esfuerzo realizado, por escucharme, apoyarme y alentarme durante todos estos años. Mujer fuerte ¿quién la hallará? Porque su estima sobrepasa largamente a la de piedras preciosas.

A mi padre agradezco su apoyo y guía espiritual, por darme lo mejor que tenía en la vida. Y el que confía en Jehová, él es bienaventurado.

A mis hermanos agradezco por su paciencia y cariños durante toda mi vida... en todo tiempo ama el amigo y es como un hermano en tiempo de angustia.

A toda mi familia por su confianza en mí y el apoyo recibido, gracias.

A mis compañeras y amigas: Ana, Alma, Olga, Laurita, Elizabeth, Alejandra, Alicia y Verónica; por hacer más amena mi estancia en la facultad, por su apoyo y la alegría de poder convivir juntas una parte importante de mi vida, gracias.

Finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y a los profesores que a lo largo de mi carrera profesional me brindaron sus enseñanzas con paciencia y dedicación.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

## INDICE

	Página
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 La vitamina biotina y las carboxilasas.....	4
2.2 Ingesta y absorción intestinal de biotina.....	5
2.3 Modelo murino para el estudio de la biotina.....	6
2.4 Deficiencia de biotina.....	7
2.5 Digestión, absorción intestinal y metabolismo de hidratos de carbono....	9
2.6 Influencia del almidón en glucosa sérica e insulina.....	13
2.7 Metabolismo de glucosa y biotina.....	14
3. Justificación.....	18
4. Hipótesis.....	18
5. Objetivos.....	19
6. Diseño experimental.....	20
7. Materiales.....	22
8. Métodos.....	25
9. Resultados.....	28
10. Discusión.....	43
11. Conclusiones.....	48
12. Referencias.....	49
13. Anexo.....	58

## 1. INTRODUCCIÓN

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B que actúa como grupo prostético de enzimas carboxilasas que intervienen en el metabolismo intermedio de la célula. Esta vitamina está ampliamente distribuida en la naturaleza encontrándose en todos los seres vivos y se considera que sin ella no es posible vivir (Wolf B., Heard G. 1989). Su deficiencia afecta directamente a las carboxilaciones y en consecuencia al metabolismo de glucosa, de aminoácidos ramificados y de cadena impar y de ácidos grasos (Friedrich W. 1988).

Está comprobado que la deficiencia de biotina produce bajo peso corporal en todos los modelos animales de experimentación (Friedrich W. 1988) incluido el ratón (Báez Saldaña, et al. 1998). Actualmente está demostrado que esta menor ganancia de peso corporal no se debe a un menor consumo de alimento (Báez Saldaña, et al. 2009); ni a alteraciones en la digestión y/o absorción intestinal de macronutrientes (Gómez T. 2011, Carmona A. 2012; López L. 2012).

Tanto la deficiencia como la suplementación de biotina afectan los niveles de glucosa en sangre. Estudios in vitro con islotes pancreáticos de rata han mostrado que el tratamiento agudo con dosis farmacológicas de biotina aumenta la secreción de insulina estimulada por glucosa (Vilches-Flores, et al. 2010). Además, está reportado que el tratamiento con biotina a ratas diabéticas afecta el metabolismo de la glucosa en el hígado, disminuyendo la expresión de genes

gluconeogénicos (Dakshinamurti K. 1994). Reportes recientes indican que la deficiencia de biotina en ratones provoca hipoglucemia (Gómez T. 2011; Larrieta et al. 2012), habiéndose sugerido que en esta especie hay una mayor utilización de glucosa para cubrir sus requerimientos energéticos y/o una alteración en el mecanismo de regulación de la glucosa en circulación (Gómez T. 2011).

En este trabajo se evalúa el efecto de la complementación con almidón de maíz en el agua de uso a ratones alimentados con una dieta que carece de biotina o con otra que contiene cantidades farmacológicas de la vitamina, para analizar sus efectos en la glucemia. También se determinaron las actividades de  $\alpha$ -amilasa en el suero considerando este parámetro como un indicador de la digestión de hidratos de carbono complejos, así como de la función exocrina del páncreas. No se observaron respuestas asociadas a los distintos aportes de biotina en la dieta en los parámetros analizados; más bien, el grupo suplementado tuvo resultados controvertidos en el crecimiento corporal, la glucemia y la actividad de  $\alpha$ -amilasa. Los consumos individuales y específicos de agua y alimento fueron equivalentes entre los cuatro grupos experimentales, tanto en este estudio como en otros en donde no se complementó el agua de uso (Antonio O. 2011; Gómez T. 2011; Parra M. 2011). La adición de almidón tuvo un efecto positivo en la concentración de glucosa sérica de los ratones deficientes de biotina en condiciones ad libitum. Aunque la contribución energética proporcionada por el almidón representó una fracción muy discreta, sí produjo también un notable mantenimiento en la ganancia de peso corporal en el grupo deficiente, retrasando 3 semanas la diferencia en el peso que regularmente se observa entre este grupo y los grupos



control, suficiente y suplementado. Este efecto es aún más intenso cuando se comparan los crecimientos de los grupos deficiente y suficiente sin el complemento con almidón (Del Vecchy G. 2006; Báez Saldaña A., et al. 1998). Cabe hacer notar que estos incrementos no se debieron a modificaciones en los consumos de agua y alimento, lo que sugiere una acción específica del almidón sobre la masa muscular en estos dos grupos.

## **2. ANTECEDENTES**

La energía que requiere un organismo para vivir proviene de los alimentos. Los mamíferos utilizan tres tipos de moléculas complejas o macronutrientes, a saber: proteínas, lípidos e hidratos de carbono. La mayoría de las proteínas son degradadas en los aminoácidos que las componen para utilizarlos en la síntesis de las proteínas específicas del individuo; mientras que los lípidos e hidratos de carbono al ser metabolizados, son transformados en moléculas simples de ácidos grasos y glucosa, respectivamente; moléculas que constituyen las fuentes de energía para las células de todos los órganos y tejidos.

Para gozar de una buena salud, además de los macronutrientes, se requieren micronutrientes que por sí mismos no proporcionan energía pero que son imprescindibles para el adecuado aprovechamiento de los alimentos. Los micronutrientes más comunes son elementos como zinc, cobre, magnesio, potasio y vitaminas.

## 2.1 La vitamina biotina y las carboxilasas

La naturaleza esencial de la vitamina biotina se puede definir por su capacidad para servir como factor de crecimiento indispensable para las levaduras y ciertas bacterias. La biotina fue descubierta por primera vez en 1936 como el factor afectado en la toxicidad por la clara de huevo cruda cuando se usaba para preparar artesanalmente algunas dietas experimentales para rata. Los síntomas de esta patología en animales de experimentación consisten en retraso en el crecimiento, dermatitis y desórdenes musculares (Melo V., Cuamatzi O. 2007).

Actualmente está claramente establecido que la biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B que actúa como grupo prostético de enzimas carboxilasas. (Dakshinamurti K. 1994). Su estructura química (Fig. 1) consiste en un anillo imidazol fundido en forma cis a un anillo tetrahidrotiofeno al que está unida una cadena lateral de valerato (Voet D., Voet G.J. 2005).

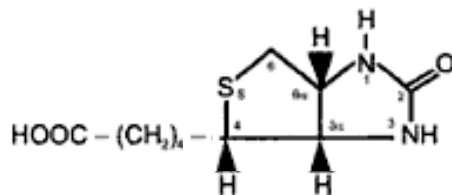


Figura 1. Estructura de la biotina

En los mamíferos existen cinco carboxilasas dependientes de biotina implicadas en la síntesis de ácidos grasos, la gluconeogénesis y el catabolismo de aminoácidos. Las enzimas acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1) y ACC2 son citosólicas, aunque esta última está asociada a la membrana mitocondrial externa

(Abu-Elheiga L. et al., 2000); en tanto que las enzimas piruvato carboxilasa (PC); propionil-CoA carboxilasa (PCC) y metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) son mitocondriales. (Friedrich W. 1988; Vilches A., Fernández C. 2005). La PC cataliza la transformación de piruvato a oxaloacetato, un intermediario en la síntesis de fosfoenolpiruvato y por lo tanto esencial para la síntesis de glucosa. Las otras 4 carboxilasas actúan en el metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos (Wallace JC. et al. 1998).

## **2.2 Ingesta y absorción intestinal de biotina.**

La ingesta recomendada de biotina para una persona adulta es de 100-300 µg por día, cantidad que contrasta con las necesidades de otras vitaminas del complejo B que se recomienda sean del orden de mg por día. Esta vitamina está presente en todo tipo de alimento tanto animal como vegetal, siendo las fuentes más ricas el hígado, riñón, pescado, carne de pollo, yema de huevo, leche, nueces, chocolate y levaduras, los que la contienen en cantidades que van de 10 µg/100 g hasta 90 µg/100 g; además muchas verduras contienen entre 3 y 10 µg de biotina por 100 g (Tolonen M. 1995; Dorosz, 2001).

Una gran parte de la biotina dietética se halla en las proteínas, unida al grupo ε-amino de una lisina específica y al final de su digestión queda como residuo el dímero biotina-lisina conocido como biocitina, por lo que es necesaria la acción de la biotinidasa, una enzima pancreática que la libera para que pueda ser utilizada. La biotina libre se absorbe en el intestino delgado por los enterocitos de la porción

distal del duodeno y proximal del yeyuno; y posteriormente pasa al torrente sanguíneo por difusión pasiva (Melo V., Cuamatzi O. 2007). La biotina es transportada por la sangre hacia todos los tejidos y su entrada a la célula se lleva a cabo a través de un transportador múltiple de vitaminas dependiente de sodio (SMVT) que reconoce principalmente la porción del ácido valérico de la biotina. El SMVT introduce a la biotina junto con el sodio a favor de un gradiente de concentración. (Hymes J., Wolf B. 1996; Chatterjee N. et al., 1999 citado en Vilches A., Fernández C. 2005).

### **2.3 Modelo murino para el estudio de la biotina**

La función clásica de la biotina como cofactor esencial para las carboxilasas se generó utilizando modelos en ratas y en la actualidad se cuenta con un modelo murino que ha servido para profundizar tanto en la función prostética de la biotina como para describir funciones sistémicas de esta vitamina, mismas que hasta ahora no se han podido asociar directamente con las actividades de las carboxilasas (Báez-Saldaña et al. 1998, 2009a, 2009b; Báez-Saldaña, Ortega E. 2004).

El avance en el conocimiento de la función de las vitaminas se debe en buena medida al uso de modelos experimentales animales, principalmente de roedores, a los que se les alimenta con dietas que carecen de la vitamina en cuestión y una vez observados sus efectos se restablece su suministro para determinar y analizar la recuperación. El ratón es un biomodelo adecuado para la investigación

biomédica por sus características como: alta fertilidad, corto período de gestación y fácil producción bajo condiciones controladas, tamaño conveniente que resulta en mantenimiento económico y susceptibilidad a ciertas enfermedades. (Festing M. 1993; The Jackson Laboratory, 2003; Benavides & Guénet, 2003). Además de las características mencionadas, se han producido ratones “estandarizados” genéticamente por medio de la consanguinidad. Esta estandarización permite que la composición genética de los animales reduzca considerablemente la variabilidad individual en las investigaciones, de tal forma que los resultados de los parámetros analizados se puedan comparar con más especificidad y permitan ser reproducibles entre animales de diferentes laboratorios (Maltais L. et al. 1997). Por ejemplo, la cepa consanguínea de ratones BALB/c es el resultado de 20 o más generaciones consecutivas de acoplamiento hermano x hermana (eventualmente, padre x madre) y es derivada de una sola pareja reproductora ancestral, lo que conlleva a que estas cepas presenten una heterocigocidad residual menor al 2 % ( $F=98,7\%$ ); alcanzando el 100% en aquellas con más de 150 generaciones. Estos ratones BALB/c se caracterizan por: tener genes iguales; perfil genético propio; son estables por largos periodos de tiempo; uniformes fenotípicamente; sensibles a cambios del ambiente y son de distribución mundial.

#### **2.4 Deficiencia de biotina**

Como se mencionó, la biotina fue descrita debido a que la clara de huevo contiene una proteína básica conocida como avidina y que muestra una inusual afinidad por la biotina ( $K_d=10^{-15}$  M; Green N.M. 1975), a la que se une de manera irreversible

formando un complejo que tiene la particularidad de no ser absorbido por el tracto gastrointestinal de los mamíferos, produciendo así la deficiencia de la vitamina (Melo V., Cuamatzi O., 2007). Bioquímicamente la deficiencia de biotina afecta directamente las carboxilaciones que consecuentemente perturban la síntesis de proteínas, la utilización de glucosa, la fosforilación oxidativa y la síntesis de glucógeno y de ácidos dicarboxílicos (Friedrich W. 1988).

En los humanos bajo circunstancias normales la carencia de biotina es muy rara; sin embargo, estudios clínicos con voluntarios que consumieron clara de huevo cruda para provocarse la deficiencia presentaron dermatitis, dolores musculares, anorexia, alopecia, náuseas, insomnio, así como desórdenes neurológicos. (Melo V., Cuamatzi O. 2007).

Por otra parte, la característica más común de la deficiencia de biotina en distintos modelos animales es la menor ganancia de peso corporal. Con base en las características mencionadas de los biomodelos murinos, se estableció el que ha permitido demostrar que en esta especie, la alimentación con una dieta carente de biotina y con 30% de sólidos de clara de huevo desecada como única fuente de proteína, causa un arresto en el crecimiento desde las 4 semanas de experimentación y pérdida de peso durante la etapa crónica del estudio (Báez-Saldaña A. et al. 1998; Báez-Saldaña, Ortega E. 2004). Estos efectos no están asociados a un consumo menor de alimento (Báez-Saldaña A. et al. 2009), lo que abre la posibilidad de que existan alteraciones en la digestión y absorción intestinal de macronutrientes.

## **2.5 Digestión, absorción intestinal y metabolismo de hidratos de carbono**

La alimentación de mamíferos contiene tres tipos de hidratos de carbono: los monosacáridos glucosa, fructosa y galactosa; los disacáridos; y los grandes polisacáridos como almidones, celulosa, etc. Los disacáridos sacarosa, lactosa y maltosa son degradados por acción de las enzimas sacarasa, lactasa y maltasa presentes en las microvellosidades de las células intestinales, en donde son transformados en los hidratos de carbono simples glucosa, fructosa y galactosa; que se absorben en el intestino sin necesidad de digestión previa, por lo que son una fuente rápida de energía (Palavecino N. 2002). Alrededor del 95% de la glucosa es absorbida en el intestino delgado en forma activa (Guyton A. 1997; Voet D., Voet G.J. 2005).

La mayoría de los hidratos de carbono que se consumen diariamente son almidones que están presentes en los cereales y tubérculos. Son polímeros de glucosa lineales o ramificados que se denominan amilosa y amilopectina, respectivamente. Del 100% de los almidones más del 80% se metaboliza a glucosa, en tanto que la galactosa y la fructosa producidas durante el proceso contribuyen generalmente con cerca del 10%. (Guyton A. 1997).

Datos experimentales sugieren que los diferentes tipos de hidratos de carbono pueden tener distintos efectos metabólicos importantes para regular el peso corporal. Tanto la sacarosa como la glucosa incluso en pequeñas dosis, tienen la

capacidad de reducir la ingesta de alimento a corto plazo; en cambio las comidas ricas en almidón parecen producir una saciedad más prolongada (6 horas). (Anderson G.H., Woodend D. 2003).

La digestión del almidón inicia en la boca por acción de la enzima ptialina, una  $\alpha$ -amilasa presente en la saliva y que hidroliza al azar los enlaces internos  $\alpha$ -1,4 glucosídicos; dando como productos maltosa (disacárido de glucosa) y dextrinas (pequeños polímeros formados por 3 a 9 moléculas de glucosa). Durante el proceso de masticación, la ptialina hidroliza entre el 30% y 40% de los almidones y cuando los alimentos completamente masticados llegan al estómago la actividad de esta enzima es bloqueada por la acidez de las secreciones gástricas. La digestión del almidón restante se realiza en el intestino delgado por la  $\alpha$ -amilasa pancreática, la cual degrada el almidón hasta maltosa, maltotriosa (tres residuos de glucosa con uniones  $\alpha$ -1,4) y dextrinas que contienen ramificaciones  $\alpha$ -1,6. La transformación ulterior de estos oligosacáridos en glucosa se produce por acción de las enzimas maltasa e isomaltasa, también presentes en las microvellosidades de las células intestinales, siendo la isomaltasa la que rompe los enlaces  $\alpha$ -1,6 de las dextrinas. (Guyton A. 1997; Voet D., Voet G.J. 2005).

La amilasa humana fue descubierta desde el siglo XIX y la determinación de su actividad en el suero sanguíneo se ha utilizado desde principios del siglo XX como herramienta de diagnóstico (Wilding P., Dawson H. 1967). Se sabe que esta enzima tiene un pH óptimo de 6.9 a 7.2 y que requiere la presencia de iones cloruro en una concentración mayor de 0,01 molar (Henry R. J., Chiamori N.



1960). Una unidad de actividad de amilasa es definida como 1  $\mu$ mol de maltosa liberado de almidón por minuto a 37°C (Mackenzie P., Messer M. 1976). Los valores normales de amilasa en suero humano se reportan según el método utilizado: para el sacarogénico de Somogyi se tiene un intervalo de 600 a 1800 U/L (Henry R., Chiamori N. 1960; Wilding P., Dawson H. 1967; Bauer J. 1986); mientras que en la actualidad los laboratorios de análisis clínicos utilizan estuches comerciales de métodos enzimáticos donde el sustrato es un oligosacárido específico con el que se produce p-nitrofenol, registrando rangos de 34 a 2589 U/L (Linear Chemicals S.L. 2012; Stanbio Laboratory, Lab Licon, 2012). Para cualquiera de los dos métodos, los valores son afectados por la edad, sexo, dieta y localización geográfica. Se han reportado varias enfermedades como pancreatitis, paperas, obstrucción intestinal, peritonitis y úlcera gástrica, que causan un incremento en la actividad de amilasa sérica hasta de 5,000 U/L (Wilding P. and Dawson H. F. 1967; Owyang C. 2007; Tenner S, Steinberg W. 2010).

Varios investigadores que trabajan con animales de experimentación han reportado que los riñones, cerebro, pulmón, músculo esquelético, trompas de Falopio, intestino, bazo y corazón producen amilasa (Wilding P. and Dawson H. F. 1967). Sin embargo, las dos fuentes principales de  $\alpha$ -amilasa sérica en la rata y el hombre son la glándula parótida y el páncreas (Karn R., Malacinski G. 1978), contribuyendo estos dos tejidos por igual en el humano, mientras que en la rata parece ser que en condiciones fisiológicas el páncreas secreta mucho menos

amilasa que la glándula parótida (Proctor G., et al. 1991). En ratas, la ingesta de alimentos después de un ayuno conduce a un aumento en la actividad de la amilasa sérica (Proctor G., et al. 1990; Nagy A., et al. 2001) y lo mismo sucede en régimen ad libitum durante las primeras 2 horas de oscuridad, cuando las ratas consumen una porción importante de alimentos (Nagy A., et al. 2001).

La glucosa es la principal fuente de energía para todas las células del organismo, mientras que para el cerebro constituye la fuente de energía exclusiva. Primero es metabolizada en piruvato por medio de la glucólisis que se realiza en el citosol. Enseguida el piruvato se transporta hacia la mitocondria, donde se transforma en acetil-CoA por acción del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa. A continuación se incorpora al ciclo de Krebs que es la vía común para la oxidación aeróbica de los sustratos energéticos, condición que convierte a este proceso enzimático en la vía de degradación más importante para la generación de ATP. Todo con el único fin de hacer disponible para la célula la energía química contenida en la glucosa. La glucosa no oxidada es almacenada en forma de glucógeno. El hígado libera glucosa hacia la sangre durante la actividad muscular por medio de la degradación del glucógeno y en los intervalos entre comidas la produce por la gluconeogénesis a través de la PC, para que puedan consumirla principalmente el cerebro, células del sistema inmune y músculo esquelético. La glucosa fosforilada, producida por la degradación del glucógeno, no se transporta con facilidad fuera de las células, por lo que el hígado la hidroliza a través de la *glucosa 6-fosfatasa*, que escinde el grupo fosforilo y produce glucosa libre más

ortofosfato. (Voet D., Voet G.J. 2005; Stryer L., et al. 2002; Mathews K.C., et al. 2004).

## **2.6 Influencia del almidón en glucosa sérica e insulina**

Después de la ingesta de alimento el nivel de glucosa en la sangre se eleva y este cambio químico induce a las células beta pancreáticas para que secreten insulina; una hormona que estimula la captación y utilización de glucosa e impide la degradación de glucógeno (Mendoza N. 2008). La acción de la insulina sobre células diana se ejerce mediante la unión a su receptor, molécula formada por dos unidades glucoproteicas alfa y beta (Pacheco D. 2004). La insulina aumenta la captación de glucosa por medio de la activación del transportador de glucosa GLUT-2 en las células del hígado y GLUT-4 en las del músculo y tejido adiposo (Mendoza N. 2008). El hígado y las células musculares utilizan la glucosa en forma inmediata y almacenan las cantidades sobrantes en forma de glucógeno. La deficiencia en la secreción de insulina puede llevar a la diabetes mellitus tipo 2 (Taggart S. 2004), enfermedad que se caracteriza por la aparición de hiperglucemia además de secreción insuficiente de insulina y/o resistencia a la acción periférica de la insulina (Tebár F., Escobar F. 2009). Esta última se presenta más comúnmente por una respuesta reducida de las células diana debida a algún cambio en los receptores de insulina (Campbell N., Reece J. 2007).

El consumo de una bebida con 50 gramos de almidones crudos de tapioca y maíz en proporción 46:54 provoca que los niveles de glucosa sérica se mantengan

elevados durante más tiempo y retrasan el pico en la concentración de glucosa, tanto en individuos sanos como en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Seal C. J., et al. 2003). Este estudio indica que la digestión de esta combinación de almidones se desarrolla más lentamente proporcionando por más tiempo niveles elevados de glucosa. La proporción de amilosa- amilopectina presente en el almidón tiene diferentes efectos en la glucosa sérica y la respuesta a la insulina postprandial (Granfeldt Y. et al. 1994). Los almidones de maíz con 70% de amilosa son eficaces para el control de peso y glucemia en la obesidad, mientras que los almidones con 70% de amilopectina solo regulan las concentraciones de glucosa sérica (Aziz A., et al. 2009). Hombres con hiperinsulinemia que consumieron durante 10 semanas almidón de maíz con 70% de amilosa, normalizaron su respuesta a la insulina, mientras que este efecto no se presenta si el almidón contiene 70% de amilopectina; aunque las concentraciones de glucosa sérica no se corrigieron con alguno de los dos tipos de almidón (Behall K., Howe J. 1995). Por otra parte, Goddard et al. reportan efectos benéficos por el consumo del arroz largo que contiene 25% de amilosa, ya que aumenta menos los niveles de glucosa postprandial así como los de insulina.

## **2.7 Metabolismo de glucosa y biotina**

El mecanismo por el que se obtiene la energía de la glucosa en forma de uniones fosfato en el ATP se denomina glucolisis. Este proceso comprende dos fases principales. La primera consiste en una etapa de preparación en donde la glucosa es primero fosforilada para luego partirla a la mitad y así obtener 2 moléculas del

azúcar gliceraldeído 3-fostato. En la segunda etapa se llevan a cabo todas las reacciones para transformar su energía en moléculas de ATP.

La fosforilación de la glucosa es realizada por dos tipos de enzimas con diferente afinidad por este azúcar, glucocinasa y hexocinasa. Esta última es la más importante porque la utilizan la mayoría de las células y porque tiene una afinidad para D-glucosa de  $1 \times 10^{-5}M$ ; valor 3 órdenes de magnitud menor que en la glucocinasa. Hay dos isoenzimas de glucocinasa, la hepática y la pancreática, mientras que para la hexocinasa existen múltiples formas en los diferentes tejidos animales (Lehninger A. 2009). La glucocinasa expresada en los hepatocitos y en las células  $\beta$ -pancreáticas, tiene una función importante en el metabolismo de la glucosa; sin embargo la actividad de la isoforma pancreática de la glucocinasa es regulada de manera diferente que la isoenzima hepática (Matschinsky F. 2002). La actividad de la glucocinasa pancreática se requiere para la secreción normal de insulina estimulada por la glucosa y la del hígado para suprimir la producción de glucosa hepática y la gluconeogénesis cuando hay glucosa plasmática elevada (Matschinsky F. 2005).

En ratas normales, la administración de biotina (1 mg/kg) promueve la transcripción y traducción del gen de la glucocinasa en los hepatocitos (Chauhan J., Dakshinamurti K. 1991). Además, en cultivos primarios de islotes pancreáticos de rata, la incubación con concentraciones fisiológicas de biotina provoca un aumento en la secreción de insulina así como estimula tanto la actividad como la transcripción de la glucocinasa (Romero-Navarro G. 1999), por un mecanismo

que empezó a dilucidarse y que involucra la activación de guanilato ciclasa y PKG, lo que a su vez produce un aumento en el contenido de ATP, mismo que induce la secreción de insulina; y ésta de manera autocrina activa la cascada de señalización fosfoinositol-3-cinasa/Akt (Vilches-Flores A., et al. 2010). Cabe resaltar que estas acciones se ejecutan por cambios en la transcripción y traducción de las glucocinasas hepática y pancreática, enzimas que no requieren a la biotina para su actividad.

Se ha visto que la actividad de la glucocinasa hepática es inferior a la normal en la diabetes mellitus tipo 2 (Matschinsky F. 2005). Hay evidencia de que pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentan bajas concentraciones séricas de biotina y que cuando son tratados durante 30 días con biotina se regula la glucemia en ayuno (Maebashi M. et al. 1993). Por otra parte, el cromo es un mineral traza esencial que se requiere para el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos. En la actualidad es aceptado que el picolinato de cromo trivalente es un compuesto terapéutico muy útil para el manejo de la resistencia a la insulina en la diabetes mellitus tipo 2 (Albarracín C. et al. 2008). Pacientes con esta enfermedad que no responden a la terapia oral con medicamentos antidiabéticos y que además tienen sobrepeso u obesidad, presentan una menor concentración de glucosa sérica en ayuno cuando son tratados durante 30 días con biotina en combinación con el picolinato de cromo (Albarracín C. et al. 2008). Además, la administración intraperitoneal de biotina en ratas con diabetes inducida, -por la destrucción de las células beta del páncreas a través del tratamiento con estreptozotocina-, mejora parcialmente la curva de tolerancia a una carga de glucosa oral por un mecanismo

que no involucra modificaciones en la secreción de insulina, aunque sí aumenta las actividades de las glucocinasas hepática y pancreática (Zhang H, et al. 1997). La primera evidencia de que la deficiencia de biotina afecta el metabolismo de glucosa en ratas fue reportada por Dakshinamurti et al. (1968), encontrando que las curvas de tolerancia a la glucosa son significativamente más elevadas que las de los animales control, además de que el contenido de glucógeno hepático y la fosforilación de la glucosa son menores. Estudios posteriores mostraron que las anomalías en el metabolismo de hidratos de carbono en ratas deficientes de esta vitamina se deben a una disminución en la actividad de la glucocinasa hepática (Dakshinamurti K., Hong H.C. 1970) como una consecuencia de la menor transcripción de la enzima (Chauhan J, Dakshinamurti K. 1991). La carencia de biotina produce también una disminución tanto de la actividad como de la abundancia de ARN mensajero de la glucocinasa pancreática. Igualmente, en los islotes pancreáticos aislados de ratas deficientes de biotina se presenta una secreción disminuida de la insulina en respuesta a la glucosa (Romero-Navarro G., et al. 1999).

Se ha observado que la deficiencia de biotina en los ratones causa hipoglucemia, efecto opuesto al descrito para las ratas. En estos ratones la concentración de glucosa sérica a partir de la cuarta semana de experimentación, tanto en condiciones *ad libitum* (Gómez T. 2011) como después de ayuno (Del Vecchio G. 2006; Larrieta E. et al. 2011) se encuentra disminuida del 40% al 60%, respectivamente. En el ayuno podría explicarse por la baja actividad de la PC en el hígado que se encuentra reducida en 85% (Báez Saldaña A., et al. 1998), aunque

no aplica para las condiciones *ad libitum*, por lo que se ha sugerido que además podría haber una mayor demanda de glucosa debida a posibles alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos a través de la ACC1 (Gómez T. 2011).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La biotina está involucrada en la homeostasis del metabolismo de la glucosa, tanto en humanos como en roedores. Debido a que la deficiencia de esta vitamina provoca hipoglucemia en ratones, se ha sugerido la necesidad de un mayor suministro de energía para el organismo insuficiente de biotina. Así, en este trabajo se evalúa el efecto de la complementación con almidón de maíz en el agua de uso a ratones alimentados con dietas de distinto aporte de biotina.

### **4. HIPÓTESIS**

El complemento con hidratos de carbono complejos en el agua de uso de ratones alimentados con dietas de distinto contenido de biotina, tendrá un efecto positivo y asociado a la cantidad de biotina en la concentración de glucosa sérica.



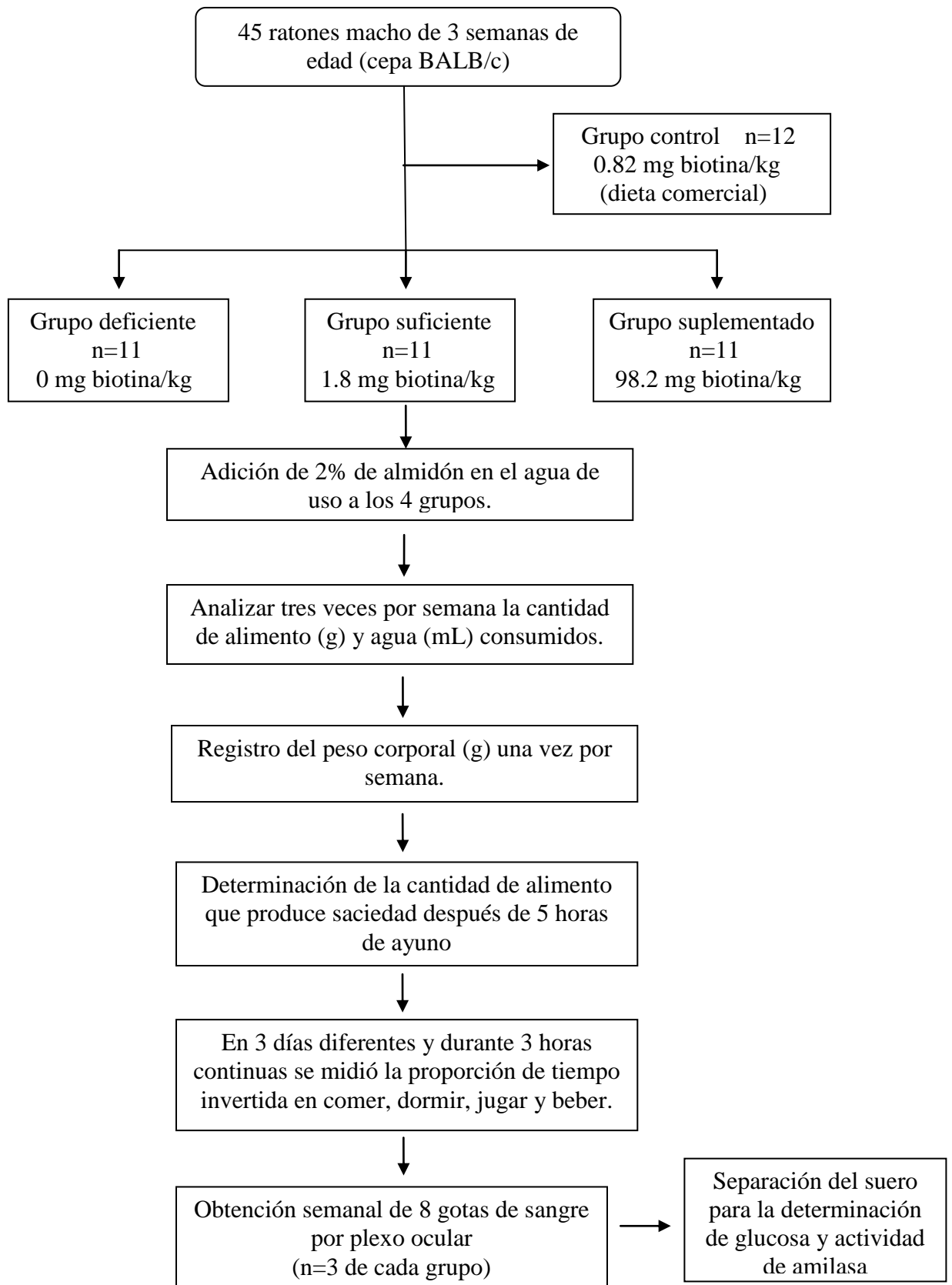
## 5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del consumo de almidón de maíz en el agua de uso durante 8 semanas, sobre las concentraciones de glucosa sérica de ratones alimentados con una dieta que contiene 0.82 mg de biotina/kg (control o dieta comercial estándar), y dietas experimentales que contienen 0.0 mg de biotina/kg (deficiente), 1.8 mg de biotina libre/kg (suficiente), o 98.2 mg de biotina libre/kg (suplementada).

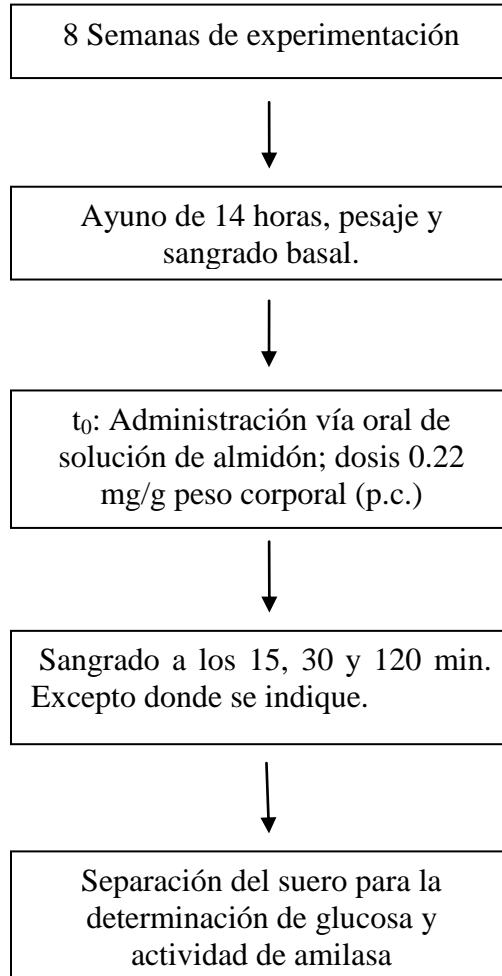
Objetivos Particulares:

- Evaluar el peso corporal y los consumos específicos de alimento y agua.
- Estudiar las proporciones de tiempo que invierten los ratones en las actividades básicas como comer, beber, dormir y acicalarse.
- Medir la cantidad de alimento que produce saciedad.
- Determinar la actividad de amilasa sérica a lo largo del tiempo de experimentación y durante la curva de absorción oral de almidón de maíz.
- Analizar el efecto de la ingesta crónica de almidón de maíz sobre las concentraciones de glucosa en el suero.
- Evaluar las concentraciones séricas de glucosa durante una curva de absorción oral de almidón de maíz.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL



## Curva de absorción de glucosa por administración de almidón vía oral



**Todos los procedimientos realizados para el estudio de los ratones fueron aprobados por el Comité de Ética Para el uso de Animales en Experimentación.**

[http://www.biomedicas.unam.mx/\\_administracion/reglamentos\\_y\\_contractos/archivos\\_pdf/REGLAMENTO\\_DEL\\_BIOTERIO.pdf](http://www.biomedicas.unam.mx/_administracion/reglamentos_y_contractos/archivos_pdf/REGLAMENTO_DEL_BIOTERIO.pdf)

## 7. MATERIAL

En el Anexo I se presenta la lista del material utilizado durante el desarrollo de este trabajo.

### DIETAS

Se utilizó como dieta control a la dieta comercial Harlan Teklad (cat. 2018S) que contiene 18% de proteínas. Las dietas experimentales contienen 30% de sólidos de clara de huevo desecada como única fuente de proteína. Como se describió anteriormente, en la clara de huevo se encuentra la proteína avidina que se une a la biotina formando un complejo que impide su absorción en el intestino. De esta forma, la dieta deficiente (Harlan Teklad cat. TD.0682) además de no contener biotina provoca su eliminación ya que cada vez que se consume el alimento agota la biotina presente en el organismo al inicio de la experimentación. Las dietas suficiente (Harlan Teklad cat. TD.06681) y suplementada (Harlan Teklad cat. TD.110543) son de composición idéntica a la dieta deficiente, pero adicionadas con 0.004 g de biotina/kg alimento y 0.100 g de biotina/kg alimento, cantidades adecuadas para neutralizar a la avidina y además proporcionar un exceso que permita el adecuado crecimiento de los ratones, en el caso de la suficiente, o suministrar dosis farmacológicas de la vitamina en la suplementada.

### CONSUMO DE ALIMENTO Y AGUA

Los datos semanales son promedio de las mediciones que se realizaron tres veces por semana. Los cálculos de las mediciones son los siguientes:

$$C_i = [(A_i - A_f)/n]/d; \quad C_e = C_i/P$$

Donde:

$C_i$  = Consumo individual

$C_e$  = Consumo específico

$A_i$  = Alimento o agua inicial

$P$  = Peso promedio

$A_f$  = Alimento o agua final

$n$  = Número de ratones

$d$  = Número de días

## CANTIDAD DE ALIMENTO QUE PRODUCE SACIEDAD

Se midió la cantidad de alimento que satisface el hambre de los ratones en todos los grupos durante un periodo de media hora después de un ayuno de 5 horas.

$$C_{as} = A_f - A_i$$

$C_{as}$  = Cantidad de alimento que produce saciedad

$A_i$  = Alimento inicial

$A_f$  = Alimento final después de media hora

## APORTACIÓN ENERGÉTICA DEL ALMIDÓN CONSUMIDO EN EL AGUA DE USO

Se determinó la cantidad de kcal aportadas por el alimento que consumen semanalmente los ratones, considerándola como el 100%. De esta forma se determinó también la cantidad de kcal aportadas por el almidón en el agua de uso durante la misma semana, estableciendo así el porcentaje extra de kcal consumidas.

$$\%kcal_e = (kcal_{alm} * 100) / kcal_a; \quad kcal = P_a * E$$

$\%kcal_e$  = porcentaje de kcal extra       $kcal_{alm}$  = kcal aportadas por el almidón  
 $kcal_a$  = kcal aportadas por el alimento  
 $P_a$  = Promedio semanal de alimento (g) o agua (mL)  
 $E$  = aporte energético del alimento (3.8 kcal/g) o almidón (75.6 kcal/L)

## DETERMINACIÓN DEL TIEMPO OCUPADO EN ACTIVIDADES BÁSICAS

Este análisis se realizó sólo para los grupos deficiente, control y suplementado. Se realizaron 3 observaciones desde las 10:00 h hasta las 13:00 h y en días diferentes; registrando cuatro actividades: comer, beber, dormir y jugar. En cada ocasión y a intervalos de 5 minutos se registraba la cantidad de ratones que en cada caja estaba realizando una de estas 4 actividades. La evaluación de los registros se hizo con la siguiente fórmula:

$$T_{act}/n_d$$

$T_{act}$  = Tiempo total ocupado en cada actividad durante 9 h de observación  
 $n_d$  = Número total de ratones en cada grupo que efectuó la actividad correspondiente

## ACTIVIDAD DE AMILASA

Los sueros de cada ratón se diluyeron 1:10 dado que en ensayos piloto se observó que en los ratones las actividades de amilasa sérica estaban fuera del límite de sensibilidad del estuche comercial.

Siguiendo las instrucciones en la hoja técnica del proveedor, se calculó el promedio del incremento de absorbancia por minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ) y se multiplicó por 3954. El resultado representa la actividad de la enzima en U/L

## **8. MÉTODOS**

### **Toma de sangre por plexo ocular**

Procedimiento:

1. Se marcaron los tubos Eppendorf con el número de ratón y la semana de sangrado y se colocaron sobre la gradilla.
2. Se colocó la gasa extendida sobre la mesa y sobre ésta la gradilla junto con un algodón humedecido con Sevoflurano®. dentro de un tubo Falcon.
3. El ratón se introdujo en el tubo con Sevoflurano y cuando se quedó dormido se sacó de la cámara y enseguida se obtiene la sangre del plexo ocular por medio de un capilar introducido en el lagrimal del ojo derecho.
4. Se tomaron 8 gotas de sangre en el tubo Eppendorf marcado, finalmente se limpió el ojo del ratón con un algodón humedecido en la solución salina.

### **Separación del suero**

Procedimiento:

1. Se tomaron los tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían la sangre obtenida de los ratones y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos.
2. Se marcaron los 15 tubos Eppendorf de 0.6 mL con el número de ratón y semana de experimentación; y se colocó en ellos el suero obtenido.
3. Se almacenaron los tubos a -20°C hasta el momento de su análisis.

## Medición de glucosa por el método de o-toluidina

Fundamento: es una reacción colorimétrica específica para hexosas. En ácido acético glacial la o-toluidina se condensa con el grupo aldehído de la glucosa para dar un cromógeno verde a través de la formación de una mezcla en equilibrio de la glucosilamina y la base de Schiff correspondiente. El color formado se mide mediante un espectrofotómetro a 630 nm, siendo la intensidad de color de la solución directamente proporcional a la cantidad de glucosa existente. Los valores obtenidos se comparan con una curva estándar (Gennaro A., 2003).

- Reactivo de o-toluidina: A 0.5 g de Tiourea se le adicionaron 9 mL de o-toluidina y se aforó a 100 mL con ácido acético glacial.
- Estándar de glucosa: A 0.01 g de dextrosa se le adicionaron 10 mL de agua.

### Procedimiento:

1. Se diluyó el estándar de glucosa 1:10 con el reactivo de o-toluidina.
2. Se tomaron alícuotas de 0, 20, 40, 60, 80, 100 y 120  $\mu$ L del estándar en cada tubo Eppendorf marcado y se ajustó a un volumen de 250  $\mu$ L con reactivo de o-toluidina.
3. Se tomaron 5  $\mu$ L de la muestra en un tubo Eppendorf y se ajustó a un volumen de 250  $\mu$ L con reactivo de o-toluidina.
4. Se colocaron todos los tubos en baño de agua a ebullición por 10 min.
5. Se retiraron del baño y se enfriaron por 10 minutos a 6°C. Se tomaron 200  $\mu$ L de cada alícuota y se depositaron en una microplaca. La lectura se hizo a 630 nm en el Espectrofotómetro.



## **Medición de $\alpha$ -amilasa. Ensayo realizado con el estuche comercial de Amilasa-LQ (SPINREACT)**

- Reactivo de amilasa: MES pH=6 100 mmol, CNPG3 2.25 mmol, Cloruro sódico 350 mmol, Acetato cálcico 6 mmol, Tiocianato potásico 900 mmol, Azida sódica 0.95 g/L.

### **Procedimiento:**

1. Se prepararon diluciones de las muestras 1:10 con solución salina.
2. Se reconstituyó el suero control SPINTROL H con 5 mL de agua destilada.
3. Se colocó la microplaca sobre el hielo hasta el momento de la lectura.
4. Primero se colocaron los 4  $\mu$ L de la muestra diluida y después los 200  $\mu$ L del reactivo en el pozo de la microplaca.
5. Se introdujo la microplaca a la cámara del lector precalentado a 37°C y se corrió el programa.
6. Las lecturas se realizaron a 405 nm. La primera lectura fue a los 4:30 minutos, las siguientes cada 3 minutos por 15 minutos.

## **Curva de almidón a las 8 semanas de experimentación**

### **Procedimiento:**

1. A cada ratón se tomó una muestra basal de sangre por plexo ocular en el ojo derecho.
2. Se aplicó una dosis de 5.5  $\mu$ L/g p.c. de la solución de almidón al 4% registrándose la hora (tiempo 0).
3. A los 15 y 30 minutos de la administración oral de almidón se realizaron los sangrados correspondientes por plexo ocular alternando cada ojo.

4. A los 120 minutos de la aplicación de almidón se realizó el sangrado a blanco por plexo ocular en el ojo izquierdo.
5. Inmediatamente después del sangrado a blanco el ratón se sacrificó por dislocación cervical.
6. Se desechó el cuerpo del ratón en la bolsa amarilla de residuos biológicos y se colocó en la cámara correspondiente.
7. El mismo procedimiento de los pasos 1 a 6 se realizó para los 45 ratones.

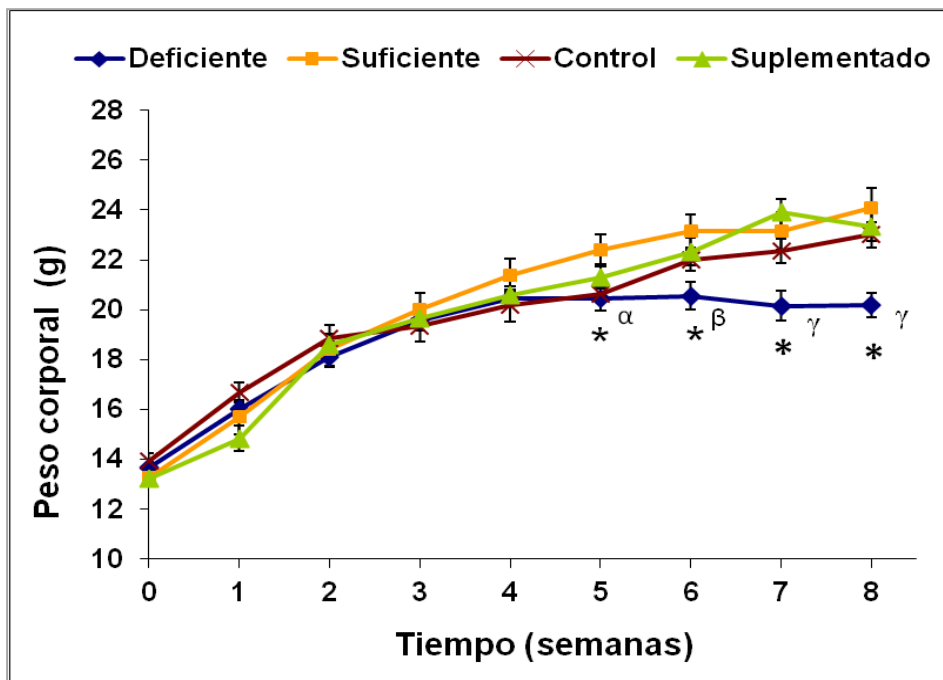
### **Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el programa SigmaStat 3.5, a través de un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparación múltiple. Excepto para aquellos casos en los que se indique los resultados se presentan como promedio  $\pm$  error estándar (EE).

## **9. RESULTADOS**

**Peso corporal** - De las cuatro dietas usadas en este trabajo solo la dieta deficiente de biotina produjo una menor velocidad de ganancia en el peso corporal. El peso de los ratones para todos los grupos va en aumento hasta la cuarta semana (gráfica 1), ésto debido a que los ratones están en crecimiento. Desde la cuarta y hasta la octava semana el peso de los ratones en el grupo deficiente se mantuvo constante, mientras que en los grupos suficiente, control y suplementado el aumento de peso continuó aunque con menor ganancia que en las primeras semanas. El análisis estadístico indicó que la diferencia significativa

en el grupo deficiente se presentó a partir de la quinta y sexta semana de experimentación (solo comparado con el grupo suficiente), cuando su peso fue entre 10% y 20% menor. La diferencia de peso entre todos los grupos con respecto al deficiente se presentó en las semanas 7 y 8.



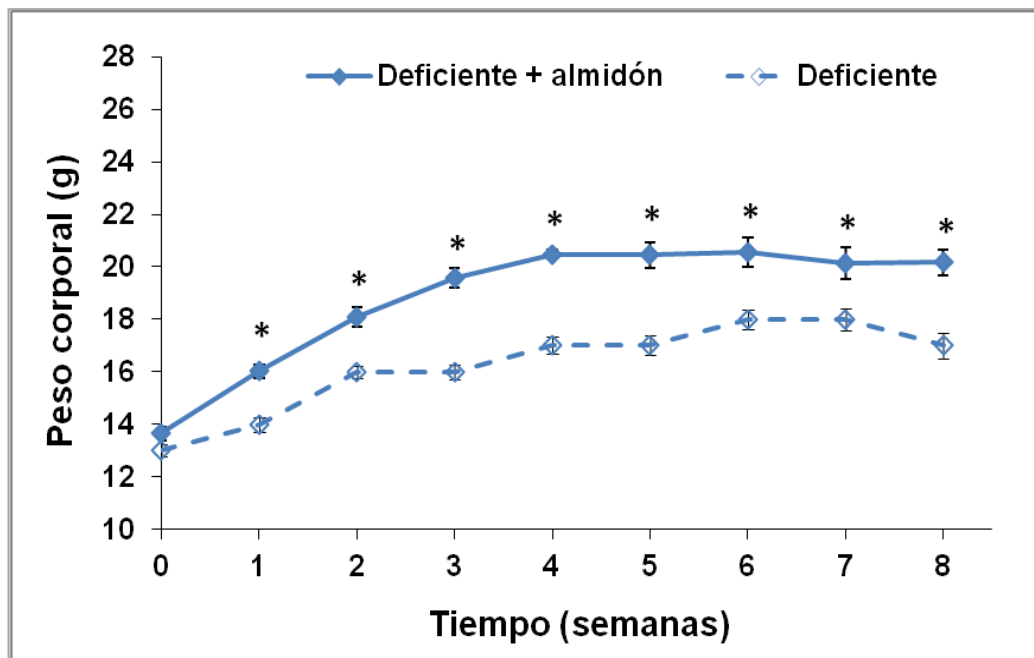
Gráfica 1. Curva de crecimiento de los ratones en los cuatro grupos experimentales. Valor promedio  $\pm$  EE, n=11

\* Diferencia significativa entre grupo suficiente vs deficiente  
 $\alpha$  ( $P = 0.047$ ),  $\beta$  ( $P = 0.004$ )

\* Diferencia significativa entre grupo deficiente vs control, suficiente y suplementado  $\gamma$  ( $P < 0.001$ )

La adición de 2% de almidón al agua de uso causó un evidente aumento en el peso de los ratones, aunque sólo en los grupos deficiente y suficiente de biotina. Cuando se compara la curva de crecimiento entre grupos deficientes de biotina con y sin la adición de almidón en el agua de uso (este estudio y trabajos anteriores, respectivamente) se observó que este complemento alimenticio

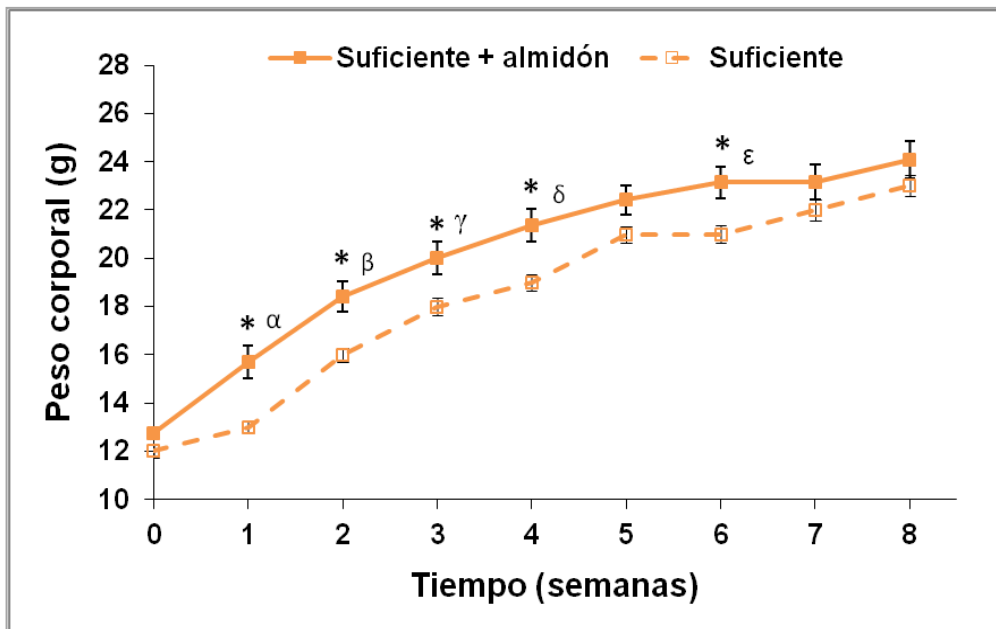
provocó una mayor ganancia de peso corporal desde la primera semana de experimentación ( $P < 0.001$ , gráfica 2) y para el grupo suficiente este efecto ocurrió exclusivamente a partir de la primera y hasta la sexta semana (gráfica 3); mientras que este tratamiento no tuvo efecto para los grupos suplementado y control (gráficas 4 y 5)



Gráfica 2. Efecto del almidón sobre el crecimiento en los grupos deficientes de biotina. Valor promedio  $\pm$  EE

Grupo deficiente:  $n=34-40$ , grupo deficiente + almidón:  $n=11$

\*Diferencia significativa entre grupos ( $P < 0.001$ )

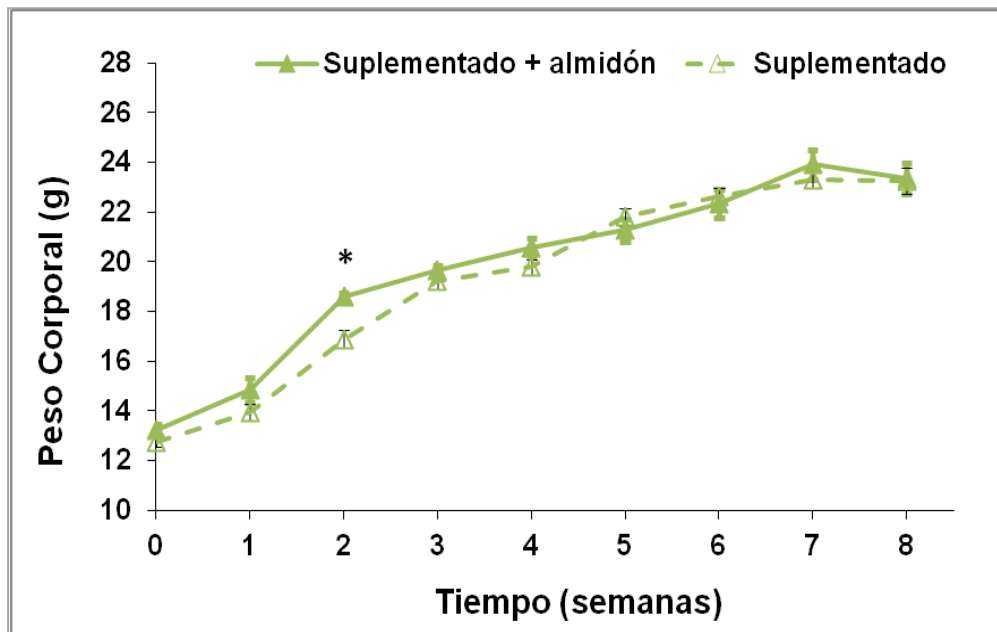


Gráfica 3. Curvas de crecimiento para los grupos suficientes de biotina.

Valor promedio  $\pm$  EE

Grupo suficiente: n=28-47, grupo suficiente + almidón n=11

\*Diferencia significativa entre grupos  $\alpha$  ( $P = 0.036$ ),  $\beta$  ( $P = 0.016$ ),  $\gamma$  ( $P = 0.04$ ),  $\delta$  ( $P = 0.003$ ),  $\epsilon$  ( $P = 0.018$ )

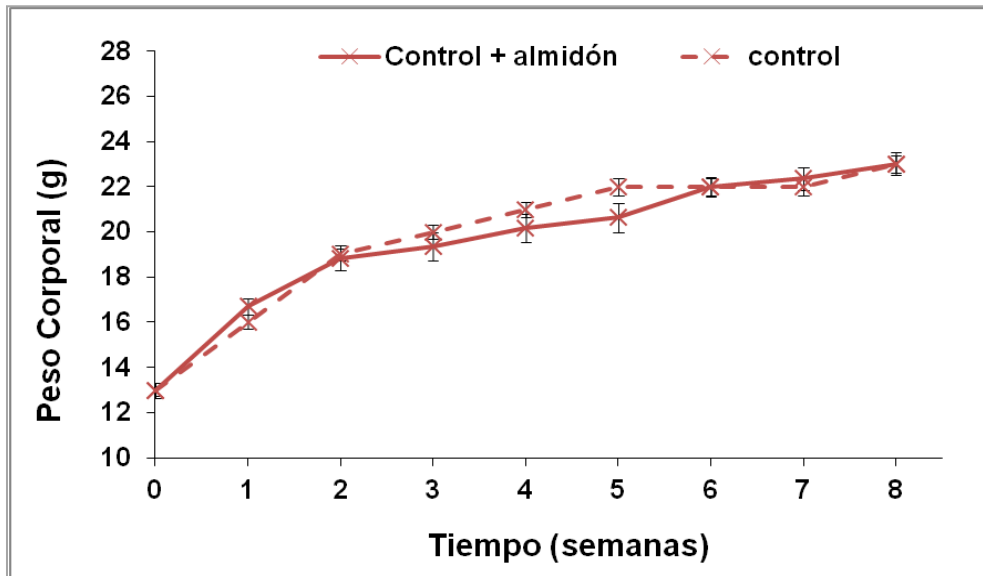


Gráfica 4. Efecto del almidón en los grupos suplementados de biotina.

Valor promedio  $\pm$  EE.

Grupo suplementado: n=18-36, grupo suplementado + almidón n=11

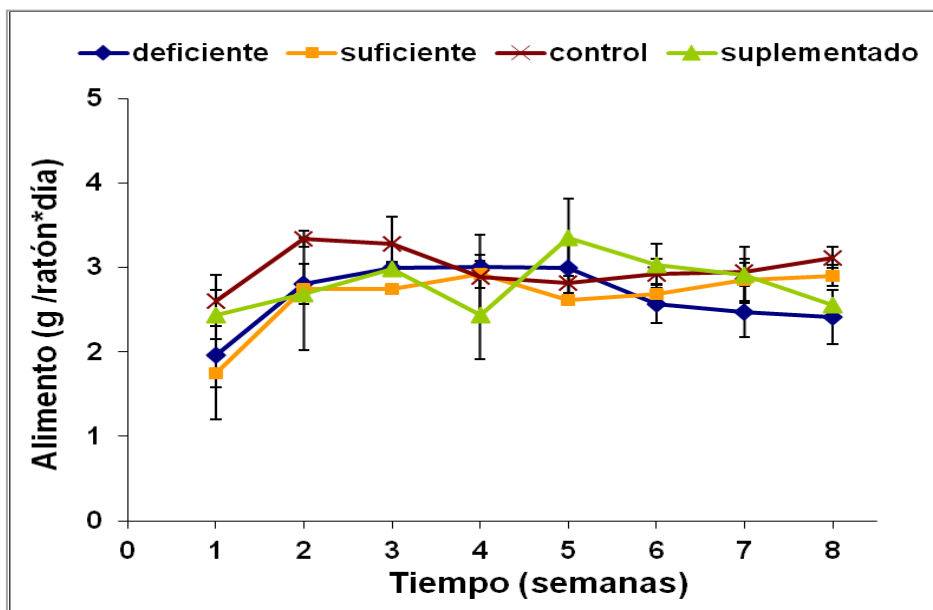
\*Diferencia significativa entre grupos ( $P = 0.005$ )



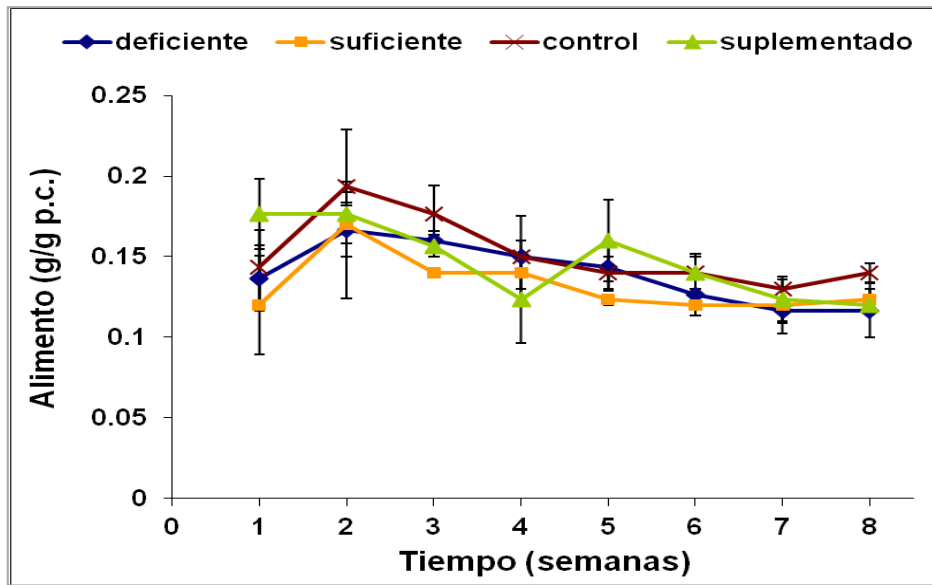
Gráfica 5. Comparación de las curvas de crecimiento para los grupos con dieta control. Valor promedio  $\pm$  EE

Grupo control: n=25-43, grupo control + almidón n=12

**Consumo de Alimento** - El consumo de alimento en los cuatro grupos experimentales no fue diferente en la ingesta individual (gráfica 6) ni en la específica (gráfica 7).



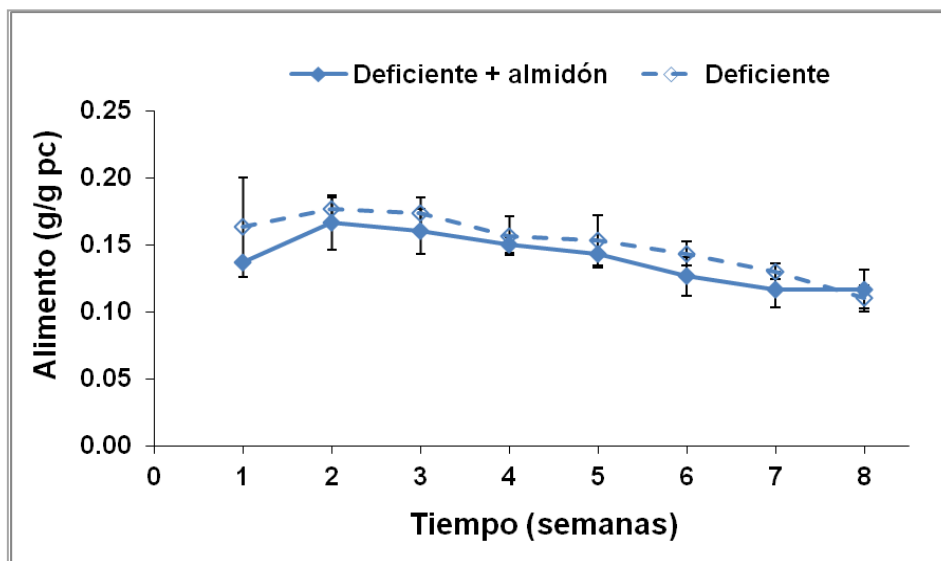
Gráfica 6. Consumo individual de alimento para los cuatro grupos experimentales. Valor promedio  $\pm$  EE, n=11



Gráfica 7. Consumo específico de alimento para los cuatro grupos experimentales.

Valor promedio  $\pm$  EE, n=11

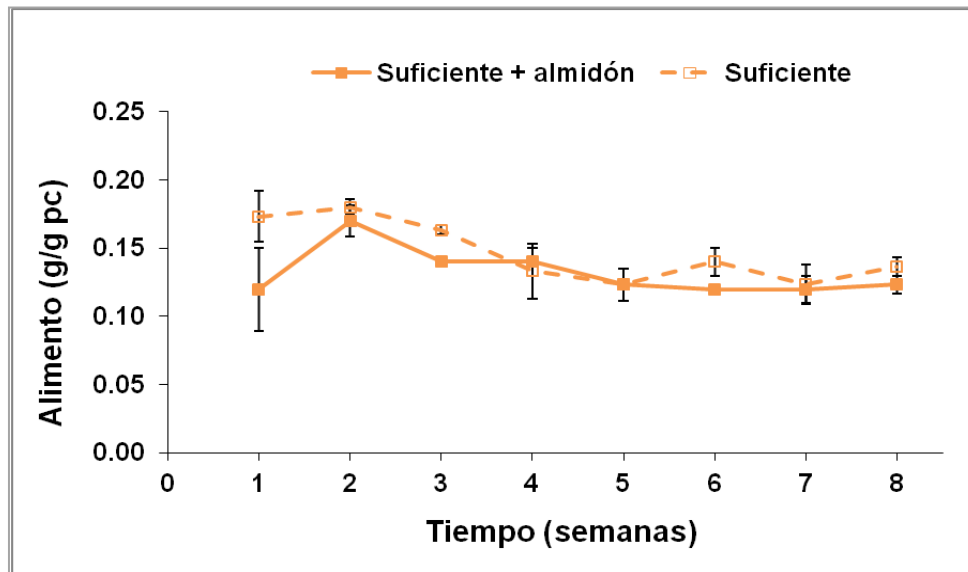
En las gráficas 8 y 9, se puede observar que el complemento de almidón en el agua de uso no provocó algún cambio en el consumo específico de alimento por los ratones de los grupos deficiente y suficiente, respectivamente, por lo que la ganancia de peso obedece a un proceso diferente a mayor consumo de calorías.



Gráfica 8. Consumo específico de alimento con y sin almidón en el agua.

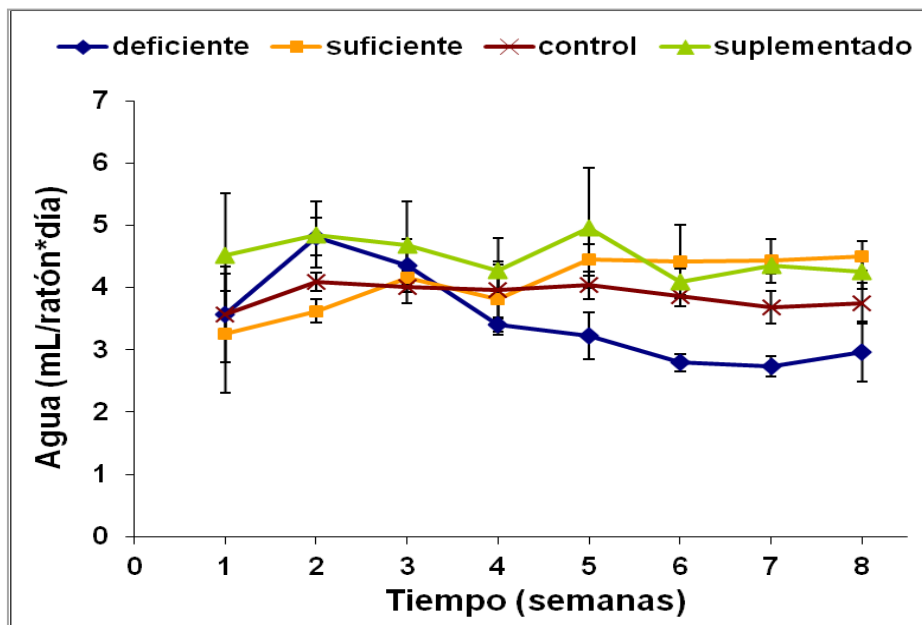
Valor Promedio  $\pm$  EE

Grupo deficiente: n=34-40; Grupo deficiente + almidón: n=11



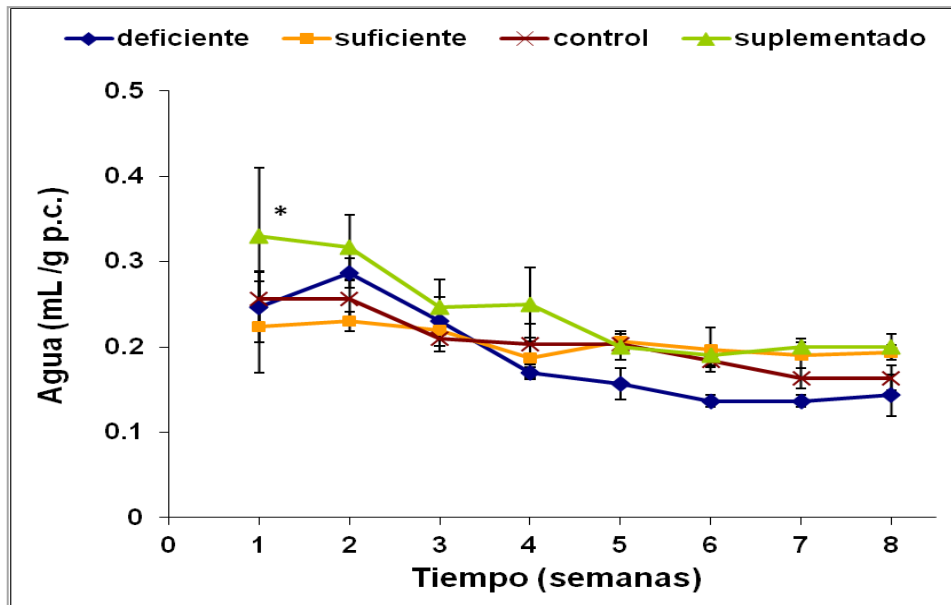
Gráfica 9. Consumo específico de alimento con y sin almidón en el agua.  
 Valor Promedio  $\pm$  EE  
 Grupo suficiente: n=6-20; Grupo suficiente + almidón: n=11

**Ingesta de agua-** El consumo de agua tanto individual como específico fue igual para los cuatro grupos con las distintas dietas (gráficas 10 y 11).



Gráfica 10. Consumo de Agua para los cuatro grupos experimentales.  
 Valor Promedio  $\pm$  EE, n=11

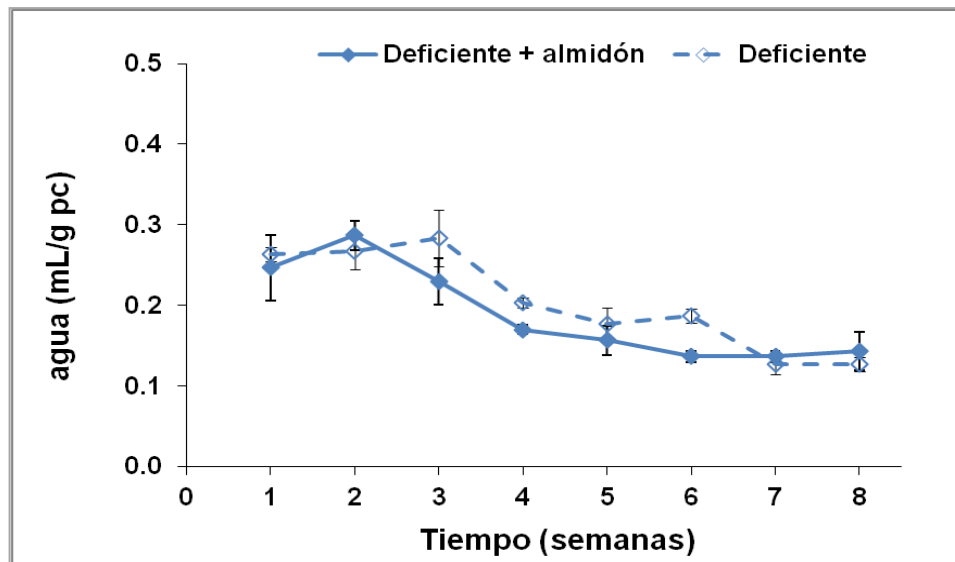




Gráfica 11. Consumo específico de Agua para los cuatro grupos experimentales. Valor Promedio  $\pm$  EE, n=11

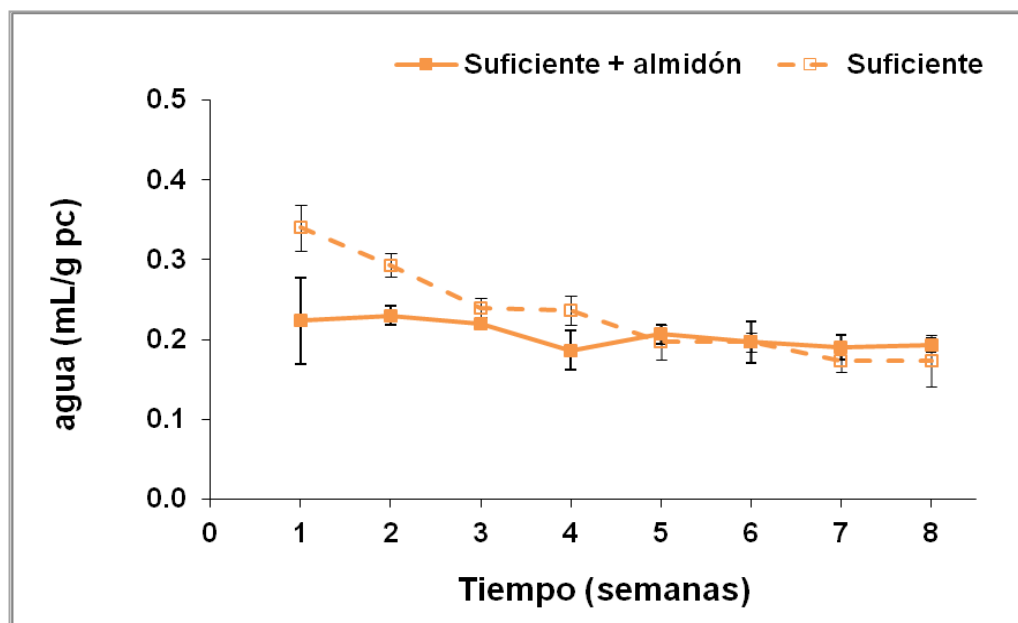
\*Diferencia significativa entre grupo suficiente y suplementado (P= 0.032)

Al comparar el consumo específico de agua con almidón (este trabajo) en los ratones alimentados con las dietas deficiente y suficiente de biotina con el de los que no recibieron este complemento (estudios paralelos y diferidos), tampoco se presentaron diferencias (gráficas 12 y 13).



Gráfica 12. Comparación del consumo específico de agua para los grupos deficientes de biotina. Valor Promedio  $\pm$  EE

Grupo deficiente: n=34-40; Grupo deficiente + almidón: n=11

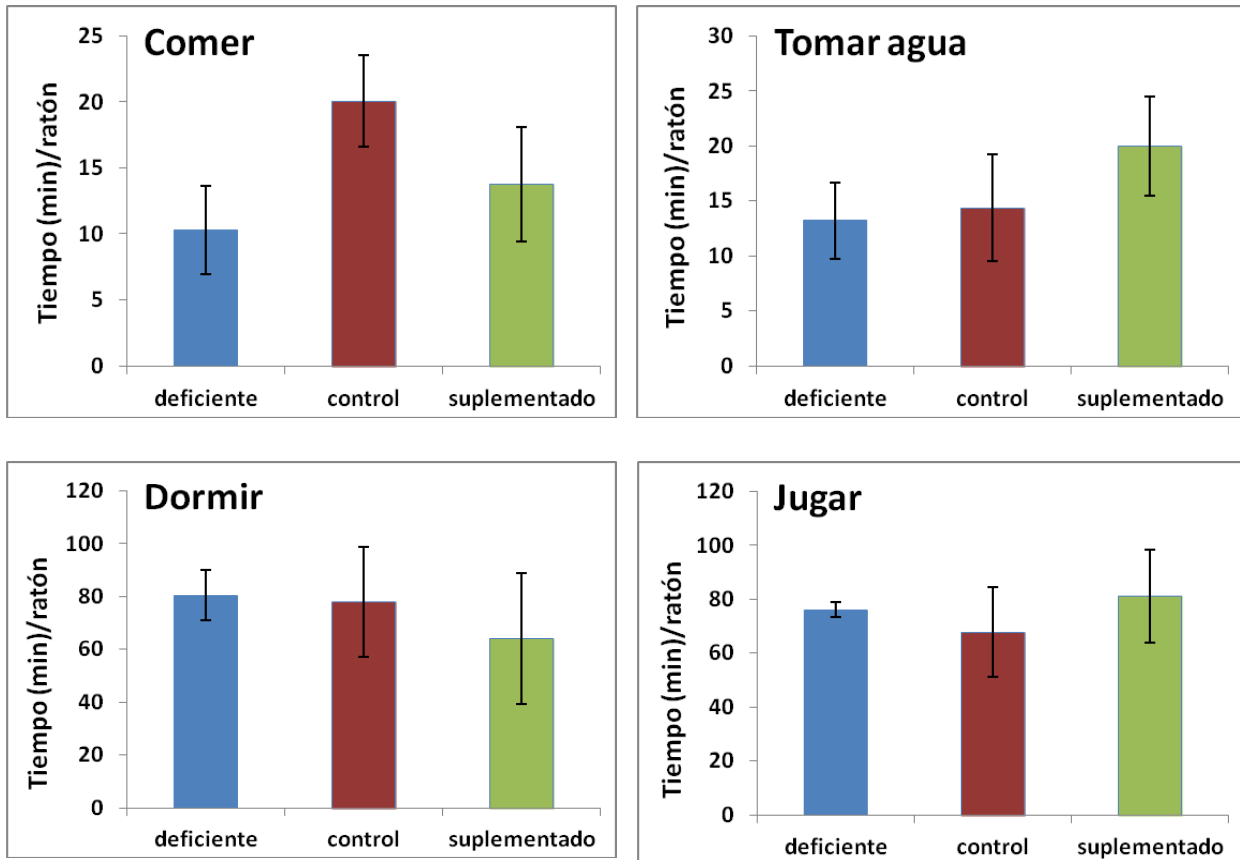


Gráfica 13. Consumo específico de agua para los grupos suficientes de biotina.  
 Valor Promedio  $\pm$  EE  
 Grupo suficiente: n=6-20; Grupo suficiente + almidón: n=11

Tabla 1. Aporte energético por el consumo de alimento y almidón.  
 Se presenta el promedio  $\pm$  EE durante las semanas 4 a 8 de experimentación  
 (n=5).

Dieta	Alimento	Almidón	% Extra por almidón
	<b>kcal/día*g p.c.</b>		
Deficiente	0.48 $\pm$ 0.03	0.01 $\pm$ 0.001	2.28 $\pm$ 0.06
Suficiente	0.47 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.0003	3.13 $\pm$ 0.08
Control	0.52 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.001	2.58 $\pm$ 0.08
Suplementada	0.50 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.001	3.02 $\pm$ 0.22
<b>Promedio</b>	<b>0.49 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>0.01 <math>\pm</math> 0.001</b>	<b>2.75 <math>\pm</math> 0.2</b>

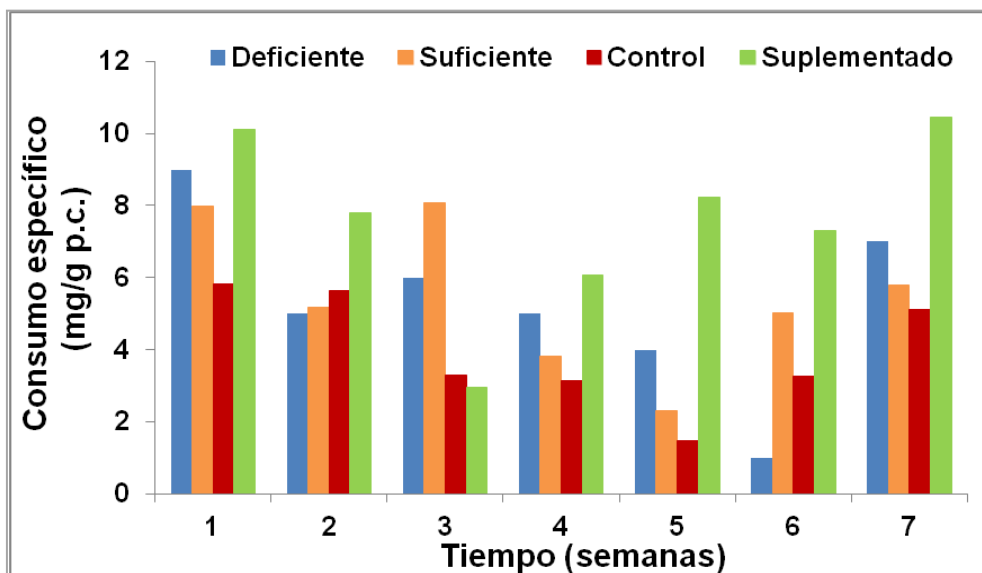
**Observación de actividades básicas.** Para saber si las distintas dietas modificaban las actividades básicas de los ratones, se determinaron las proporciones de tiempo que invertían en comer, beber, dormir y jugar, observando que no hay diferencias entre las distintas dietas para las cuatro actividades (Gráfica 14). Este estudio no se realizó en el grupo suficiente.



Gráfica 14. Duración total de actividades observadas por 9 h. Promedio  $\pm$  E.E.

**Determinación de la ingesta de alimento hasta saciedad-** En la gráfica 15 se presenta la cantidad de alimento por gramo de p.c. que consumieron los ratones durante media hora después de un ayuno de 5 horas. Aunque a simple vista parece que el grupo suplementado consumió mayor cantidad de alimento para saciar su hambre, a excepción de las semanas 3 y 6, al promediar las 7 semanas

(tabla 2) y realizar el análisis estadístico notamos que no hay diferencia entre los 4 grupos. Tampoco se encontraron diferencias en este análisis cuando se compararon los datos con otros lotes de ratones que no recibieron almidón en el agua de uso (estudios paralelos y/o diferidos).



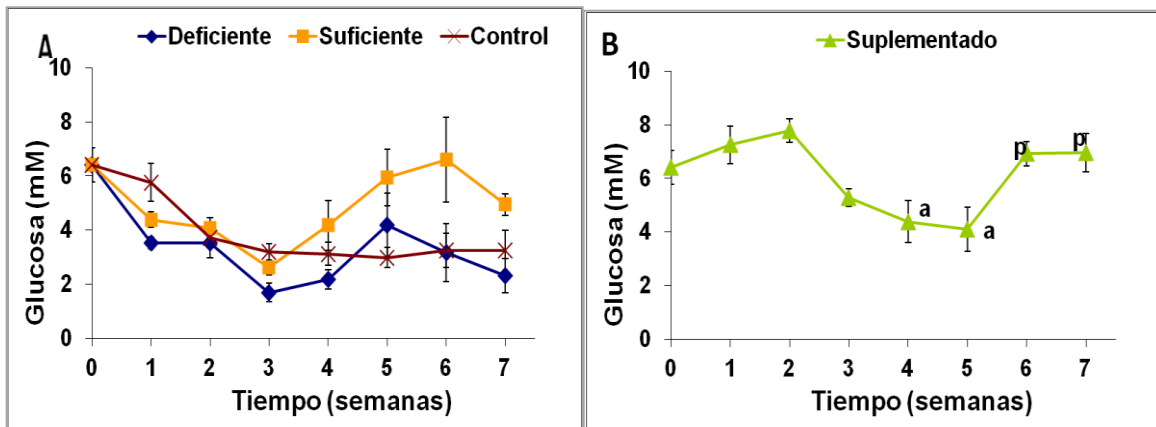
Gráfica 15. Alimento específico consumido después de 5 horas de ayuno.

Tabla 2. Consumo de alimento que produce saciedad. Se presenta el promedio  $\pm$  EE de las 7 determinaciones semanales.

Dieta	Con Almidón (mg)	Sin Almidón (mg)
Deficiente	5.3 $\pm$ 0.9	3.9 $\pm$ 0.8
Suficiente	5.4 $\pm$ 0.8	5.2 $\pm$ 1.0
Control	4.0 $\pm$ 0.6	n.d.
Suplementada	7.6 $\pm$ 1.0	5.0 $\pm$ 0.7

n.d. = no determinado

**Glucosa sérica** – Las concentraciones de glucosa sérica en los ratones de los 4 grupos en condiciones de libre albedrío fueron muy variables, con grandes dispersiones y sin diferencias (Gráfica 16); no obstante, se mantuvieron dentro del rango normal de  $5.3 \pm 2.3$  mM reportado para ratones (Chih-Ya Cheng, et al., 2005). Las dispersiones amplias se debieron a que los ratones no se encontraban sincronizados en sus horarios de alimentación al momento de tomar la muestra de sangre. Para comprobar esta consideración en el grupo suplementado, la sangre se tomó en algunas ocasiones después de mantener a los ratones en ayuno por 5 horas o postprandial de media hora después de este ayuno (Gráfica 16-B y Tabla 3).

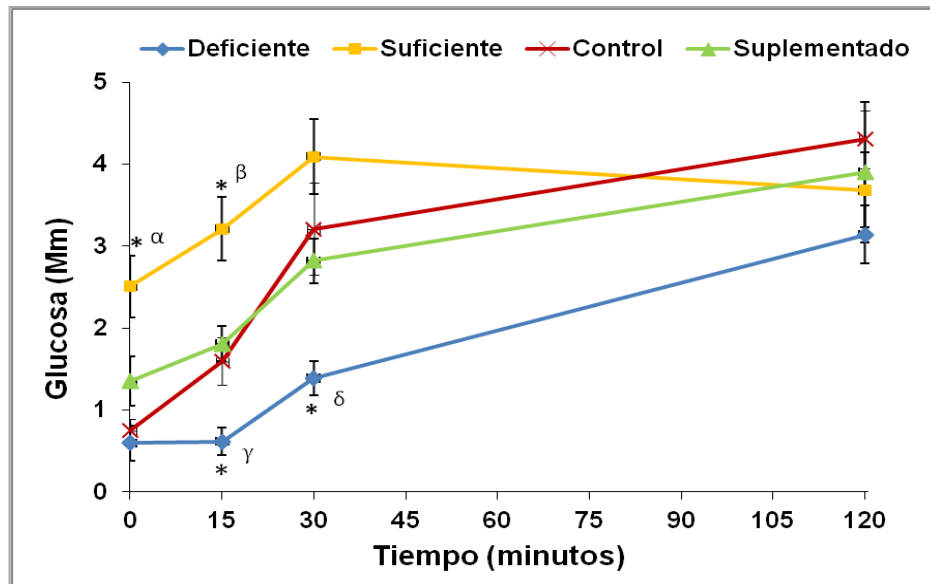


Gráfica 16. A. Concentración de glucosa sérica *ad libitum*. Valor Promedio  $\pm$  EE, Grupo control, suficiente y deficiente: n=5  
 B - Concentración de glucosa sérica *ad libitum*, a=ayuno y p=postprandial para grupo suplementado. Valor Promedio  $\pm$  EE, n=6

Tabla 3. Valores de glucosa sérica en un grupo suplementado. Se presenta el promedio  $\pm$  EE. A=ayuno; P=postprandial

Tiempo de estudio (semanas)	Condición	Glucosa (mM)
4	Ayuno	$4.39 \pm 0.79$
5	Ayuno	$4.09 \pm 0.82$
6	Postprandial	$6.92 \pm 0.45$
7	Postprandial	$6.96 \pm 0.71$

**Curva de concentración de glucosa sérica por administración oral de almidón.**- Después de un ayuno por 14 horas pero con disponibilidad de agua con almidón, los ratones del grupo suficiente tuvieron niveles de glucemia un poco menores al límite inferior normal, mientras que los ratones en los grupos deficiente y suplementado presentaron concentraciones casi iguales a las reportadas en el trabajo de Gómez T.; y llama la atención la marcada reducción que presentó el grupo control alimentado con la dieta comercial estándar. Los ratones suficientes de biotina fueron los únicos en restablecer valores normales desde los 15 minutos, mientras que los ratones con las dietas control y suplementada necesitaron el doble de tiempo. Durante la primera media hora de este experimento el grupo deficiente tuvo un curso temporal de glicemia distinto a los otros tres (gráfica 17), no obstante que a los 120 minutos todos los ratones alcanzaron los valores espontáneos.

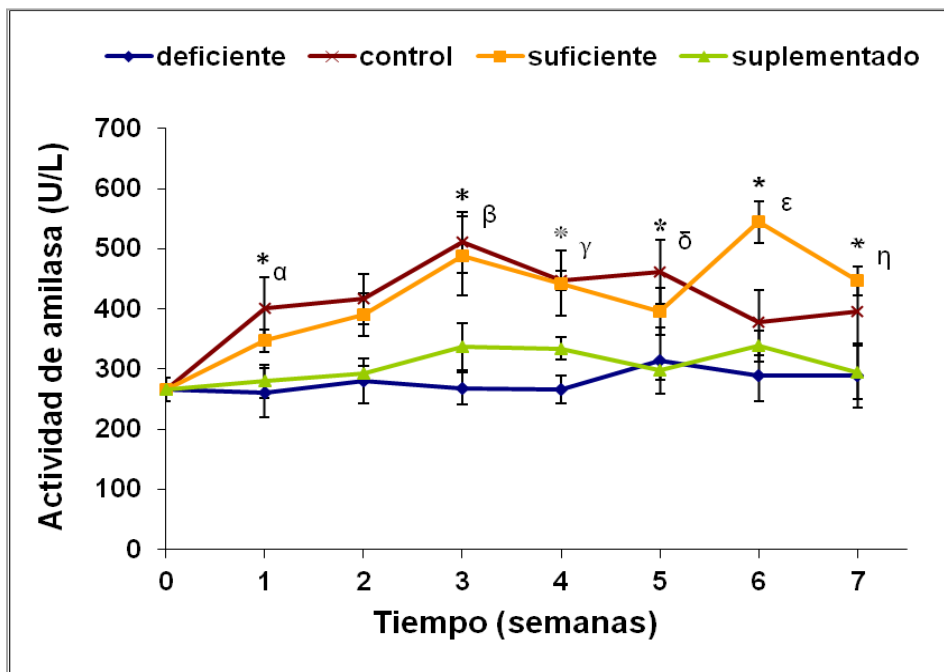


Gráfica 17. Respuesta de glucemia a la absorción de almidón. Valor Promedio  $\pm$  EE. Grupo control, suficiente y deficiente: n=11, Grupo suplementado: n=6.

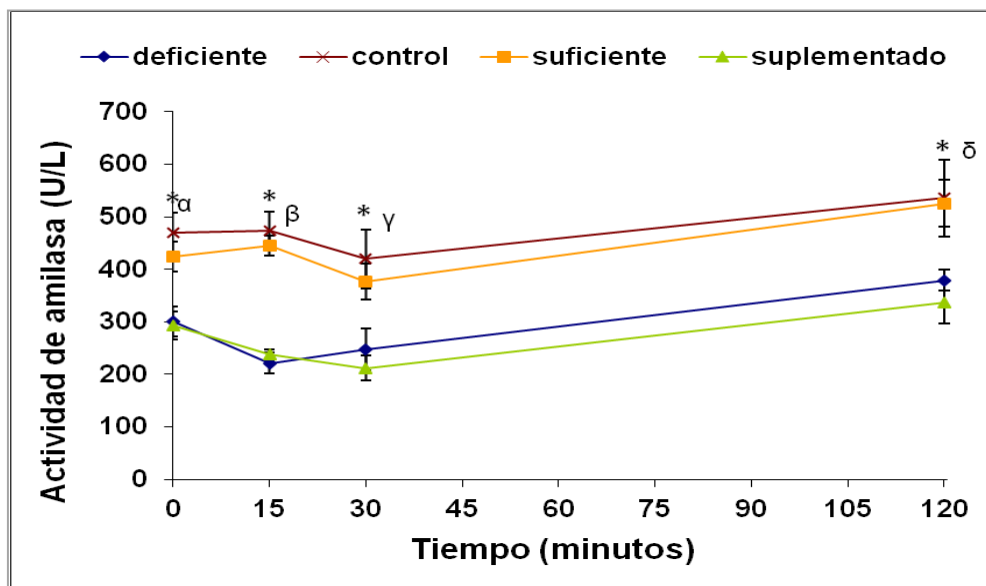
\* Diferencia significativa entre grupo suficiente vs. deficiente y control  $\alpha$  ( $P < 0.001$ ); suficiente vs. control y suplementado  $\beta$  ( $P = 0.004$ ); deficiente vs. suficiente  $\gamma$  ( $P < 0.001$ ) y deficiente vs control, suficiente y suplementado  $\delta$  ( $P < 0.001$ ).

### Actividad de $\alpha$ -amilasa

La actividad de amilasa sérica fue inhibida tanto por la ausencia como por la dosis farmacológica de biotina. La medición de la actividad de  $\alpha$ -amilasa en el suero presentó una analogía entre los grupos deficiente y suplementado; así como entre los grupos suficiente y control; teniendo estos últimos más alta actividad que en los dos primeros (gráfica 18). Este comportamiento se reforzó con la respuesta de la  $\alpha$ -amilasa durante la curva de absorción de almidón, en donde las analogías entre estos dos conjuntos de grupos se ven más claramente (gráfica 19).



Gráfica 18. Actividad de  $\alpha$ -amilasa. Valor promedio  $\pm$  EE, n= 6  
 \*Diferencia significativa entre grupo control y suficiente vs deficiente y suplementado  $\alpha$  ( $P= 0.043$ ),  $\beta$  ( $P= 0.034$ ),  $\gamma$  ( $P= 0.006$ ),  $\delta$  ( $P= 0.029$ ),  $\epsilon$  ( $P= 0.033$ ) y  $\eta$  ( $P= 0.015$ )



Gráfica 19. Actividad de la  $\alpha$ -amilasa en la curva de absorción de almidón. Valor promedio  $\pm$  EE, n= 11

\*Diferencia significativa entre grupo control y suficiente vs deficiente y suplementado  $\alpha$  ( $P= 0.03$ )  $\beta$  ( $P < 0.001$ )  $\gamma$  ( $P= 0.041$ )  $\delta$  ( $P= 0.014$ )



## 10.DISCUSIÓN

En este estudio se exploran por primera vez los efectos de la complementación con almidón en la alimentación con dietas que proporcionan cantidades diferentes de biotina. La discreta cantidad de energía proporcionada por el almidón fue adecuada no sólo para retrasar el arresto en el crecimiento de los ratones deficientes de biotina, sino también para disminuir su intensidad. Aunque es proporcionalmente insignificante la energía que contiene el almidón ingerido, el efecto positivo en la masa corporal del grupo deficiente indica que no existen alteraciones en la digestión y absorción intestinal de hidratos de carbono complejos. Este resultado, en conjunto con los realizados sobre glucosa y proteínas (Gómez T. 2011) así como los de ácidos grasos (López L, 2012), permite afirmar que la falta de ingesta de biotina no provoca arresto en el crecimiento por mala absorción de macronutrientes. Además, está demostrado que el estado deficiente de biotina tampoco involucra menor consumo de alimento (Báez-Saldaña et al., 2009), así que la alteración en el crecimiento obedece a otro mecanismo celular y/o molecular aún desconocido.

El pequeño aporte energético del almidón evitó la hipoglucemia de los ratones deficientes de biotina en condiciones ad libitum observada anteriormente (Gómez T. 2011). De hecho, las magnitudes y dispersiones de la glucemia en estos ratones fueron casi iguales a las del grupo alimentado con la dieta comercial estándar. Sin embargo, este efecto no se presentó en proporción al contenido de biotina en la dieta. Esta acción en conjunto con el aumento en la masa muscular

confirma que la alimentación carente de biotina provoca un mayor requerimiento de energía para compensar la menor actividad de las carboxilasas. Esta opción pareciera ser lógica, aunque el 3% de aporte energético extra por el almidón, no se puede asociar a la disminución del 85% en las actividades de las enzimas PCC y PC (Báez-Saldaña et al. 1998), ni a la corrección del 50% en la glucemia (Gómez T. 2011) o del 20% en la masa corporal; por lo que el mecanismo pudiera estar asociado también a acciones no prostéticas de la biotina como la cantidad de glucógeno almacenado, la actividad de las enzimas ACC1 en hígado y ACC2 en músculo esquelético, el sistema endocrino GH/IGFI (Báez-Saldaña et al. 2009), o la función endocrina y exocrina del páncreas (Larrieta et al. 2011), entre otras posibilidades.

La disponibilidad de almidón en el agua, durante el ayuno prolongado como preparación para la administración oral de almidón permitió que los ratones del grupo suficiente de biotina presentaran niveles 3.8 veces a los obtenidos sin el consumo de almidón (Gómez, T, 2011) alcanzando casi el límite inferior normal; mientras que para los grupos deficiente y suplementado, no hubo diferencia con los valores registrados sin la ingesta de almidón durante el ayuno (Gómez, T, 2011). Durante la curva de glucosa en respuesta a la administración oral de almidón es claro que no hay una relación dosis dependiente, ya que aunque los grupos con las 3 dietas experimentales fueron diferentes en los primeros 30 minutos, la curva de los ratones en el grupo suplementado fue menor a la del grupo suficiente. También llama la atención que los ratones con la dieta comercial tuvieron el mismo valor de glucosa basal que los deficientes, lo cual sugiere la

conveniencia de revisar si la actual cantidad de biotina que contienen las dietas comerciales para roedores en experimentación es la adecuada. La latencia en el incremento de glucosa sérica en el grupo deficiente podría interpretarse como problemas en la digestión, pero es posible también que las mismas células del tubo digestivo estén ávidas de glucosa y la ocupen antes de liberarla a la circulación, además que la mayor demanda de energía por el cerebro o el sistema inmune la capturen tan pronto aparece en el torrente sanguíneo. Con base en estas posibilidades, es necesario realizar los experimentos que puedan comprobarlas. En el humano la absorción de la glucosa proveniente del almidón necesita entre 20 y 120 minutos para ser degradado antes de pasar a la circulación en forma de glucosa (Seal CJ, et al., 2003), mientras que en el ratón dilata 30 minutos (como se observa en el grupo suficiente); lo que concuerda con el conocido metabolismo acelerado de esta especie (The Jackson Laboratory. 2003).

A diferencia de la clara compensación de la glucemia en el grupo deficiente de biotina, el moderado complemento energético del almidón equivalente al 2.75% no modificó la actividad de amilasa sérica. Aunque en este trabajo no se determinó la actividad de esta enzima sin la adición de almidón ya que estudios paralelos sugieren que no cambia por los tratamientos con las 3 dietas experimentales (Carmona A. 2012). Este resultado es novedoso porque no tenemos conocimiento de algún otro estudio que haya explorado la existencia de una interacción entre el consumo de almidón junto con la ausencia o el exceso de biotina en el alimento y la actividad de esta enzima. Hasta donde se sabe, enfermedades como la

pancreatitis aguda reportan una actividad elevada de la amilasa sérica (Wilding P. and Dawson H. F. 1967; Owyang C., 2007; Tenner S, Steinberg W., 2010). Por otra parte, el efecto esperado para la actividad de esta enzima fue el opuesto al encontrado para el grupo deficiente y todavía más inesperado fue el que dosis farmacológicas de biotina provocaran el mismo resultado que para la ausencia de esta vitamina. Se ha determinado que cuando la amilasa pancreática segregada a la sangre produce niveles por encima de los valores normales, este exceso se desecha en la orina (Mackenzie P. Messer M. 1976), por lo que es posible que esto explique los bajos niveles de la actividad de esta enzima presentes en el grupo deficiente y suplementado. Otra explicación se basa en estudios realizados a pacientes propensos a síndromes metabólicos y diabetes, indicando que los bajos niveles de amilasa sérica pueden reflejar alteraciones metabólicas y del metabolismo anormal de glucosa asociados a resistencia a la insulina y/o secreción insuficiente de insulina (Nakajima et al. 2011). Así, es evidente que se requiere la realización de estudios diseñados para dilucidar el mecanismo de las observaciones en la actividad de amilasa sérica tanto en la ausencia como en presencia de dosis farmacológicas de biotina.

Es importante señalar que este pequeño incremento de energía por la adición de un hidrato de carbono complejo tuvo un efecto positivo sobre la glucosa sérica y en el peso corporal, sin obtenerse el mismo resultado cuando, en las mismas condiciones experimentales, se adicionó fructosa en lugar de almidón (Carmona A. 2012); por lo que se propone reconsiderar que un hidrato de carbono complejo proporcione las mismas calorías que uno simple.

El consumo de agua y alimento reportado en este trabajo concuerda plenamente con los datos reportados para cualquier cepa de ratones sin complementación alguna en el agua de uso. Los ratones son animales de hábitos nocturnos de tal manera que aproximadamente el 70% del alimento es consumido durante la oscuridad (Ellacott K., Morton G, 2010). En un ciclo de 24 horas el aporte energético del alimento consumido por ratones macho de 7 a 9 semanas de edad es de 10-12 kcal / g de peso corporal (media de 13 cepas; Jackson Laboratory). En este estudio fue posible corroborar este dato ya que en el aporte energético se encontró entre  $10.5 \pm 0.2$  kcal/g. Con respecto a la ingesta diaria de agua, en un estudio realizado para 28 cepas de ratones macho se reporta un valor promedio de  $5.7 \pm 0.2$  mL/30 g p.c. hasta  $11.4 \pm 0.5$  mL/30 g p.c., n=28; (Bachmanov A. et al., 2002). El consumo de agua para los ratones de este estudio fue de 3-5 mL con un peso promedio de 20 g, valor que corresponde al reportado. Estas equivalencias permiten afirmar por una parte, que el almidón no produce efecto alguno en la percepción de las señales fisiológicas de hambre y sed en los ratones; y por la otra que las acciones descritas se deben específicamente a este hidrato de carbono.

Cuando los ratones son sometidos a un ayuno de 5 horas el consumo de alimento hasta satisfacción (este estudio) es el mismo que para aquellos que no tienen algún complemento en el agua de uso (Coxtinica T. 2012); así que el almidón adicionado en el agua no provoca mayor saciedad.

Con respecto al estudio conductual no se presentó alguna diferencia en las actividades de los ratones para las diferentes dietas. Puesto que los ratones son animales nocturnos y duermen durante el día, sería conveniente realizar este estudio durante el periodo de oscuridad para comparar entre los comportamientos ya observados.

## **11. CONCLUSIONES**

- El complemento del almidón en el agua de uso alivió la hipoglucemia provocada por la deficiencia de biotina.
- No existe una relación dosis-respuesta entre las dietas experimentales o comercial utilizadas en este estudio con los parámetros analizados.
- La deficiencia y suplementación de biotina vinculadas con el almidón inhibieron la actividad de la  $\alpha$ -amilasa.
- La energía proporcionada por el almidón retrasó 2 semanas la interrupción del crecimiento corporal.
- Se requiere revisar la cantidad de biotina que contienen las dietas comerciales para roedores en experimentación.
- La dieta suplementada solamente afectó la actividad de  $\alpha$ -amilasa.
- El almidón de maíz no afecta las señales fisiológicas de hambre y sed.
- La complementación con almidón de maíz no modifica la sensación de saciedad.

## 12. REFERENCIAS

1. Abu-Elheiga L., Brinkley W.R., Zhong L., Chirala S.S., Woldegiorgis G., Wakil S.J. 2000. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proceedings National Academy of Sciences U S A.*; 97(4):1444-1449.
2. Albarracin C.A., Fuqua B.C., Evans J.L., Goldfine I.D. 2008. Chromium Picolinate and Biotin Combination Improves Glucose Metabolism in Treated, Uncontrolled Overweight to Obese Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*; 24: 41–51.
3. Anderson G.H., Woodend D. 2003. Effect of glycemic carbohydrates on short-term satiety and food intake. *Nutrition Reviews*; 61(5 Pt 2):S17-S26.
4. Antonio V. O. 2011. Interacción de la biotina con el sistema endocrino hormona del crecimiento/factor de crecimiento I similar a la insulina (GH/IGF-I). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
5. Aziz A.A., Kenney L.S., Goulet B., Abdel-Aal E. 2009. Dietary Starch Type Affects Body Weight and Glycemic Control in Freely Fed but Not Energy-Restricted Obese Rats. *The Journal of Nutrition*; 139: 1881–1889.
6. Bachmanov A.A., Reed D.R., Beauchamp G.K. and Tordoff M.G. 2002. Food Intake, Water Intake, and Drinking Spout Side Preference of 28 Mouse Strains. *Behavior Genetics*; 32(6): 435–443.
7. Báez-Saldaña A, Díaz G, Espinoza B, Ortega E; 1998. Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 67(3):431-437.

8. Báez Saldaña A. and Ortega E. 2004. Biotin Deficiency Blocks Thymocyte Maturation, Accelerates Thymus Involution, and Decreases Nose-Rump Length in Mice. *The Journal of Nutrition*; 134(8):1970-1977.
9. Báez-Saldaña A., Camacho I., Espinoza J., Neri T., Rojas A., Guerra C., Larrieta E., Vital P., Díaz G., Chavira R., Fernández C. 2009. Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system. *Steroids*; 74(10-11): 863-869.
10. Báez-Saldaña A. Gutiérrez-Ospina G. Chimal-Monroy J. Fernandez-Mejia C. Saavedra R. 2009. Biotin deficiency in mice is associated with decreased serum availability of insulin-like growth factor-I. *European Journal of Nutrition*; 48(3):137-144.
11. Bauer J. 1986. *Métodos e Interpretacion de Análisis Clínicos*. Reverte, Barcelona. Pp. 648-649.
12. Behall K.M., Howe J.C. 1995. Effect of long-term consumption of amylose vs amylopectin starch on metabolic variables in human subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 61:334-40.
13. Benavides F.J. & Guénet J-L. 2003. *Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones*. Universidad de Alcalá. Laboratory Animals Ltd. SECAL. Madrid.
14. Campbell N. A., Reece J. B. 2007. *Biología*. Séptima Edición. Médica Panamericana Madrid, España pp. 956.
15. Carmona A. 2012. Efecto de la complementación con fructosa en ratones con desajuste en el metabolismo energético por biotina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.



16. Chatterjee N.S., Kumar C.K., Ortiz A., Rubin S.A., Said H.M. 1999. Molecular mechanism of the intestinal biotin transport process. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*; 277(46): C605-C613.
17. Chauhan J. and Dakshinamurti K. 1991. Transcriptional Regulation of the Glucokinase Gene by Biotin in Starved Rats. *The Journal of Biological Chemistry*; 266(16):10035-10038.
18. Chih-Ya Cheng, Chen-Jee Hong, Shih-Jen Tsai. 2005. Effects of subchronic clozapine administration on serum glucose, cholesterol and triglyceride levels, and body weight in male BALB/c mice. *Life Sciences*; 76(19):2269-2273.
19. Coxtinica F. T. 2012. Tesis de Licenciatura en proceso. Facultad de Química. UNAM.
20. Dakshimamurti K., Modi V.V., Mistry S.P. 1968. Some aspects of carbohydrates metabolism in biotin-deficient rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; 127(2): 396– 400.
21. Dakshinamurti K., Hong H.C. 1970. Regulation of key hepatic glycolytic enzymes. *Enzymologin Biologica et Clinica*; 11(5):423-428.
22. Dakshimamurti K. 1994. Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*; 132(2):127-132.
23. Del Vecchio G. 2006. Determinación de Somatotropina y del factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-I) en ratones deficientes de biotina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
24. Dorosz, 2001. *Tabla de vitaminas, sales minerales, oligoelementos*. 6th Edición. Hispano- Europea. Barcelona España pp. 42.

25. Ellacott K. L.J., Morton G.J., Woods S.C., Tso P. and Schwartz M. W. 2010. Assessment of Feeding Behavior in Laboratory Mice. *Cellular Metabolism*; 12:10-17.
26. Festing M. F.W. 1993. FRAR course on laboratory approaches to aging. Genetic quality control in laboratory rodents. *Aging Clinical and Experimental Research*; 5(4): 309- 315.
27. Friedrich W. 1988. *Vitamins*. Walter de Gruyter. Berlin New York. Pp.753.
28. Gómez S. T. 2011. Absorción intestinal de glucosa y actividad enzimática de amilasa en estado de deficiencia de biotina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
29. Granfeldt Y., Liljeberg H., Drews A., Newman R., and Björck I., 1994. Glucose and insulin responses to barley products: influence of food structure and amylose-amylopectin ratio. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 59: 1075-1082.
30. Green N.M. 1975. Avidin. *Advances in Protein Chemistry*; 29:85-133.
31. Guyton A. M.D., Hall J. Ph.D. 1997. Tratado de Fisiología Médica. Interamericana Mc Graw-Hill. México. Pp. 903-915.
32. Henry R. J. & Chiamori N. 1960. Study of the saccharogenic method for the determination of serum and urine amylase. *Clinical Chemistry*. 6(5): 434-452
33. Hymes J, Wolf B. 1996. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clinica Chimica Acta*; 255: 1-11.

34. Karn R.C., Malacinski G.M. 1978. The comparative biochemistry, physiology, and genetics of animal  $\alpha$ -amylases. *Advances in Comparative Physiology and Biochemistry*, 7: 1–103.
35. Larrieta E., Lazo de la Vega-Monroy M.L., Vital P., Aguilera A., German M. S., El Hafidi M., Fernandez-Mejia C. 2012. Effects of biotin deficiency on pancreatic islet morphology, insulin sensitivity and glucose homeostasis. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23:392-399.
36. Lehninger A. 2009. Principios de Bioquímica. 5 Edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. Cap XV.
37. Linear Chemicals S.L. Ficha Técnica:  $\alpha$ -amilasa MR. Método enzimático colorimétrico cinético. Fecha de Consulta: Julio 2012. Disponibilidad: <http://www.linear.es/ficheros/archivos/1107005C.pdf>
38. López L. 2012. Tesis de Licenciatura en proceso. Facultad de Química. UNAM.
39. Mackenzie P. and Messer M. 1976. Studies on the Origin and Excretion of serum  $\alpha$ -amylase in the Mouse. *Comparative Biochemistry and Physiology*; 54:103-106.
40. Maebashi M., Makino Y., Furukawa Y. 1993. Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*; 14: 211–218.
41. Maltais L.J., Blake J.A., Eppig J.T., Davisson M.T. 1997. Normas y directrices para la nomenclatura genética del ratón: una versión condensada. Comité Internacional de Nomenclatura Genética Estandarizada para ratones. *Genómica* 45(2): 471-476.

42. Mathews K.C., van Holde E.K., Aher G.K. 2004. *Bioquímica*. 3th Edición. Pearson Addison Wesley. Madrid España.
43. Matschinsky F.M. 2002. Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes*: 51(3):S394–S404.
44. Matschinsky F.M. 2005. Glucokinase, glucose homeostasis, and diabetes mellitus. *Current Diabetes Reports*; 5(3):171–176.
45. Melo Ruíz V, Cuamatzi Tapia O; 2007. *Bioquímica de los procesos metabólicos*. 2ª Edición. Reverté S.A. México. Pp. 341-343.
46. Mendoza Patiño N. 2008. *Farmacología médica*. México: Médica Panamericana. Facultad de Medicina. UNAM. Pp. 479-481.
47. Nagy A., Barta A., Varga G., Zelles T. 2001. Changes of salivary amylase in serum and parotid gland during pharmacological and physiological stimulation. *Journal of Physiology - Paris* 95:141–145.
48. Nakajima K., Nemoto T., Muneyuki T., Kakei M., Fuchigami H., Munakata H. 2011. Low serum amylase in association with metabolic syndrome and diabetes: A community-based study. *Cardiovascular Diabetology*; 10:34-42.
49. Owyang C. 2007. Pancreatitis. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Medicine*. 23rd ed. Pa: Saunders Elsevier. Philadelphia. chap 146.
50. Pacheco D. 2004. Estructura, función y metabolismo de los carbohidratos. En: *Bioquímica Médica*, primera edición. Limusa. México. Pp. 235-324.
51. Palavecino N. 2002. *Nutrición para el alto rendimiento*. Eudeba. Buenos Aires, Argentina. Cap. VII.

52. Parra M. M. 2011. Alimentación con dietas que aportan distintas cantidades de biotina. Acciones agudas sobre las carboxilasas de músculo esquelético. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
53. Proctor G.B., Asking B., Garrett J.R. 1990. Factors influencing the movement of parotid amylase into the serum of rats on feeding. *Experimental Physiology*; 75: 709–712.
54. Proctor G.B., Asking B., Garrett J.R. 1991. Serum amylase of non parotid and non-pancreatic origin increases on feeding in rats and may originate from the liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*; 98B(4): 631–635.
55. Romero-Navarro G., Cabrera-Valladares G., German M.S., Matschinsky F.M., Velazquez A., Wang J., Fernandez-Mejia C. 1999. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin deficient rats. *Endocrinology*; 140(10):4595– 4600.
56. Seal C.J, Daly M.E., Thomas L.C., Bal W., Birkett A.M., Jeffcoat R., Mathers J.C. 2003. Postprandial carbohydrate metabolism in healthy subjects and those with type 2 diabetes fed starches with slow and rapid hydrolysis rates determined in vitro. *British Journal of Nutrition*; 90(5):853-864.
57. Stanbio Laboratory. Ficha Técnica: Stanbio  $\alpha$ -amilasa. Distribuido por Lab Licon. Fecha de Consulta: Julio 2012. Disponibilidad: <http://cyrlab.com.mx/Portals/0/Insertos/Licon/amilasa.pdf>
58. Stryer L., Berg, M.J., Tymoczko L.J.; 2002. *Bioquímica*. 5th Edición. Reverté, S.A. Barcelona España.
59. Taggart R., Starr C. 2004. Biología: *La unidad y diversidad de la vida*. 10° Edición. International Thomson Editores S. A. de C.V. México. Pp. 639.

60. Tebár Massó F.J., Escobar Jiménez F. 2009. *La Diabetes Mellitus En La Práctica Clínica*. Médica Panamericana. Buenos Aires, Madrid.
61. Tenner S, Steinberg WM. 2010. Acute pancreatitis. En: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, eds. *Sleisenger y Fordtran's Gastrointestinal y Liver Disease*. 9th ed. Pa: Saunders Elsevier: chap 58. Philadelphia.
62. The Jackson Laboratory. 2003. *Jax Mice*. Mouse Locus Catalog. Bar Harbor, Maine. USA. Disponibilidad: <[http://www.informatics.jax.org/searches/marker\\_form.shtml](http://www.informatics.jax.org/searches/marker_form.shtml)> Fecha de consulta: Dic. 2011.
63. Tolonen Matti; 1995. *Vitaminas y Minerales en la Salud y en la Nutrición*. Acribia S.A. Zaragoza España. Pp. 176-177.
64. Voet D., Voet J. G., Pratt C; 2005. *Fundamentos de Bioquímica*. 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Pp. 605-606.
65. Vilches-Flores A., Fernández-Mejía C. 2005. Efecto de la biotina sobre la expresión genética y el metabolismo. *Revista de Investigación Clínica*; 57(5):716-724.
66. Vilches-Flores A., Tovar A.R., Marin-Hernandez A., Rojas-Ochoa A., Fernandez-Mejia C. 2010. Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *Journal of Nutritional Biochemistry*; 21(7):606-612.
67. Wallace J.C, Jitrapakdee S., Chapman-Smith A. 1998. Pyruvate carboxylase. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*; 30(1):1-5.

68. Wilding P. and Dawson H. F. 1967. Human Serum Amylase: a Brief Biochemical Evaluation. *Clinical Biochemistry*; 1:101-109.
69. Wolf B.G., Heard G.S. 1989 Disorders of biotin metabolism: En: Scriver CRA, Beaudet L, Sly WS, Valle D (eds). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2083-2103.
70. Zhang H, Osada K, Sone H, Furukawa Y. 1997. Biotin administration improves the impaired glucose tolerance of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*; 43(3):271-80.

## ANEXO

### Material

- Probetas de 100mL
- Vaso de precipitados de 250mL
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Tubos Eppendorf de 0.6 mL
- Tubo Falcon de 50mL con Sevoflurano
- Capilares de vidrio
- Micropipetas de 20 $\mu$ L, 200 $\mu$ L y 1000 $\mu$ L.
- Puntas de plástico
- Microplaca para EIA/RIA Costar
- 11. Bolsas para residuos biológicos
- 12. Pinzas y tijeras de cirugía
- 13. Solución de PBS
- 14. Nitrógeno Líquido
- 15. Solución salina al 0.9%.
  - Solución de almidón al 2%
  - Solución de almidón al 4%
- Balanza digital
- Centrífuga Eppendorf 5415R
- Espectrofotómetro: Lector de Microplacas Biotek EL808