



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BIOTINA EN RATAS:
ESTUDIO MEDIANTE ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

KARLA ITZEL PINEDA NÚÑEZ

DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. ISABEL IBARRA GONZÁLEZ



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre**

VOCAL: **Profesor: José Landeros Valdepeña**

SECRETARIO: **Profesor: Isabel Ibarra González**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Félix Morales Flores**

2° SUPLENTE: **Profesor: Elizabeth Reyes López**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO Y TAMIZ, INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

UNIDAD DE GENÉTICA DE LA NUTRICIÓN, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

M. en C. Isabel Ibarra González

ASESOR DEL TEMA

Karla Itzel Pineda Núñez

SUSTENTANTE

Agradezco el apoyo recibido a través del proyecto DGAPA-PAPITT-IN202817.

Índice

Abreviaturas	6
Resumen	9
Antecedentes.....	10
Descubrimiento	10
Funciones de la Biotina	11
Carboxilasas dependientes de biotina.....	12
Metabolismo: Ciclo de la biotina.....	16
Fuentes de biotina.....	17
Deficiencia de Biotina.....	20
Errores innatos del metabolismo de biotina	20
Deficiencia de holocarboxilasa sintetasa	22
Deficiencia de biotinidasa	22
Carnitina y β -oxidación.....	23
Metabolómica	25
Metabolómica no dirigida	26
Metabolómica dirigida	27
Espectrometría de masas	27
Enfoque estadístico en la metabolómica.....	28
Justificación	29
Hipótesis.....	29
Objetivos.....	29
Procedimiento experimental	31
Clasificación del estudio.....	31

Población	31
Análisis de aminoácidos y acilcarnitinas	32
<i>Obtención de muestras</i>	32
<i>Análisis de aminoácidos y acilcarnitinas</i>	32
<i>Descripción de la metodología</i>	32
<i>Análisis estadístico</i>	32
Resultados	35
Pruebas univariadas	35
Pruebas multivariadas	47
<i>No supervisadas</i>	47
<i>Supervisadas</i>	50
Análisis de vías metabólicas	50
Discusión	53
Conclusiones	56
Perspectivas	57
Referencias	58

Abreviaturas

ACC1	Acetil-CoA carboxilasa isoforma 1
ACC2	Acetil-CoA carboxilasa isoforma 2
ADP	Adenosín difosfato
AMM	Acidemia metilmalónica
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por adenosín monofosfato
ANOVA	Análisis de la varianza de una vía (One-way Analysis of Variance)
AP	Acidemia propiónica
ARG	Arginina
ATP	Adenosín trifosfato
Bt	Biotina
BtD	Deficiente de biotina
BtD+C	Deficiente de biotina suplementado con carnitina
C0	Carnitina libre
C10	Decanoilcarnitina
C10:1	Decenoilcarnitina
C12	Dodecanoilcarnitina
C14	Tetradecanoilcarnitina
C14:1	Tetradecenoilcarnitina
C14:2	Tetradecadienoilcarnitina
C16	Palmitoilcarnitina
C18:1	Oleilcarnitina
C2	Acetilcarnitina

C3	Propionilcarnitina
C4	Butirilcarnitina
C4OH	3-Hidroxi-butirilcarnitina
C5	Isovalerilcarnitina
C5OH	3-Hidroxi-isovalerilcarnitina
C6	Hexanoilcarnitina
C8	Octanoilcarnitina
CIT	Citrulina
CoA	Coenzima A
EIM	Errores innatos del metabolismo
EIMi	Errores innatos del metabolismo intermedio
Fisher's LSD	Fisher's Least Significant Difference
FDR	False Discovery Rate
HCO ₃ ⁻	Anión bicarbonato
HLCS	Holocarboxilasa sintetasa
LEU	Leucina
MCC	3-Metilcrotonil-CoA carboxilasa
MET	Metionina
Mg ²⁺	Ion magnesio
MS	Espectrometría de masas
MSMS	Espectrometría de masas en tándem
ORN	Ornitina
PC	Piruvato carboxilasa
PCA	Análisis de componentes principales (Principal Component Analysis)

PCC	Propionil-CoA carboxilasa
PHE	Fenilalanina
Pi	Fosfato inorgánico
PKA	Proteína quinasa A
PLSDA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares Discriminant Analysis)
PPi	Pirofosfato inorgánico
TYR	Tirosina
VAL	Valina
VIP	Variable de importancia en la proyección (Variable Importance in Projection)

Resumen

Es conocido que los nutrientes pueden interactuar con rutas metabólicas en varios niveles, un ejemplo es la biotina (vitamina B7) que, además de participar como grupo prostético de algunas carboxilasas que desempeñan un papel importante en la regulación del metabolismo energético, también interviene en inmunidad celular, crecimiento, desarrollo fetal, expresión génica, señalización celular y estructura de la cromatina. Debido a la importancia de esta vitamina, se realizó este estudio con el objetivo de identificar las diferencias en el metaboloma de ratas deficientes de biotina, ratas control y ratas deficientes suplementadas con carnitina. El tratamiento duró 4 semanas, tras las cuales se tomaron muestras de sangre en papel filtro para determinar las concentraciones de 8 aminoácidos y 17 acilcarnitinas mediante espectrometría de masas en tándem. Todos los metabolitos estudiados mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$, $FDR < 0.05$) entre los grupos. El análisis de componentes principales reveló la existencia de 3 grupos definidos por su metaboloma. Catorce metabolitos fueron responsables de la diferencia observada entre el grupo deficiente de biotina y el control, la 3-hidroxiisovalerilcarnitina y la propionilcarnitina se encontraron elevadas, otros 12 metabolitos estuvieron disminuidos en el grupo deficiente. La deficiencia de biotina disminuye el flujo de la β -oxidación, y la suplementación con carnitina confirió una recuperación metabólica parcial.

Antecedentes

Descubrimiento

Originalmente, la biotina fue reconocida como un factor de crecimiento microbiano. Eugene Wildiers, en 1901, sugirió que las levaduras necesitaban de una sustancia orgánica accesoria, la cual llamo "Bios". Quince años después, W. G. Bateman reportó que las ratas se enfermaban cuando ingerían huevo crudo en la dieta, aun cuando el huevo era inocuo. Margaret Averil Boas, en 1927, reportó que cuando las ratas eran alimentadas con una dieta que incluía huevo como fuente de proteína éstas desarrollaban dermatitis severa, alopecia, posturas anormales tipo canguro (atribuidas a espasticidad) y, en última instancia, la muerte a las 6 semanas; la patología recibió el nombre de "Lesión por clara de huevo" (egg white injury). Posteriormente, ella misma encontró una sustancia presente en levadura e hígado crudo que era capaz de curar dicha lesión, al cual denominó *Factor Protector X*. Los trabajos siguientes fueron a cargo de Franklin Allison, Sam Hoover y Dean Burk, quienes describieron un factor de crecimiento accesorio que aislaron de la yema de huevo, el cual era necesario para el crecimiento de *Rhizobium*; nombraron a este factor "Coenzima R" porque pensaban que era un cofactor para la respiración. En 1936, Fritz Kögl y su alumno Benno Tönnis lograron aislar una sustancia cristalina de la yema de huevo de pato, le denominaron "Biotina" porque creían que era uno de los componentes del factor "Bios". Un año más tarde, en 1937, Paul György y colegas, descubrieron la vitamina H (del alemán Haut, en español piel), la cual era capaz de prevenir la *lesión por clara de huevo*. Estudios posteriores determinaron que la lesión por clara de huevo se daba únicamente cuando

la biotina se unía a la avidina, una proteína tetramérica que presenta cuatro sitios de unión a la biotina.¹

Vincent du Vigneaud y sus colaboradores descubrieron la estructura de la biotina, la cual consta de dos anillos: uno contiene un grupo ureído (N-CO-N) y el otro un grupo tetrahidrotiofeno unido a una cadena de ácido valérico (Figura 1). Debido a su estructura con tres centros quirales, pueden existir ocho estereoisómeros de biotina; sin embargo, únicamente la D-biotina es biológicamente activa.

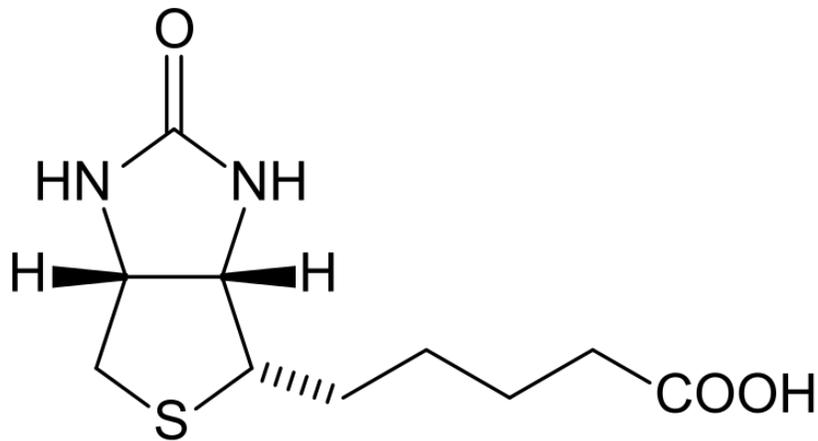


Figura 1. Estructura de la biotina

Funciones de la Biotina

La biotina actúa como grupo prostético de las enzimas carboxilasas, además tiene un extenso repertorio de efectos sobre otros procesos tales como inmunidad celular,^{2,3,4} metabolismo de glucosa^{5,6} y en el desarrollo fetal.^{7,8} Adicionalmente a su rol metabólico, la biotina tiene un importante papel en la expresión génica, existen abundantes reportes acerca de un gran número de genes que parecen ser afectados por el status de biotina.^{9,10}

Carboxilasas dependientes de biotina

La biotina es necesaria para llevar a cabo las reacciones en las que un grupo carboxilo es transferido a una molécula aceptora mediante una de las cuatro carboxilasas dependientes de biotina: piruvato carboxilasa (PC), 2 isoformas de acetil-CoA carboxilasa (ACC1 y ACC2), propionil-CoA carboxilasa (PCC) y 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC). Estas enzimas dependientes de biotina están involucradas en gluconeogénesis (PC), síntesis de ácidos grasos (ACC1), oxidación de ácidos grasos (ACC2), metabolismo de algunos aminoácidos y degradación de ácidos grasos de cadena ramificada y de cadena impar (PCC) y metabolismo de leucina (MCC). Todos ellos involucrados en procesos energéticos como se puede ver en la Figura 2.

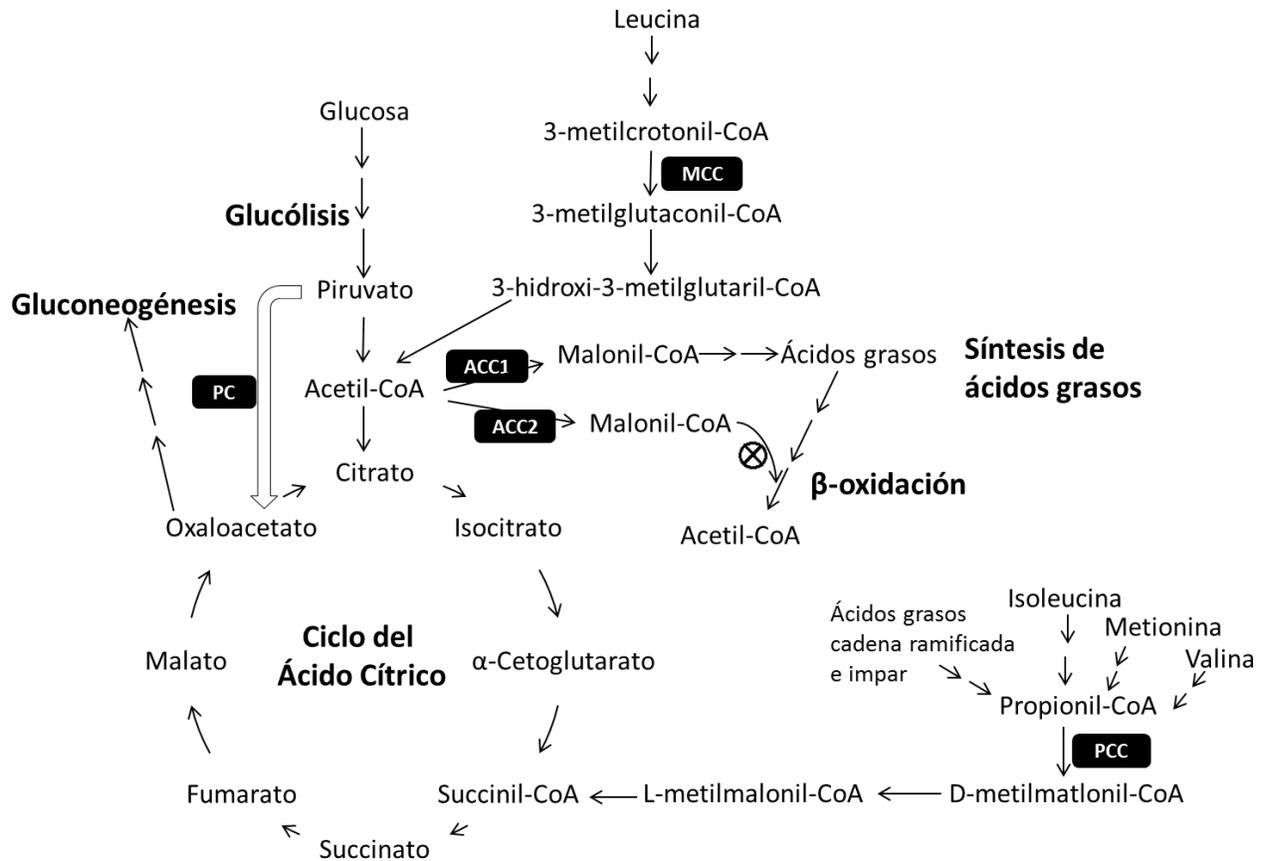
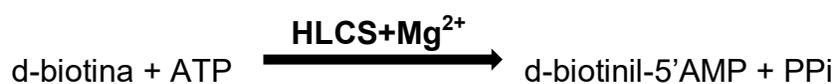


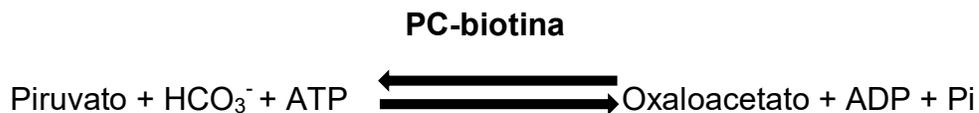
Figura 2. Rol de las carboxilasas dependientes de biotina en procesos energéticos: gluconeogénesis (piruvato carboxilasa, PC), metabolismo de leucina (3-metilcrotonil-CoA carboxilasa, MCC), metabolismo de aminoácidos y ácidos grasos (propionil-CoA carboxilasa, PCC), síntesis (acetil-CoA carboxilasa, ACC1) y oxidación de ácidos grasos (acetil-CoA carboxilasa, ACC2).

Las carboxilasas son sintetizadas como apoenzimas que se activan cuando la biotina se une covalentemente al grupo ϵ -amino de un residuo de lisina en el sitio activo. El proceso mediante el cual se forma la holoenzima se conoce como biotinilación y requiere que la holocarboxilasa sintetasa (HLCS) catalice la reacción de unión entre la biotina y cada una de las apocarboxilasas. La biotinilación de las apocarboxilasas requiere la activación de biotina por medio de ATP, con lo cual se forma el intermediario biotinil-adenilato. Posteriormente, el grupo biotinilo es transferido a la apoenzima para formar la holoenzima. La reacción ocurre en dos pasos de la siguiente manera:¹¹



La PC (EC 6.4.1.1) es la enzima encargada de catalizar la conversión de piruvato a oxaloacetato, paso crucial para reponer intermediarios del ciclo de Krebs y catalizar la primera etapa de la gluconeogénesis. Fue descubierta en 1959 por Utter y Keech.¹² Está presente en bacterias, hongos, plantas, vertebrados e invertebrados. En las células eucariontes (excepto en hongos filamentosos y levaduras), la PC se localiza en la mitocondria.

La disminución en la actividad de la PC ocasiona una disminución en la secreción de insulina estimulada por glucosa, por lo que se ha llegado a relacionar la actividad y la regulación de la PC con la incidencia de Diabetes Tipo 2.¹³



La ACC (EC 6.4.1.2) cataliza la conversión de acetil-CoA a malonil-CoA. En mamíferos, existen dos isoformas: ACC1 y ACC2. La ACC1 se localiza en el citosol y sintetiza malonil-CoA para la formación de ácidos grasos, por lo que se encuentra principalmente en tejidos lipogénicos como hígado, tejido adiposo y glándulas mamarias.¹⁴ Por el contrario, la ACC2 se encuentra principalmente en la mitocondria y sintetiza al malonil-CoA para inhibir la β -oxidación, por lo que su expresión es mayor en músculo esquelético y corazón. Por lo tanto, las ACCs tienen un papel clave en la síntesis y metabolismo de ácidos grasos.

La actividad de las ACCs en mamíferos es estimulada por el ácido cítrico; inhibida por acil-CoA saturados de cadena larga e inactivada mediante fosforilación, especialmente por acción de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y la proteína quinasa A (PKA).¹⁵



La PCC (EC 6.4.1.3) cataliza la conversión de propionil-CoA a D-metilmalonil-CoA. En mamíferos se encuentra en la matriz mitocondrial y es activada por cationes monovalentes como K^+ , NH_4^+ , Cs^+ , entre otros.¹⁶ La PCC es crucial para el catabolismo de isoleucina, valina, metionina y ácidos grasos de cadena ramificada e impar.

PCC-biotina



La MCC (EC 6.4.1.4) cataliza la conversión de 3-metilcrotonil-CoA a 3-metilglutaconil-CoA. Es esencial para el catabolismo de leucina en la mayoría de los organismos. La MCC se localiza en la matriz mitocondrial en eucariotes.

MCC-biotina



Metabolismo: Ciclo de la biotina

La biotina es importante para el metabolismo de todos los organismos, pero no todos son capaces de sintetizarla; las células animales dependen de la ingesta de biotina de los alimentos y del aporte de la microbiota intestinal para cumplir con los requerimientos de esta vitamina. Sin embargo, la biotina está presente en muy bajas concentraciones en la naturaleza, poniendo en riesgo la homeostasis celular. Para compensar esta situación, los mamíferos han desarrollado un eficiente ciclo de la biotina para asegurar su suplemento y adecuada utilización (Figura 3).

La activación de las carboxilasas dependientes de biotina se lleva a cabo gracias a la actividad de la holocarboxilasa sintetasa, formando primero un compuesto intermediario (d-biotinil-5-AMP). Las holocarboxilasas, después de efectuar sus funciones, son degradadas a péptidos en el intestino delgado para ser absorbidos a través del epitelio intestinal. En este proceso catabólico, la biotina es recuperada y liberada de la biocitina

(péptido pequeño en el que se encuentra la vitamina) por acción de la biotinidasa. La biotinidasa corta específicamente la unión del péptido entre la biotina y el grupo ϵ -amino del residuo de lisina, dejando a la vitamina libre para su reutilización.⁵

Fuentes de biotina

La biotina se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos, tanto en su forma libre como biocitina, en concentraciones bajas. Entre los alimentos que son un buen aporte de esta vitamina se encuentran: hígado y huevo; en cambio, son fuentes pobres de biotina: los granos de cereales, algunos vegetales, y frutas.¹⁶ La biotina es un compuesto termoestable, por lo que la cocción de los alimentos no la desnaturaliza.

De acuerdo con *the Food and Nutrition Board*, la Ingesta Diaria Recomendada de biotina tiene variaciones de acuerdo con la edad, sin llegar a tener diferencias dependiendo del sexo. Las cantidades requeridas son bajas, pues no supera los 35 μg al día (Tabla 1).

No se ha reportado toxicidad asociada a la ingesta de biotina, incluso en dosis farmacéuticas, las cuales son del orden de 5-20 mg diarios.¹⁷

Se han validado tres medidas como indicadores de biotina:

1. Alta excreción del ácido 3-hidroxi-isovalérico (refleja actividad disminuida de MCC).
2. Baja excreción de biotina urinaria.
3. Actividad de PCC en linfocitos de sangre periférica.

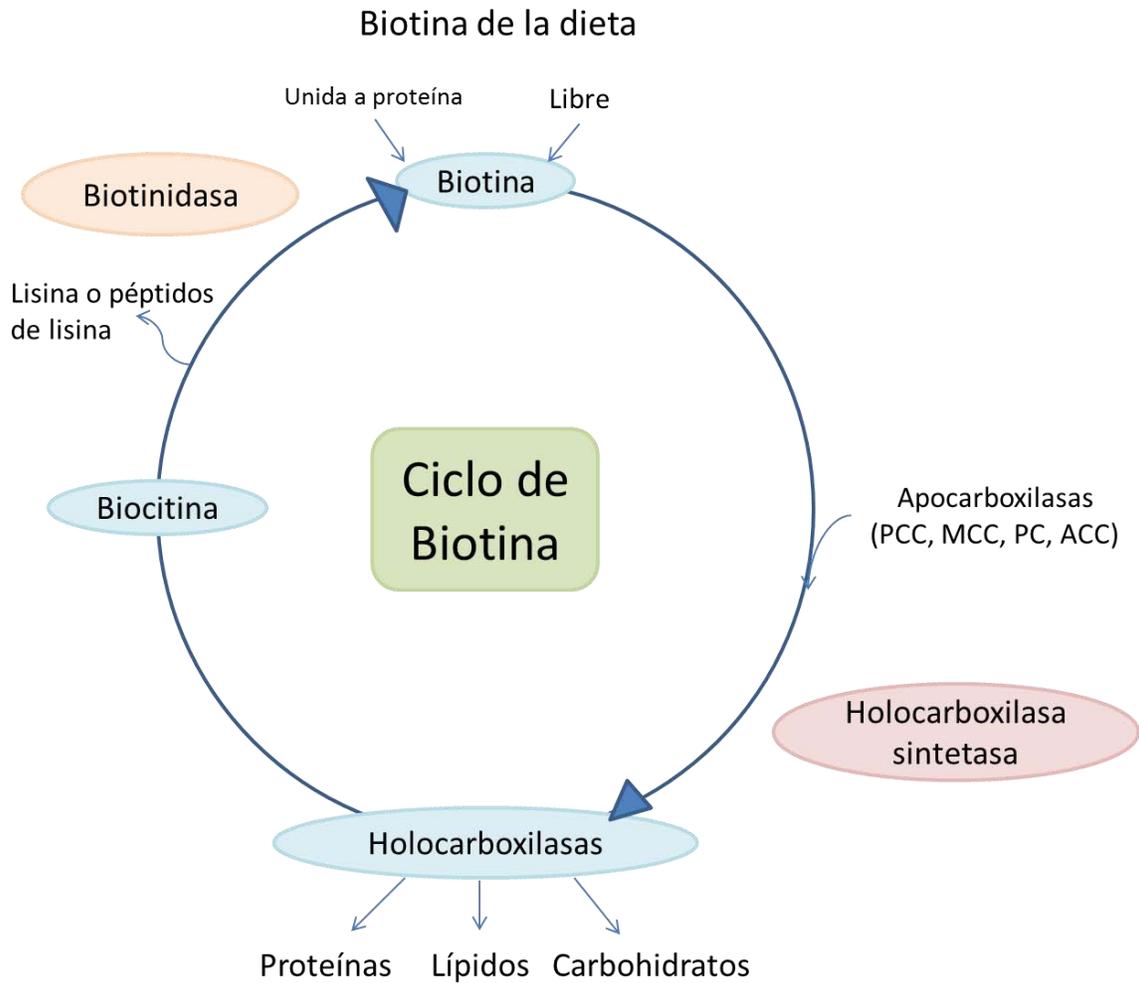


Figura 3. Ciclo de la Biotina. La biotina ingerida o adquirida de la microbiota intestinal activa las apocarboxilasas mediante la holocarboxilasa sintetasa; las holoenzimas llevan a cabo importantes funciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. La biotinidasa es la enzima que libera a la biotina de la biocitina, para reciclarla.

Tabla 1. Ingesta Diaria Recomendada de biotina por etapa de vida y en pacientes con errores innatos del metabolismo (EIM).¹⁸

<i>Etapa de vida</i>	<i>Edad</i>	<i>Ingesta recomendada ($\mu\text{g}/\text{día}$)</i>
Infantes	0 a 6 meses	5
	6 a 12 meses	6
Niños	1 a 3 años	8
	4 a 8 años	12
	9 a 13 años	20
Adolescentes	14 a 18 años	25
Adultos	Mayores de 18 años	30
Embarazo	14 a 50 años	30
Lactancia	14 a 50 años	35
EIM	Todas	5-20 mg/día

Deficiencia de Biotina

La deficiencia severa de biotina es muy rara, sin embargo, se ha reportado deficiencia de biotina en pacientes con algunos errores innatos del metabolismo, terapia a largo plazo con agentes anticonvulsivos, nutrición parenteral (cuando no es debidamente suplementada con esta vitamina), desnutrición y personas que ingieren grandes cantidades de huevo crudo.¹⁹ Se ha llegado a presentar deficiencia marginal de esta vitamina en mujeres embarazadas, personas que llevan una dieta vegetariana y personas con alcoholismo crónico.^{20,21}

Algunas manifestaciones clínicas que se dan cuando hay deficiencia de biotina son: dermatitis, conjuntivitis, alopecia, ataxia, hipotonía, acidosis láctica, convulsiones, infecciones cutáneas y retraso en el desarrollo. En algunos casos se ha llegado a reportar depresión, letargia, alucinaciones y parestesia en extremidades.

Errores innatos del metabolismo de biotina

Los errores innatos del metabolismo son un grupo heterogéneo de desórdenes causados por el defecto de una enzima en una ruta metabólica, llevando a la alteración del metabolismo y la acumulación de moléculas tóxicas.²² En el metabolismo de biotina, se llegan a presentar dos desórdenes autosómicos recesivos (Figura 4): deficiencia de biotinidasa y deficiencia de holocarboxilasa sintetasa; esta última suele presentarse durante el periodo neonatal (early-onset), mientras que la deficiencia de biotinidasa lo hace durante la juventud (late-onset); sin embargo, el periodo de inicio de síntomas es muy variable.²³ Ambos desórdenes llevan a la deficiencia de la actividad en las carboxilasas dependientes de biotina y se manifiestan comúnmente con acidosis

metabólica asociada con anomalías neurológicas y trastornos de la piel, ya sea erupción cutánea y/o alopecia.

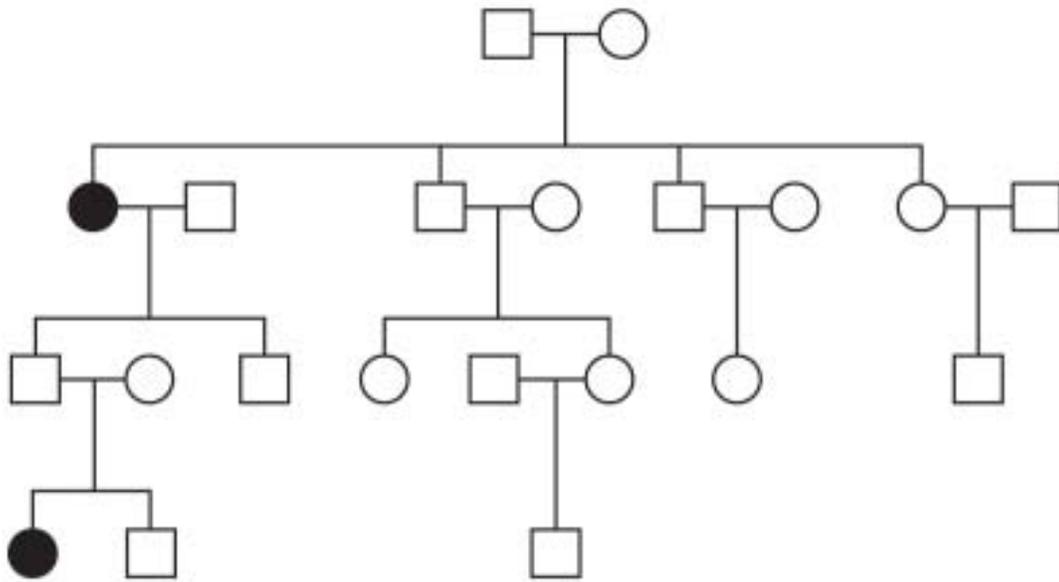


Figura 4. Patrón de herencia de una enfermedad autosómica recesiva

Deficiencia de holocarboxilasa sintetasa

Previamente se mencionó que la holocarboxilasa sintetasa (HLCS) se encarga de unir covalentemente a la biotina con las cuatro carboxilasas dependientes de esta vitamina para activarlas y que sean capaces de llevar a cabo sus funciones.

La deficiencia de HLCS [OMIM 253270] es una enfermedad que se trata fácilmente con biotina. Lo importante es diagnosticarla para evitar los síntomas típicos de esta enfermedad que se presenta en el periodo neonatal o en la infancia: acidosis metabólica, hiperamonemia, taquipnea, erupciones cutáneas, problemas de alimentación, hipotonía, convulsiones, retraso en el desarrollo, alopecia y coma.²⁴

Deficiencia de biotinidasa

La deficiencia de biotinidasa [OMIM 253260] es una enfermedad que puede presentarse en dos tipos: profunda o parcial. La profunda se define como aquella con una actividad sérica media menor al 10%, mientras que la parcial es aquella con actividad sérica media entre el 10 y el 30%.²⁵ Se han reportado más de 165 mutaciones en el gen de biotinidasa que causan la enfermedad.²⁶ La gravedad de los síntomas tiene un factor genotipo-fenotipo altamente variable.

Si los niños que padecen esta enfermedad en modalidad profunda no son tratados, pueden presentar uno o más de los siguientes síntomas entre la semana y los 10 años de vida: hipotonía, convulsiones, erupciones cutáneas escamosas, alopecia, problemas respiratorios (hiperventilación, estridor laríngeo y/o apnea), conjuntivitis, candidiasis, ataxia, retraso en el desarrollo, pérdida de cabello y problemas de visión.²⁷

A los pacientes se les suplementa con dosis farmacológicas de biotina para disminuir los síntomas, pero el daño previo es irreversible.²⁸

Carnitina y β -oxidación

La carnitina (ácido γ -trimetilamino- β -hidroxibutúrico) es una amina cuaternaria (Figura 5) que fue descubierta en un extracto de músculo en 1905.²⁹

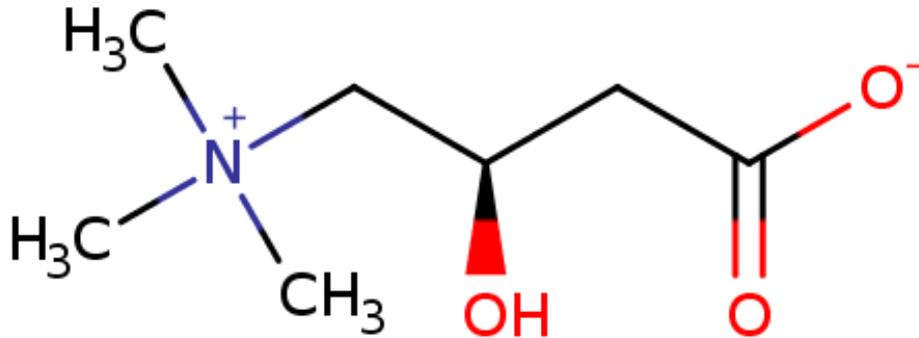


Figura 5. Estructura de la L-carnitina.

Además de su función en la transferencia de los ácidos grasos de cadena larga hacia la mitocondria para la β -oxidación, la carnitina se une a residuos acil-CoA derivados del metabolismo intermedio de los aminoácidos y ayuda en su eliminación. Este mecanismo es esencial en la unión y remoción de ácidos orgánicos anormales en algunas acidemias orgánicas y explica la deficiencia secundaria de carnitina que resulta de éstas, reportada por Chalmers y colaboradores.³⁰

La conjugación de carnitina disminuye el número de residuos de acil-CoA unidos a la Coenzima A (CoA) y aumenta la proporción entre acil-CoA/CoA, este mecanismo se vuelve especialmente importante en los desórdenes de oxidación de ácidos grasos cuando se acumulan los acil-CoA en diferentes órganos, induciendo apoptosis e inflamación. La conjugación de diferentes residuos acil-CoA con carnitina produce las

acilcarnitinas, la cuales pueden ser empleadas como biomarcadores para el diagnóstico de errores innatos del metabolismo.³¹

Recientemente, se ha empleado la carnitina para el tratamiento de diferentes enfermedades debido a que se han demostrado propiedades antioxidantes y antiapoptóticas asociadas a su administración.³² De igual manera, se ha reportado que la carnitina ayuda para aminorar o prevenir el daño hepático de diversas etiologías como la hepatitis y carcinoma hepatocelular.³³

Independientemente de la fuente (exógena, síntesis de novo o hidrólisis intracelular) los ácidos grasos intracelulares se convierten en acil-CoA, mediante tioesterificación. Este proceso es catalizado por las acil-CoA sintetasas y tiene como resultado la formación de los grupos acil-CoA, la forma activada de los ácidos grasos intracelulares. Cuando las células requieren energía, los acil-CoA pueden ser transportados hacia la mitocondria y los peroxisomas. La oxidación en ambos organelos es diferente. Debido a que la membrana interna de la mitocondria es impermeable a los acil-CoA, éstos deben estar conjugados con carnitina para poder entrar a la mitocondria y que se lleve a cabo la β -oxidación.²⁸

La ruta metabólica más importante para la oxidación de los ácidos grasos es la β -oxidación, en esta vía, los ácidos grasos se convierten en acetil-CoA (y propionil-CoA cuando son de cadena impar) para finalmente oxidarse, proporcionando una importante fuente de energía; se lleva a cabo en la matriz mitocondrial y es el principal proceso productor de energía, pero no el único. Los ácidos grasos de cadena corta, media, ramificados o insaturados requieren modificaciones de la β -oxidación o rutas metabólicas distintas (α -oxidación, ω -oxidación) para su oxidación.³⁴

Metabolómica

El estudio de moléculas pequeñas para determinar el estado de salud se remonta a la época 2000-1500 a.C. cuando los médicos chinos empleaban hormigas para evaluar la cantidad de glucosa en la orina. Alrededor del 300 a.C. los antiguos griegos reconocieron que era esencial examinar los fluidos corporales (llamados humores) para diagnosticar enfermedades.³⁵ En 1614 Santorio Sanctorius realizó un trabajo sobre la pérdida de peso debido a lo que llamó “transpiración insensible”. Para llevar a cabo su trabajo, él inventó su propio instrumento para las mediciones y lo probó en sí mismo antes de emplearlo en el estudio de pacientes. Se le considera el padre de los estudios de balance metabólico porque fue el primero en proporcionar una base cuantitativa para la patología.³⁶

Los metabolitos son las pequeñas moléculas intermediarias o productos finales del metabolismo, típicamente menores de 1500 Da; al conjunto completo de metabolitos en los seres vivos se le denomina metaboloma. Por décadas se han empleado diferentes metabolitos tales como glucosa, creatinina, acilcarnitinas, urea, ácido úrico, bilirrubina, colesterol, aminoácidos, ácidos grasos, entre otros, para explorar el estado de salud.

La metabolómica es la disciplina que se dedica al estudio global de los metabolitos, su dinámica, composición, interacciones y respuestas a intervenciones o cambios en el ambiente celular de tejidos o biofluidos. En la actualidad, la metabolómica permite analizar al mismo tiempo miles de compuestos endógenos y exógenos con diferentes propiedades físicas y químicas, por lo que su campo ha crecido rápidamente debido a que hace posible la identificación de alteraciones en rutas metabólicas, así como el descubrimiento de nuevas funciones de los genes, gracias a que representa una medición sensible del estado biológico en condiciones de salud o enfermedad.³⁷ Esta

herramienta es la estrategia de elección para propósitos médicos y nutricionales, pero su aplicación es tan amplia que incluso se emplea rutinariamente para realizar análisis toxicológicos y biotecnológicos.^{38,39}

Las técnicas más empleadas en este campo son la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas,⁴⁰ su desarrollo ha sido un paso importante para mejorar el diagnóstico y seguimiento de enfermedades, desarrollar nuevas estrategias terapéuticas e identificar biomarcadores, proporcionando herramientas que permitan tener un mayor entendimiento de la fisiopatología, su impacto en el organismo y la respuesta de éste para contrarrestarlas.⁴¹

La metabolómica puede llevarse a cabo mediante alguna de las dos estrategias: dirigida y no dirigida.

Metabolómica no dirigida

Es el análisis de todos los componentes que se puedan medir en la muestra, incluyendo los desconocidos. Debido a su naturaleza exhaustiva, la metabolómica no dirigida debe ser acoplada a técnicas quimiométricas, como análisis multivariados, para trabajar con un número manejable de señales. Este tipo de estudio requiere investigación e identificación posterior mediante Química Analítica, pero ofrece la oportunidad de descubrir nuevos blancos terapéuticos y biomarcadores. Sin embargo, los mayores retos son: el tiempo requerido para procesar la enorme cantidad de datos crudos, la dificultad en identificar y caracterizar moléculas desconocidas, la dependencia en la cobertura analítica intrínseca de la plataforma empleada y la parcialidad en la detección de moléculas abundantes.³⁷

Metabolómica dirigida

Proporciona información sobre una lista predefinida de metabolitos o rutas metabólicas de interés y es útil para responder preguntas bioquímicas específicas. La información obtenida es confiable ya que se cuantifican y analizan compuestos conocidos empleando métodos específicos y estandarizados que son más sensibles que los utilizados en metabolómica no dirigida, en consecuencia, las plataformas metabólicas dirigidas son preferibles para metabolitos con concentraciones bajas, los cuales suelen ser bioactivos y desempeñar papeles importantes en los sistemas biológicos. Además, cuando el principal interés es una clase específica de metabolitos o una ruta metabólica, los enfoques dirigidos pueden proporcionar una mejor visión en la meta específica.⁴² Este enfoque se ha empleado previamente como herramienta para identificar biomarcadores de la dieta y deficiencias nutricionales.⁴³

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica que emplea la relación masa-carga (m/z) específica de una molécula para identificar y cuantificar sustancias de diversas fuentes.⁴⁴ Un equipo de espectrometría de masas consta de: sistema de introducción de muestra, fuente de ionización, analizador de masas, detector y procesador de datos; estos 5 módulos en conjunto permiten detectar y cuantificar selectivamente múltiples analitos dentro de una familia de compuestos.⁴⁵

El término *tándem* significa arreglo de dos o más cosas una después de la otra.⁴⁶ Un espectrómetro de masas en tándem (MSMS) consta de varios espectrómetros de masas vinculados en serie, convencionalmente un MSMS cuenta con dos analizadores de masas separados por una celda de colisión. Debido a su rapidez, especificidad y

sensibilidad,⁴⁷ así como a la gran variedad de fluidos que la MSMS permite analizar, esta técnica se ha empleado, sola o en combinación con otros métodos de análisis, para el diagnóstico de errores innatos del metabolismo,⁴⁸ trastornos inmunológicos,⁴⁹ análisis de polímeros sintéticos,⁵⁰ metabolismo de fármacos,⁵¹ entre otros.

Enfoque estadístico en la metabolómica

La metabolómica proporciona una gran cantidad de información acerca de variaciones metabólicas en respuesta a un estímulo, por lo que requiere métodos estadísticos específicos que permitan analizar el conjunto completo de datos. Existen cuatro métodos principales que son empleados para garantizar la correcta interpretación: métodos no supervisados, de conglomerados (clustering), supervisados y de análisis de vía (pathway analysis). Los métodos no supervisados (Figura 6) permiten identificar diferencias entre grupos estudiados gracias a que analiza los datos obtenidos sin importar el grupo al cual pertenecen. Los métodos de conglomerados agrupan a los sujetos de acuerdo con su similitud. Los métodos supervisados discriminan la información obtenida de acuerdo con el grupo al que pertenecen, con el propósito de hacer predicciones precisas en estudios posteriores. Los métodos de análisis de vía son útiles para detectar los mecanismos biológicos en los que participan los metabolitos analizados.⁵²

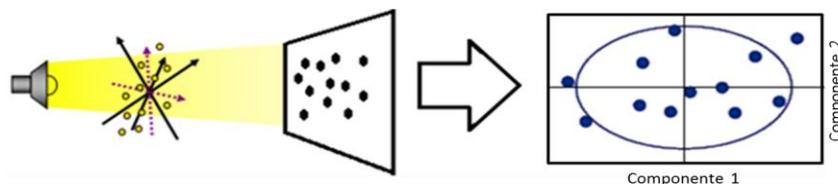


Figura 6. Proyección de un Análisis de componentes principales (PCA), prueba multivariada no supervisada.

Justificación

La deficiencia de biotina puede ocasionar trastornos metabólicos graves, además suele estar asociada a deficiencia secundaria de carnitina, sin embargo, no son completamente conocidos los cambios metabólicos que produce y si éstos pueden revertidos por la administración de carnitina. En este estudio se empleará metabolómica dirigida para determinar la concentración de aminoácidos y acilcarnitinas en tres grupos de ratas diferentes (Control, BtD y BtD+C) con la finalidad de comparar sus perfiles metabólicos. Se ha comprobado la similitud del metabolismo de biotina en ratas y en humanos, por lo que el análisis metabólico en el modelo animal permite inferir las posibles consecuencias metabólicas desencadenadas por la deficiencia de biotina en humanos.

Hipótesis

Existen diferencias metabólicas causadas por la deficiencia de biotina que afectan el metabolismo intermedio y podrían ser revertidas mediante la administración de carnitina.

Objetivos

General

- ❖ Emplear un análisis metabólico dirigido para identificar diferencias potenciales en el metabolismo intermedio de ratas deficientes de biotina y probar si la administración de carnitina es capaz de revertir dichos cambios.

Particulares

- ❖ Cuantificar los aminoácidos y acilcarnitinas en sangre en papel filtro mediante espectrometría de masas en tándem.
- ❖ Analizar los resultados obtenidos mediante el empleo de un programa estadístico específico para análisis metabólicos.

Procedimiento experimental

Clasificación del estudio

Este estudio es de tipo experimental, transversal y prospectivo.

Población

Se trabajó con ratas Wistar macho de 21 días y 50-60g de peso, distribuidas en 3 grupos:

El grupo Control estuvo constituido por 10 ratas alimentadas con una dieta comercial (con 30% de clara de huevo como fuente de avidina), suplementada con 4mg/Kg de biotina (TD. 97,126 Harlan Teklad. Madison, WI).

El grupo deficiente de biotina (BtD) formado por 8 ratas en las que se indujo deficiencia de biotina mediante una dieta comercial suplementada con 30% de clara de huevo como fuente de avidina (TD. 81,079 Harlan Teklad. Madison, WI).

El grupo de Deficiente de biotina suplementado con carnitina (BtD+C) (n=8). Estas ratas recibieron el mismo tratamiento que las deficientes de biotina y además fueron suplementadas con l-carnitina, vía intraperitoneal (200mg/Kg) cada 24 horas.

Todas las ratas fueron alojadas de manera individual en jaulas de filtro de aire y sometidas a ciclos de 12 horas luz/oscuridad con acceso libre a agua y alimento. El tratamiento tuvo una duración de 4 semanas.

Análisis de aminoácidos y acilcarnitinas

Obtención de muestras

A las cuatro semanas de tratamiento, de los animales alimentados *at libitum*, se obtuvieron 3 gotas de sangre por cortes en la cola de cada animal, se recolectaron en papel filtro Whatman 903 y se dejaron secar en posición horizontal a temperatura ambiente.

Análisis de aminoácidos y acilcarnitinas

Se realizó por espectrometría de masas en tándem empleando un espectrómetro de PerkinElmer MSMS Micromass QuattroMicro API, con un kit NeoBase®.

Descripción de la metodología

Realizar una perforación de 3mm de diámetro del papel con la muestra, depositar confetis en pozos de una microplaca con fondo en V truncado, agregar a cada pozo 100µL de solución de extracción del kit, cubrir placa con plástico adhesivo para evitar la evaporación y agitar durante 45 minutos a 45°C y 750 rpm en el Incubador/Agitador de placas. Retirar cubierta de la placa, transferir contenido a microplaca con fondo en V y cubrir con una lámina de aluminio.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo utilizando el software Metaboanalyst versión 3.0, con el cual se normalizaron los datos mediante Auto-escala (media centrada y dividida por la desviación estándar de cada variable) para darle la misma importancia a la concentración de cada uno de los metabolitos y reducir los efectos del ruido. Posteriormente se realizaron pruebas univariadas, multivariadas y de conglomerados

(clúster): Análisis de la varianza (ANOVA) permite conocer los metabolitos que presentan diferencias, mientras que la prueba de Fisher (Fisher's LSD) indica entre qué grupos se presentan dichas diferencias; análisis de componentes principales (PCA) es una prueba multivariada no supervisada que transforma un conjunto de variables originales correlacionadas entre sí, en un conjunto sintético de variables no correlacionadas (componentes principales) que conservan la mayor parte de la variación original y la representan en términos de porcentaje; el mapa de calor (heatmap) prueba no supervisada de conglomerados que muestra, gráficamente y de manera individual, la concentración de analitos por gradiente de colores, proporcionando una visualización del conjunto de valores obtenidos; análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA) que es una prueba supervisada, multivariada, principalmente empleada en estudios transversales para determinar la varianza entre dos grupos en términos de porcentaje; las variables de importancia en la proyección (VIP) asociadas al PLSDA permiten identificar los analitos responsables de la variación que se llegue a presentar entre los grupos de estudio. La lista de metabolitos analizados se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Metabolitos analizados en la sangre de las ratas

	<i>Nombre</i>	<i>Símbolo</i>
Aminoácidos	Valina	VAL
	Leucina	LEU
	Ornitina	ORN
	Metionina	MET
	Fenilalanina	PHE
	Arginina	ARG
	Citrulina	CIT
	Tirosina	TYR
Acilcarnitinas	Carnitina libre	C0
	Acetilcarnitina	C2
	Propionilcarnitina	C3
	Butirilcarnitina	C4
	3-Hidroxi-butirilcarnitina	C4OH
	Isovalerilcarnitina	C5
	3-Hidroxi-isovalerilcarnitina	C5OH
	Hexanoilcarnitina	C6
	Octanoilcarnitina	C8
	Decanoilcarnitina	C10
	Decenoilcarnitina	C10:1
	Dodecanoilcarnitina	C12
	Tetradecanoilcarnitina	C14
	Tetradecenoilcarnitina	C14:1
	Tetradecadienoilcarnitina	C14:2
	Palmitoilcarnitina	C16
Oleilcarnitina	C18:1	

Resultados

Las ratas estudiadas no presentaron características físicas ni trastornos del comportamiento que indicaran la necesidad de suspender el tratamiento. El peso de los animales no presentó diferencias significativas entre los grupos y fenotípicamente no presentaron cambios evidentes.

Pruebas univariadas

La mediana, media aritmética y el error estándar de las concentraciones de los metabolitos por grupo se muestran en la Tabla 3. Se presentan los datos previos a la normalización (datos crudos), se puede apreciar que existe un gran intervalo de concentraciones en los metabolitos estudiados, que va de 0.015 μM (C14:2 en el grupo control) hasta 205.154 μM (VAL, grupo BtD+C).

El ANOVA muestra que todos los metabolitos estudiados presentan cambios significativos entre los grupos ($P < 0.05$). El metabolito con un valor de P más significativo fue C5OH ($3.71\text{E-}17$). De acuerdo con la tasa de falso descubrimiento, no existen falsos positivos ($\text{FDR} < 0.05$). El análisis post-hoc de Fisher muestra que de los 25 metabolitos cuantificados, 16 presentaron diferencias entre los 3 grupos (Tabla 4).

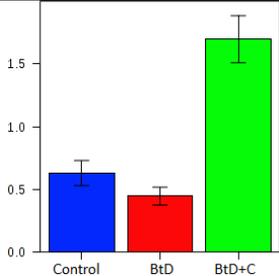
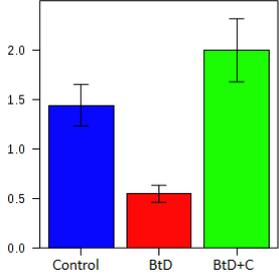
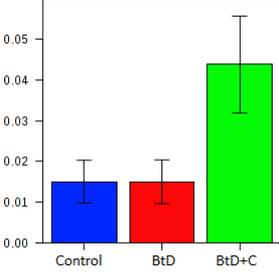
Tabla 3. Concentración micromolar (μM) de aminoácidos y acilcarnitinas, expresadas como Mediana, Media \pm Error estándar (EE).

Metabolito	CONTROL n=10			BtD n=8			BtD+C n=8		
	Mediana	Media	EE	Mediana	Media	EE	Mediana	Media	EE
VAL	98.180	95.336 \pm 4.218		124.485	123.032 \pm 8.761		203.490	205.154 \pm 8.353	
LEU	126.795	126.514 \pm 2.459		98.145	106.716 \pm 7.068		143.685	143.081 \pm 6.600	
ORN	19.695	18.075 \pm 1.551		11.345	13.172 \pm 1.348		12.715	13.319 \pm 1.144	
MET	46.755	47.779 \pm 3.353		33.990	36.188 \pm 2.775		57.895	60.111 \pm 3.141	
PHE	47.995	47.731 \pm 2.092		36.960	39.083 \pm 2.590		55.900	56.446 \pm 2.426	
ARG	109.815	113.549 \pm 5.916		49.175	65.364 \pm 9.730		61.580	62.594 \pm 4.796	
CIT	53.435	56.218 \pm 2.190		45.380	47.425 \pm 2.715		51.800	48.031 \pm 2.384	
TYR	68.565	69.126 \pm 3.157		68.025	65.881 \pm 2.222		90.725	92.051 \pm 3.112	
C0	22.495	22.554 \pm 0.945		7.080	7.464 \pm 0.417		26.235	26.405 \pm 1.631	
C2	17.625	16.882 \pm 0.618		7.300	7.876 \pm 0.516		24.310	23.941 \pm 0.945	
C3	2.040	2.173 \pm 0.140		5.545	5.263 \pm 0.362		14.550	15.821 \pm 1.541	
C4	0.785	0.790 \pm 0.029		0.320	0.363 \pm 0.030		1.085	1.116 \pm 0.056	
C5	0.165	0.175 \pm 0.013		0.125	0.124 \pm 0.014		0.545	0.524 \pm 0.030	
C4OH	0.200	0.201 \pm 0.006		0.040	0.043 \pm 0.004		0.155	0.158 \pm 0.011	
C6	0.080	0.083 \pm 0.004		0.030	0.044 \pm 0.008		0.095	0.091 \pm 0.005	
C5OH	0.040	0.039 \pm 0.002		0.335	0.275 \pm 0.039		0.315	0.311 \pm 0.014	

Tabla 3. Concentración micromolar (μM) de aminoácidos y acilcarnitinas, expresadas como Mediana, Media \pm Error estándar (EE) (continúa).

Metabolito	CONTROL n=10			BtD n=8			BtD+C n=8		
	Mediana	Media	EE	Mediana	Media	EE	Mediana	Media	EE
C8	0.110	0.109 \pm 0.005		0.030	0.048 \pm 0.011		0.115	0.120 \pm 0.005	
C10:1	0.050	0.054 \pm 0.002		0.035	0.038 \pm 0.004		0.115	0.119 \pm 0.006	
C10	0.140	0.145 \pm 0.003		0.040	0.059 \pm 0.015		0.110	0.109 \pm 0.009	
C12	0.180	0.190 \pm 0.009		0.045	0.078 \pm 0.023		0.130	0.138 \pm 0.013	
C14:2	0.015	0.015 \pm 0.002		0.015	0.016 \pm 0.002		0.040	0.044 \pm 0.004	
C14:1	0.070	0.072 \pm 0.004		0.040	0.050 \pm 0.007		0.115	0.115 \pm 0.009	
C14	0.240	0.244 \pm 0.014		0.060	0.105 \pm 0.029		0.140	0.156 \pm 0.015	
C16	1.455	1.443 \pm 0.066		0.555	0.780 \pm 0.158		1.945	1.999 \pm 0.113	
C18:1	0.630	0.629 \pm 0.032		0.445	0.507 \pm 0.046		1.700	1.696 \pm 0.066	

Tabla 4. Análisis de la Varianza, análisis post-hoc de Fisher y gráficas de todos los metabolitos analizados en los tres grupos.

Metabolito	p.value ¹	FDR ²	Fisher's LSD ³	Gráfica ⁴
C18:1	6.15E-16	7.99E-15	0-1; 0-2; 1-2	
C16	2.33E-11	6.06E-11	0-1; 0-2; 1-2	
C14:2	7.10E-08	9.71E-08	0-2; 1-2	

¹ P.value (valor de P). Indica la probabilidad de que la diferencia de perfiles sea debida a variación aleatoria.

² FDR (False Discovery Rate). Es la proporción de falsos positivos entre las pruebas que fueron significativas.

³ Fisher's LSD (Fisher's Least Significant Difference). Indica los grupos entre los cuales se presentaron las diferencias estadísticas: Control=0, Deficiente de biotina=1, Deficiente de biotina suplementado con carnitina=2.

⁴ La escala indica la concentración micromolar.

Tabla 4. Análisis de la Varianza, análisis post-hoc de Fisher y gráficas de todos los metabolitos analizados en los tres grupos (continúa).

Metabolito	p.value ¹	FDR ²	Fisher's LSD ³	Gráfica ⁴
C14:1	5.09E-08	7.35E-08	0-1; 0-2; 1-2	
C14	1.78E-09	2.89E-09	0-1; 0-2; 1-2	
C12	4.23E-10	8.46E-10	0-1; 0-2; 1-2	

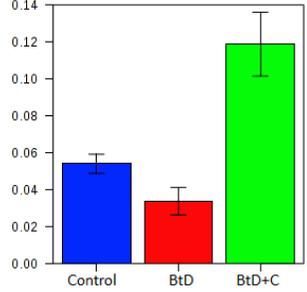
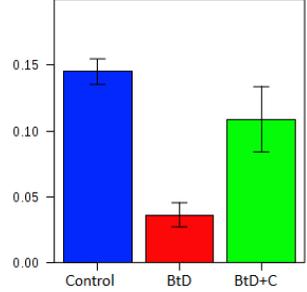
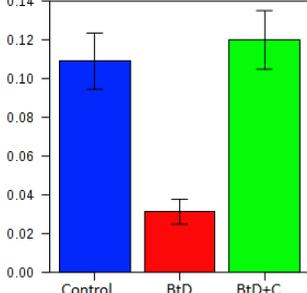
¹ P.value (valor de P). Indica la probabilidad de que la diferencia de perfiles sea debida a variación aleatoria.

² FDR (False Discovery Rate). Es la proporción de falsos positivos entre las pruebas que fueron significativas.

³ Fisher's LSD (Fisher's Least Significant Difference). Indica los grupos entre los cuales se presentaron las diferencias estadísticas: Control=0, Deficiente de biotina=1, Deficiente de biotina suplementado con carnitina=2.

⁴ La escala indica la concentración micromolar.

Tabla 4. Análisis de la Varianza, análisis post-hoc de Fisher y gráficas de todos los metabolitos analizados en los tres grupos (continúa).

Metabolito	p.value ¹	FDR ²	Fisher's LSD ³	Gráfica ⁴
C10:1	1.91E-13	1.65E-12	0-1; 0-2; 1-2	
C10	2.20E-12	7.13E-12	0-1; 0-2; 1-2	
C8	9.00E-13	3.83E-12	0-1; 1-2	

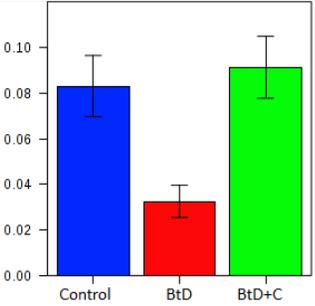
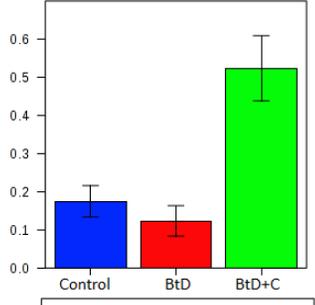
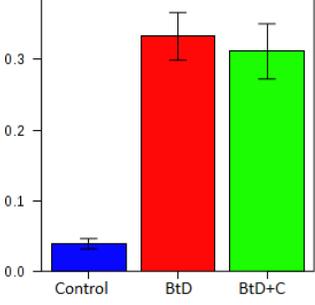
¹ P.value (valor de P). Indica la probabilidad de que la diferencia de perfiles sea debida a variación aleatoria.

² FDR (False Discovery Rate). Es la proporción de falsos positivos entre las pruebas que fueron significativas.

³ Fisher's LSD (Fisher's Least Significant Difference). Indica los grupos entre los cuales se presentaron las diferencias estadísticas: Control=0, Deficiente de biotina=1, Deficiente de biotina suplementado con carnitina=2.

⁴ La escala indica la concentración micromolar.

Tabla 4. Análisis de la Varianza, análisis post-hoc de Fisher y gráficas de todos los metabolitos analizados en los tres grupos (continúa).

Metabolito	p.value ¹	FDR ²	Fisher's LSD ³	Gráfica ⁴
C6	9.36E-10	1.74E-09	0-1; 1-2	
C5	1.03E-12	3.83E-12	0-2; 1-2	
C5OH	3.71E-17	9.64E-16	0-1; 0-2	

¹ P.value (valor de P). Indica la probabilidad de que la diferencia de perfiles sea debida a variación aleatoria.

² FDR (False Discovery Rate). Es la proporción de falsos positivos entre las pruebas que fueron significativas.

³ Fisher's LSD (Fisher's Least Significant Difference). Indica los grupos entre los cuales se presentaron las diferencias estadísticas: Control=0, Deficiente de biotina=1, Deficiente de biotina suplementado con carnitina=2.

⁴ La escala indica la concentración micromolar.

Tabla 4. Análisis de la Varianza, análisis post-hoc de Fisher y gráficas de todos los metabolitos analizados en los tres grupos (continúa).

Metabolito	p.value ¹	FDR ²	Fisher's LSD ³	Gráfica ⁴
C4OH	2.79E-13	1.81E-12	0-1; 0-2; 1-2	
C4	1.75E-11	5.05E-11	0-1; 0-2; 1-2	
C3	1.45E-10	3.14E-10	0-1; 0-2; 1-2	

¹ P.value (valor de P). Indica la probabilidad de que la diferencia de perfiles sea debida a variación aleatoria.

² FDR (False Discovery Rate). Es la proporción de falsos positivos entre las pruebas que fueron significativas.

³ Fisher's LSD (Fisher's Least Significant Difference). Indica los grupos entre los cuales se presentaron las diferencias estadísticas: Control=0, Deficiente de biotina=1, Deficiente de biotina suplementado con carnitina=2.

⁴ La escala indica la concentración micromolar.

Tabla 4. Análisis de la Varianza, análisis post-hoc de Fisher y gráficas de todos los metabolitos analizados en los tres grupos (continúa).

Metabolito	p.value ¹	FDR ²	Fisher's LSD ³	Gráfica ⁴
C2	6.56E-13	3.41E-12	0-1; 0-2; 1-2	
C0	5.40E-11	1.28E-10	0-1; 0-2; 1-2	
VAL	1.16E-09	2.00E-09	0-1; 0-2; 1-2	

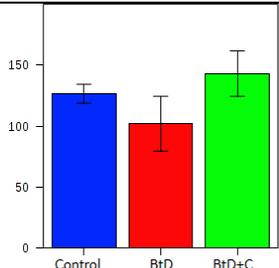
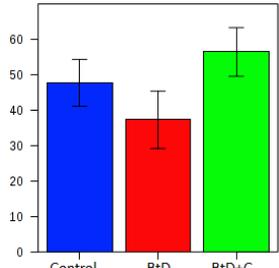
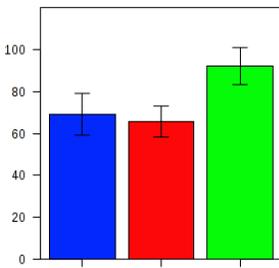
¹ P.value (valor de P). Indica la probabilidad de que la diferencia de perfiles sea debida a variación aleatoria.

² FDR (False Discovery Rate). Es la proporción de falsos positivos entre las pruebas que fueron significativas.

³ Fisher's LSD (Fisher's Least Significant Difference). Indica los grupos entre los cuales se presentaron las diferencias estadísticas: Control=0, Deficiente de biotina=1, Deficiente de biotina suplementado con carnitina=2.

⁴ La escala indica la concentración micromolar.

Tabla 4. Análisis de la Varianza, análisis post-hoc de Fisher y gráficas de todos los metabolitos analizados en los tres grupos (continúa).

Metabolito	p.value ¹	FDR ²	Fisher's LSD ³	Gráfica ⁴
LEU	2.55E-04	2.89E-04	0-1; 0-2; 1-2	
PHE	9.11E-05	1.08E-04	0-1; 0-2; 1-2	
TYR	5.92E-06	7.69E-06	0-2; 1-2	

¹ P.value (valor de P). Indica la probabilidad de que la diferencia de perfiles sea debida a variación aleatoria.

² FDR (False Discovery Rate). Es la proporción de falsos positivos entre las pruebas que fueron significativas.

³ Fisher's LSD (Fisher's Least Significant Difference). Indica los grupos entre los cuales se presentaron las diferencias estadísticas: Control=0, Deficiente de biotina=1, Deficiente de biotina suplementado con carnitina=2.

⁴ La escala indica la concentración micromolar.

Tabla 4. Análisis de la Varianza, análisis post-hoc de Fisher y gráficas de todos los metabolitos analizados en los tres grupos (continúa).

Metabolito	p.value ¹	FDR ²	Fisher's LSD ³	Gráfica ⁴
MET	7.78E-05	9.63E-05	0-1; 0-2; 1-2	
ARG	2.74E-08	4.20E-08	0-1; 0-2	
CIT	3.56E-03	3.86E-03	0-1; 0-2	

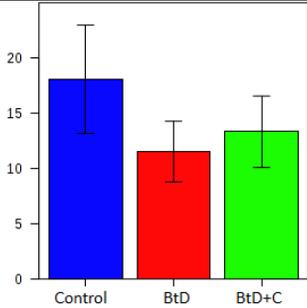
¹ P.value (valor de P). Indica la probabilidad de que la diferencia de perfiles sea debida a variación aleatoria.

² FDR (False Discovery Rate). Es la proporción de falsos positivos entre las pruebas que fueron significativas.

³ Fisher's LSD (Fisher's Least Significant Difference). Indica los grupos entre los cuales se presentaron las diferencias estadísticas: Control=0, Deficiente de biotina=1, Deficiente de biotina suplementado con carnitina=2.

⁴ La escala indica la concentración micromolar.

Tabla 4. Análisis de la Varianza, análisis post-hoc de Fisher y gráficas de todos los metabolitos analizados en los tres grupos (continúa).

Metabolito	p.value ¹	FDR ²	Fisher's LSD ³	Gráfica ⁴
ORN	4.14E-03	4.31E-03	0-1; 0-2	

¹ P.value (valor de P). Indica la probabilidad de que la diferencia de perfiles sea debida a variación aleatoria.

² FDR (False Discovery Rate). Es la proporción de falsos positivos entre las pruebas que fueron significativas.

³ Fisher's LSD (Fisher's Least Significant Difference). Indica los grupos entre los cuales se presentaron las diferencias estadísticas: Control=0, Deficiente de biotina=1, Deficiente de biotina suplementado con carnitina=2.

⁴ La escala indica la concentración micromolar.

Pruebas multivariadas

No supervisadas

El análisis de componentes principales (PCA) revela claramente la separación de los grupos estudiados, con una varianza en dos componentes del 84.2% (PC1=48.7%, PC2=35.5%), lo que indica que los tres grupos presentan un metaboloma diferente, sin ninguna superposición entre los grupos, el grupo control presenta una menor variabilidad interindividual. No se observan valores atípicos (Figura 7).

El mapa de calor muestra la concentración individual de las muestras y agrupa a los animales como resultado de un análisis de conglomerados no supervisado de acuerdo a su perfil metabólico, cada fila corresponde a un analito y cada columna a un individuo. El dendograma revela que cada grupo tiene un perfil metabólico característico y señala una mayor semejanza entre el grupo BtD+C y el Control. El gradiente de color que va de anaranjado a amarillo indica la concentración de cada metabolito, como se observan todos los resultados al mismo tiempo es posible comparar a los individuos dentro del mismo grupo (variabilidad intragrupal) o de un grupo con respecto a otro (variabilidad intergrupala). En el grupo BtD la mayoría de los metabolitos se encuentran en concentraciones bajas (celdas anaranjadas), con excepción de C5OH, C3 y VAL. Comparado con el grupo control, en el BtD+C los metabolitos presentan concentraciones elevadas (celdas amarillas), excepto en C4OH, C14, C10, C12, ORN, ARG y CIT. El grupo BtD+C presentó mayor variabilidad intragrupal (Figura 8).

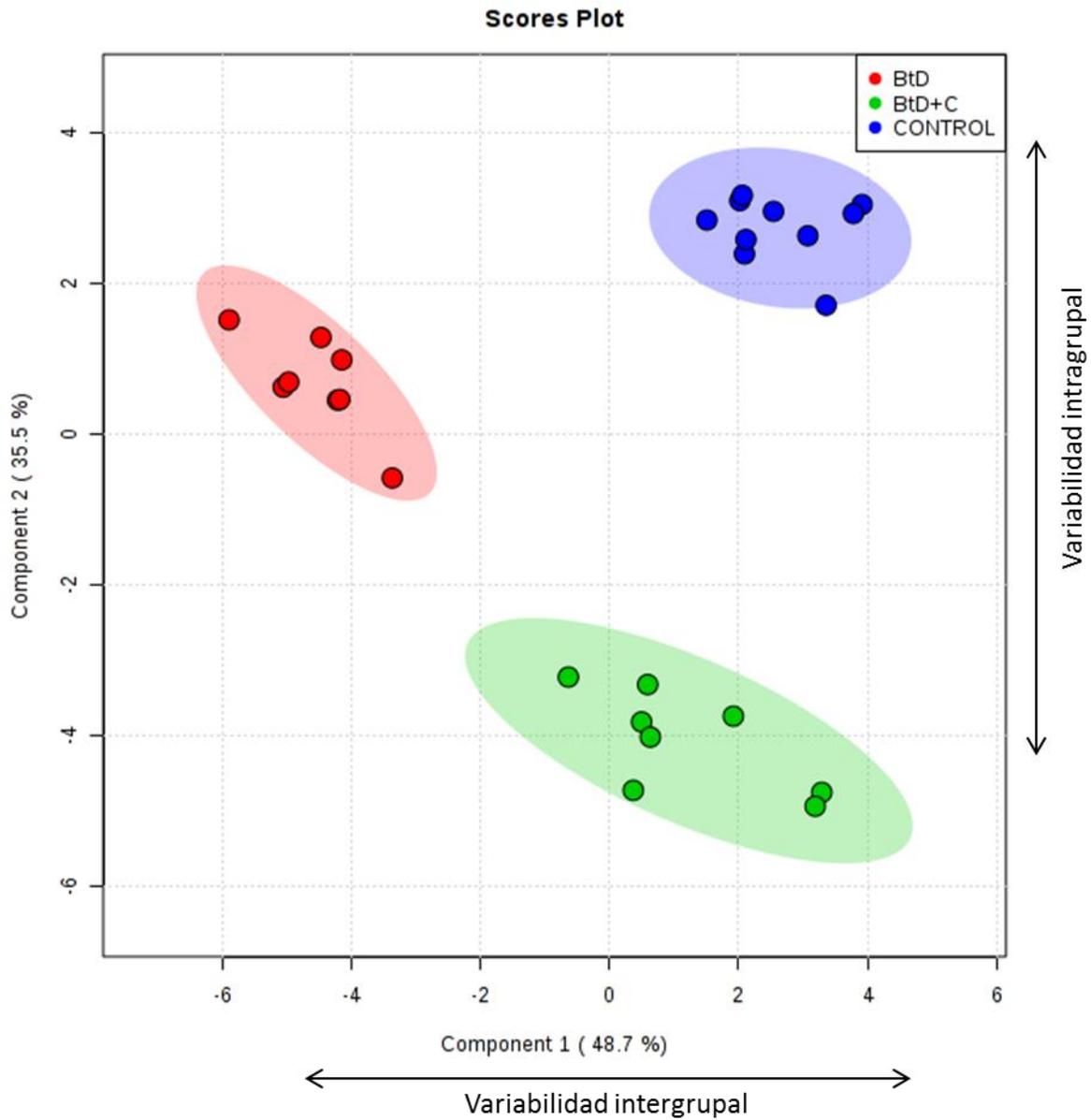


Figura 7. 2D-PCA. Representación gráfica de los datos metabólicos obtenidos en las muestras de sangre, resumidos en los 2 componentes principales. Cada punto corresponde a un animal, la cercanía ellos refleja similitud metabólica. Las elipses representan las regiones con el 95% de confianza. Grupos: Control=azul, Deficiente de biotina=rojo, Deficiente de biotina suplementado con carnitina=verde.

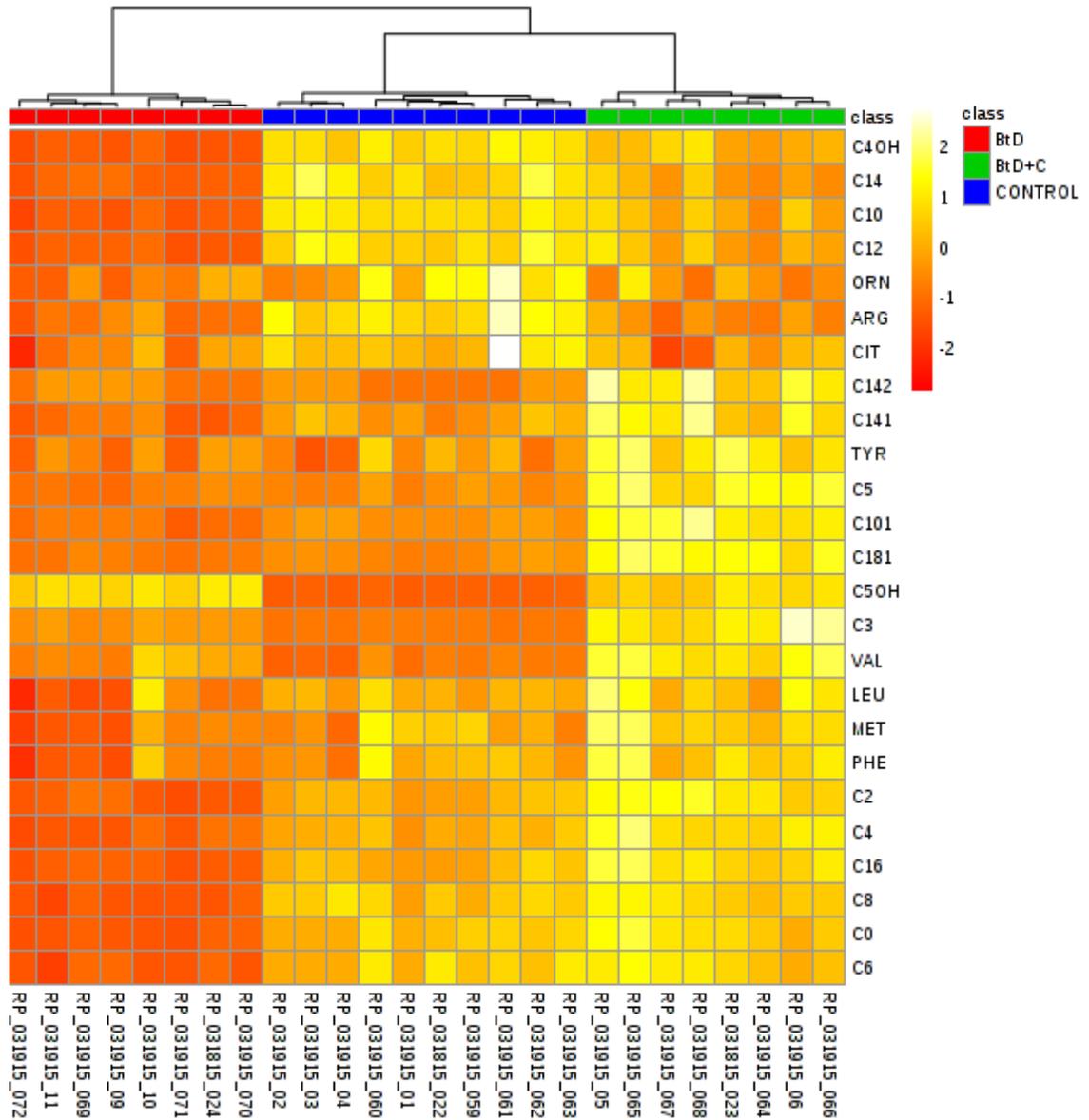


Figura 8. Mapa de calor. Muestra la visión del conjunto de datos obtenidos en forma de matriz con celdas de colores de acuerdo con la concentración relativa que se ve reflejada en el gradiente de color que va de amarillo (mayor) a anaranjado (menor) de los metabolitos analizados. Cada fila corresponde a un analito y cada columna a un individuo. En la parte superior de la imagen se muestra un dendograma que agrupa a los sujetos de acuerdo con la similitud entre sus perfiles.

Supervisadas

El resultado del análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA) muestra la diferencia metabólica entre los grupos Control y BtD. En el PLSDA se observa una contundente separación entre los 2 grupos, con una varianza del 78.7% (PLS1=69.1%, PLS2=9.6%). La prueba indica que tanto el ajuste del modelo como la predicción son muy buenos ($R^2=0.99719$, $Q^2=0.97971$). Las variables de importancia en la proyección (VIP) revelan que 14 metabolitos son responsables de la separación entre los grupos (VIP score>1), y de éstos, C5OH y C3 se encuentran elevados en el grupo BtD (Figura 9).

Análisis de vías metabólicas

Los 14 metabolitos responsables de la diferencia de perfiles metabólicos de las ratas deficientes comparadas con las controles fueron relacionados con las vías metabólicas en las cuales participan, las graficas se observan en la Figura 10. C5OH y C3 están involucrados en el metabolismo de las carboxilasas, en ambas gráficas se observa que el grupo control tiene la menor concentración (Figura 10A). En los metabolitos relacionados con la β -oxidación, el grupo BtD presenta niveles bajos comparados con el grupo Control (Figura 10B). ARG fue el único aminoácido involucrado en la diferenciación de perfiles entre los grupos, este metabolito, junto con CIT y ORN, participa en el ciclo de la urea, los 3 aminoácidos muestran la misma tendencia, presentando una menor concentración de estos aminoácidos en el grupo BtD (Figura 10C).

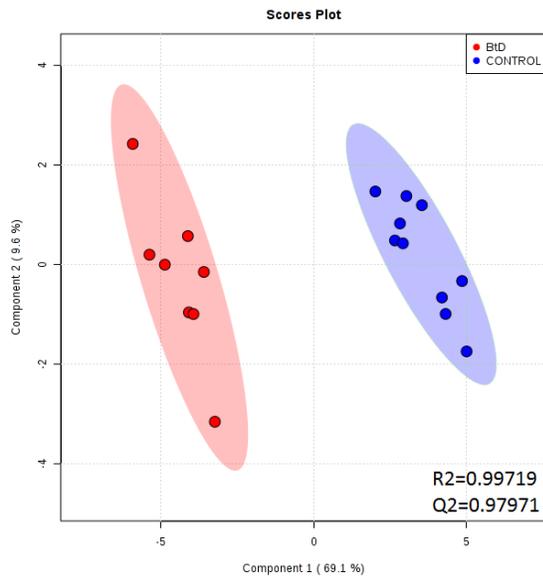
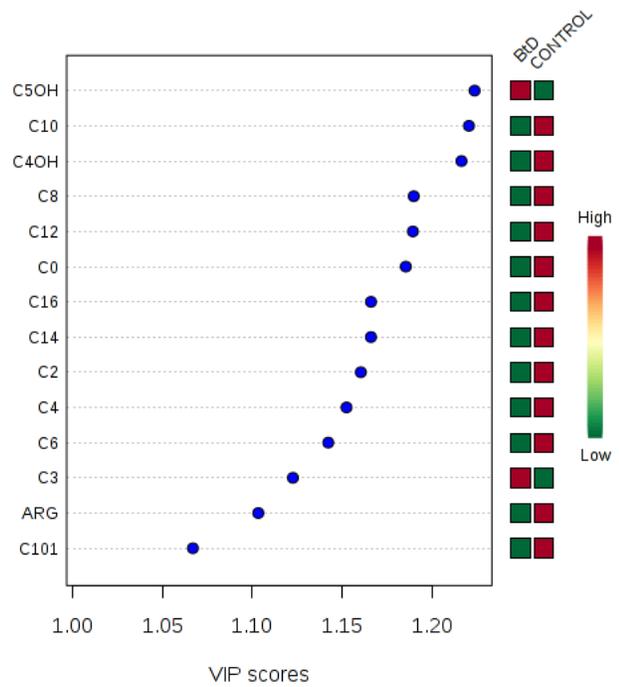
A**B**

Figura 9. PLSDA (A) y su correspondiente VIP (B). El PLSDA compara al grupo Deficiente de biotina (rojo) con el Control (azul), las elipses corresponden a las regiones con el 95% de confianza. La VIP muestra los metabolitos responsables de la separación entre los grupos observada en el PLSDA. Las cajas de colores a la derecha indican la concentración relativa de los metabolitos correspondientes en cada grupo de estudio (rojo= elevado, verde=disminuido).

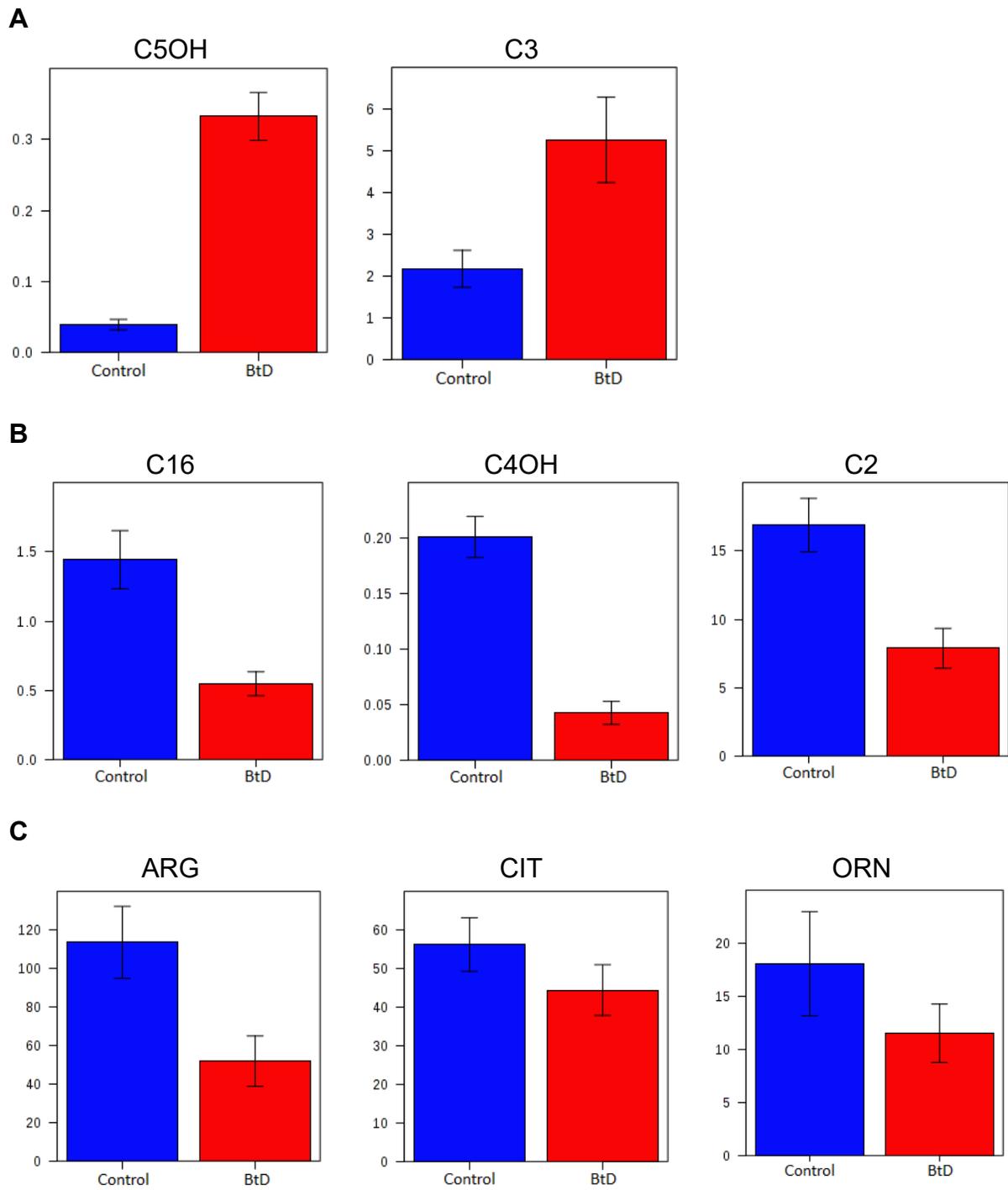


Figura 10. Gráficas de los metabolitos relacionados con A) metabolismo de carboxilasas, B) β -oxidación y C) ciclo de la urea.

Discusión

Existe evidencia que diversos grados de deficiencia secundaria de biotina pueden ocurrir en diversas patologías; las deficiencias severas ocurren en enfermedades genéticas, provocando una variedad de consecuencias en la salud.^{53,54}

La deficiencia de esta vitamina se ha estudiado principalmente en modelos animales entre 6 y 8 semanas, cuando las ratas presentan todos los signos de la deficiencia y además tienen asociada una severa desnutrición.^{55,56} Actualmente los estudios están enfocados a observar diferencias en deficiencias de marginales a moderadas. Se ha demostrado que en un lapso de 4 semanas con carencia de esta vitamina, las ratas presentan cambios genéticos y metabólicos que aparecen antes de efectos de desnutrición o adaptativos.⁵⁷

El análisis de componentes principales y el dendograma del mapa de calor revelan la existencia de tres grupos perfectamente definidos lo que indica que el metaboloma de las ratas es influenciado por la deficiencia de biotina y la suplementación de carnitina.

De acuerdo al modelo de PLSDA se identificaron 14 compuestos (VIP>1) responsables de las diferencias entre el grupo control y el grupo BtD. Dentro de las acilcarnitinas destacan C5OH y C3 que presentaron concentraciones mayores en el grupo BtD (Figura 9B) (Figura 10A), ambas acilcarnitinas se emplean como biomarcadores patológicos de deficiencia de biotina genética como adquirida,^{58,59} además es un

indicador temprano y sensible de deficiencia marginal.⁶⁰ Por su parte, la C3 es el biomarcador característico de deficiencia en el metabolismo del propionato: acidemia metilmalónica (AMM) y propiónica (AP).⁶¹

Varias acilcarnitinas se encontraron disminuidas en el grupo BtD, destacan de manera importante C16, C2 y C4OH que se sabe son fuertes marcadores de la β -oxidación,⁶² sin embargo existe discordancia entre datos previamente reportados donde se observa un aumento en la transcripción de genes involucrados con la β -oxidación incluso en el periodo postprandial,⁶³ indicando que los cambios genéticos no necesariamente se pueden utilizar para inferir un flujo en el metabolismo.^{64,65} En este caso también observamos que la C0 se encuentra disminuida en el grupo BtD, por lo que la baja concentración de acilcarnitinas puede ser secundaria a la falta de sustrato. Se esperaría que la baja actividad de ACC, debido a la deficiencia de biotina, conlleve a un incremento en el transporte de ácidos grasos y la β -oxidación, lo que aumentaría los niveles de ATP; sin embargo, resultados previos señalan escasez energética en deficiencia de biotina, probablemente causada por reducción en la anaplerosis del ciclo de Krebs debido a la baja actividad de la PCC y debido al daño mitocondrial reportado en ratas deficientes de biotina.⁶⁶

La depleción de C0 tiene repercusiones muy importantes pues juega un papel vital en la producción de energía, el metabolismo de ácidos grasos y las funciones del sistema inmune.⁶⁷ Participa además en la detoxificación de compuestos acil-CoA que se encuentran elevados en pacientes con acidemias orgánicas. La deficiencia de carnitina secundaria en acidemias orgánicas ha sido reportada previamente y suele ser

suplementada como parte del tratamiento.^{68,69} En este estudio, la suplementación con carnitina confirió una recuperación metabólica parcial al grupo correspondiente.

La ARG fue el único aminoácido que contribuyó a la diferenciación de perfiles, encontrándose en menor concentración en el grupo BtD, lo que sugiere una disminución en el flujo del ciclo de la urea, presumiblemente se encuentra asociada a la acumulación de Propionil-CoA que es un potente inhibidor de la formación de N-acetilglutamato, un activador alostérico de la carbamilfosfato sintetasa 1, enzima que cataliza la condensación y activación de amonio y ácido carbónico para formar carbamilfosfato, esta reacción esencial e irreversible es el paso limitante del ciclo de la urea.⁷⁰ Los 3 aminoácidos que participan en el ciclo de la urea ARG, CIT y ORN mostraron una concentración mayor en el grupo Control que en los grupos BtD y BtD+C, indicando que la suplementación con carnitina no alcanza a revertir el efecto de la deficiencia de biotina en esta vía metabólica. Este resultado concuerda con un estudio previo en el cual se reporta disminución tanto en la expresión del gen de ornitina transcarbamilasa como en la actividad enzimática, sin que se vea reflejado en el flujo del ciclo de la urea.⁷¹

Conclusiones

Los resultados muestran que la deficiencia de biotina induce cambios metabólicos. Catorce metabolitos fueron responsables de la diferenciación entre los perfiles del grupo BtD y Control, dos se encontraron elevados y doce disminuidos en el grupo BtD. La deficiencia de biotina disminuye el flujo de la β -oxidación debido a la falta de sustrato y probablemente relacionado con baja obtención de energía, la suplementación con carnitina confirió una recuperación metabólica parcial.

Perspectivas

La metabolómica es un enfoque que puede ser empleado para entender tanto la fisiopatología de enfermedades como el análisis de la interacción entre los nutrientes y el metabolismo, también permite generar modelos computacionales que pueden ser empleados como herramientas predictivas para análisis posteriores, lo que hacen de este enfoque una poderosa herramienta para el estudio de desórdenes metabólicos, así como aspectos nutricionales.

Referencias

1. Lanska DJ. The discovery of niacin, biotin, and pantothenic acid. *Ann Nutr Metab.* 2012; 61: 246-53.
2. Cowan MJ, Wara DW, Packman S, Ammann AJ, Yoshino M, Sweetman L, Nyhan W. Multiple biotin-dependent carboxylase deficiencies associated with defects in T-cell and B-cell immunity. *Lancet.* 1979; 2: 115-8.
3. Kuroishi T. Regulation of immunological and inflammatory functions by biotin. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015; 93: 1091-96
4. Agrawal S, Agrawal A, Said HM. Biotin deficiency enhances the inflammatory response of human dendritic cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016; 311: C386-91.
5. Fernandez-Mejia C. Pharmacological effects of biotin. *J Nutr Biochem.* 2005; 16: 424-7.
6. Via M. The malnutrition of obesity: Micronutrient deficiencies that promote diabetes. *ISRN Endocrinol.* 2012, 2012, 103472.
7. Watanabe T, Endo A. Teratogenic effects of maternal biotin deficiency on mouse embryos examined at midgestation *Teratology.* 1990; 42: 295–300.
8. Mock DM, Mock NI, Stewart CW, LaBorde JB, Hansen DK. Marginal biotin deficiency is teratogenic in ICR mice. *J Nutr.* 2003; 133: 2519-25.
9. Rodriguez-Melendez R, Zemleni J. Regulation of gene expression by biotin. *J Nutr Biochem* 2003; 14: 680–90.

-
10. Velazquez-Arellano A, Ortega-Cuellar D, Hernandez-Mendoza A, Moreno-Arriola E. A heuristic model for paradoxical effects of biotin starvation on carbon metabolism genes in the presence of abundant glucose. *Mol Genet Metab.* 2011; 102: 69-77
 11. Rodríguez-Meléndez R. Importance of biotin metabolism. *Rev Invest Clin.* 2000; 52: 194-9.
 12. Utter MF, Keech DB. Formation of oxaloacetate from pyruvate and carbon dioxide. *J Biol Chem.* 1960; 235: 17-8.
 13. Marin-Valencia I, Roe CR, Pascual JM. Pyruvate carboxylase deficiency: Mechanisms, mimics and anaplerosis. *Mol Genet Metab.* 2010; 101: 9-17.
 14. Zu X, Zhong J, Luo D, Tan J, Zhang Q, Wu Y. Chemical genetics of acetyl-CoA carboxylases. *Molecules.* 2013; 18: 1704-19.
 15. Tong L. Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell Mol Life Sci.* 2013; 70: 868-91.
 16. Staggs CG, Sealey WM, McCabe BJ, Teague AM, Mock DM. Determination of the biotin content of selected foods using accurate and sensitive HPLC/avidin binding. *J Food Compost Anal.* 2004; 17: 767-76.
 17. Wolf B. Biotinidase: its role in biotinidase deficiency and biotin metabolism. *J Nutr Biochem.* 2005; 16: 441-5.
 18. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies [Internet] USA: National Academy of Sciences; [actualizado 31 May 2016; citado 30 Jun 2016].

Disponible en: <http://nationalacademies.org/hmd/activities/nutrition/summarydris/dri-tables.aspx>

19. Baumgartner MR. Vitamin-response disorders: cobalamin, folate, biotin, vitamins B1 and E. *Handb Clin Neurol*. 2013; 113: 1799:810.

20. Mock DM. Marginal biotin deficiency is common in normal human pregnancy and is highly teratogenic in mice. *J Nutr*. 2009; 139: 154-7.

21. Lombard KA, Mock MD. Biotin nutritional status of vegans, lactoovovegetarians, and nonvegetarians. *Am J Clin Nutr*. 1989; 50: 486-90.

22. Yoon HR. Screening newborns for metabolic disorders based on targeted metabolomics using tandem mass spectrometry. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2015; 20: 119-24.

23. Tammachote R, Janklat S, Tongkobpetch S, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. Holocarboxylase synthetase deficiency: novel clinical and molecular findings. *Clin Genet*. 2010; 78: 88-93.

24. Van Hove JL, Josefsberg S, Freehauf C, Thomas JA, Thuy le P, Barshop BA, et al. Management of a patient with holocarboxylase synthetase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2008; 95 (4): 201-5.

25. Gannavarapu S, Prasad C, DiRaimo J, Napier M, Goobie S, Potter M, et al. Biotinidase deficiency: Spectrum of molecular, enzymatic and clinical information from newborn screening Ontario, Canada (2007-2014). *Mol Genet Metab*. 2014; 116: 146-51.

26. Li H, Spencer L, Nahhas F, Miller J, Fribley A, Feldman G, et al. Novel mutations causing biotinidase deficiency in individuals identified by newborn screening in Michigan

including an unique intronic mutation that alters mRNA expression of the biotinidase gene. *Mol Genet Metab.* 2014; 112: 242-6.

27. Wolf B. Biotinidase deficiency: “if you have to have an inherited metabolic disease, this is the one to have”. *Genet Med.* 2012; 14: 565-75.

28. Wolf B. Biotinidase deficiency and our champagne legacy. *Gene.* 2016; 589: 142-50.

29. Meadows JA, Wargo MJ. Carnitine in bacterial physiology and metabolism *Microbiology.* 2015; 161: 1161-74.

30. Chalmers RA, Roe CR, Tracey BM, Stacey TE, Hoppel CL, Millington DS. Secondary carnitine insufficiency in disorders of organic acid metabolism: modulation of acyl-CoA/CoA ratios by L-carnitine in vivo. *Biochem Soc Trans.* 1983; 11: 724-5.

31. Longo N, Frigeni M, Pasquali M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1863: 2411-35.

32. Sharma S, Aramburo A, Rafikov R, Sun X, Kumar S, Oishi PE, et al. L-carnitine preserves endothelial function in a lamb model of increased pulmonary blood flow. *Pediatr Res.* 2013; 74: 39-47.

33. Li JL, Wang QY, Luan HY, Kang ZC, Wang CB. Effects of l-carnitine against oxidative stress in human hepatocytes: involvement of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biomed Sci.* 2012; 19: 32

34. Miura Y. The biological significance of ω -oxidation of fatty acids. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2013; 89: 370-82.

35. Oresic M. Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009; 19: 816-24.

-
36. Eknoyan G. Santorio Sanctorius (1561-1636) – Founding father of metabolic balance studies. *Am J Nephrol.* 1999; 19: 226-33.
37. Nagana-Gowda GA, Raftery D. Biomarker discovery and translation in metabolomics. *Curr Metabolomics.* 2013; 1: 227-40.
38. Ramirez T, Daneshian M, Kamp H, Bois FY, Clench MR, Coen M, et al. Metabolomics in toxicology and preclinical research. *ALTEX.* 2013; 30: 209-25.
39. Gomez-Casati DF, Zanor MI, Busi MV. Metabolomics in plants and humans: applications in the prevention and diagnosis of diseases. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 792527.
40. Bouhifd M, Hartung T, Hogberg HT, Kleensang A, Zhao L. Review: toxicometabolomics. *J Appl Toxicol.* 2013; 33: 1365-83.
41. Zhang A, Sun H, Yan G, Wang P, Wang X. Metabolomics for biomarker discovery: moving to the clinic. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:354671.
42. Kim SJ, Kim SH, Kim JH, Hwang S, Yoo HJ. Understanding metabolomics in biomedical research. *Endocrinol Metab.* 2016; 31: 7-16.
43. Beckmann M, Joosen AM, Clarke MM, et al. Changes in the human plasma and urinary metabolome associated with acute dietary exposure to sucrose and the identification of potential biomarkers of sucrose intake. *Mol Nutr Food Res.* 2016; 60: 444-57.
44. Nagarajan P, Tetzlaff MT, Curry JL, Prieto VG. Use of new techniques in addition to IHC applied to the diagnosis of melanocytic lesions, with emphasis on CGH, FISH, and Mass Spectrometry. *Actas Dermosifiliogr.* 2017; 108: 17-30.

-
45. Fernández-Lainez C, Vela-Amieva M, Ibarra-González I. Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta Pediatr Mex.* 2009; 30: 258-63.
46. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem* 2012; 2012:282574.
47. Thiboonboon K, Leelahavarong P, Wattanasirichaigoon D, Vatanavicharn N, Wasant P, Shotelersuk V, et al. An economic evaluation of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry in Thailand. *PLoS One.* 2015; 10: 1-25.
48. Ombrone D, Giocaliere E, Forni G, Malvagia S, La Marca G. Expanded newborn screening by mass spectrometry: new tests, future perspectives. *Mass Spectrom Rev.* 2016; 35: 71-84.
49. Hara T, Nakashima Y, Sakai Y, Niship H, Motomura Y, Yamasaki S. Kawasaki disease: A matter of innate immunity. *Clin Exp Immunol.* 2016. 'Accepted Article'.
50. Crotty S, Gerişlioğlu S, Endres KJ, Wesdemiotis C, Schubert US. Polymer architectures via mass spectrometry and hyphenated techniques: A review. *Anal Chim Acta.* 2016; 932: 1-21.
51. Holcapek M, Kolárová L, Nobilis M. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 391: 59-78.
52. Ren S, Hinzman AA, Kang EL, Szczesniak RD, Lu LJ. Computational and statistical analysis of metabolomics data. *Metabolomics.* 2015; 11: 1492-513.

-
53. Mock DM, Quirk JG, Mock NI. Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75: 295-9.
54. Mock DM, Stadler D, Stratton S, Mock NI. Biotin status assessed longitudinally in pregnant women. *J Nutr* 1997; 127: 710-6.
55. Velázquez-Arellano A, Hernández-Esquivel MdeL, Sánchez RM, Ortega-Cuellar D, Rodríguez-Fuentes N, Cano S, et al. Functional and metabolic implications of biotin deficiency for the rat heart. *Mol Genet Metab.* 2008; 95: 213-9.
56. Rodríguez-Fuentes N, López-Rosas I, Román-Cisneros G, Velázquez-Arellano A. Biotin deficiency affects both synthesis and degradation of pyruvate carboxylase in rat primary hepatocyte cultures. *Mol Genet Metab.* 2007; 92: 222-8.
57. Hernández-Vázquez A, Ochoa-Ruiz E, Ibarra-González I, Ortega-Cuellar D, Salvador-Adriano A, Velázquez-Arellano A. Temporal development of genetic and metabolic effects of biotin deprivation. A search for the optimum time to study a vitamin deficiency. *Mol Genet Metab.* 2012; 107: 345-51.
58. Donti TR, Blackburn PR, Atwal PS. Holocarboxylase synthetase deficiency pre and post newborn screening. *Mol Genet Metab Rep.* 2016; 7: 40-4.
59. Grünert SC, Stucki M, Morscher RJ, Suormala T, Bürer C, Burda P, et al. 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: clinical, biochemical, enzymatic and molecular studies in 88 individuals. *Orphanet J Rare Dis.* 2012; 7:31.
60. Stratton SL, Horvath TD, Boqusiewicz A, Matthews NI, Henrich CL, Spencer HJ, et al. Urinary excretion of 3-hydroxyisovaleryl carnitine is an early and sensitive indicator of marginal biotin deficiency in humans. *J Nutr.* 2011; 141: 353-8.

61. Fraser JL, Venditti CP. Methylmalonic and propionic acidemias: clinical management update. *Curr Opin Pediatr*. 2016 [Publish Ahead of Print].

62. Makowski L, Noland RC, Koves TR, Xing W, Ilkayeva OR, Muehlbauer MJ, et al. Metabolic profiling of PPAR α -/- mice reveals defects in carnitine and amino acid homeostasis that are partially reversed by oral carnitine supplementation. *FASEB J*. 2009; 23: 586-604.

63. Ortega-Cuellar D, Hernandez-Mendoza A, Moreno-Arriola E, Carvajal-Aguilera K, Perez-Vazquez V, Gonzalez-alvarez R, et al. Biotin starvation with adequate glucose provision causes paradoxical changes in fuel metabolism gene expression similar in rat (*Rattus norvegicus*), nematode (*Caenorhabditis elegans*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2010; 3: 18-30.

64. Schwender J, König C, Klapperstück M, Heinzl N, Munz E, Hebbelmann I, et al. Transcript abundance on its own cannot be used to infer fluxes in central metabolism. *Front Plant Sci*. 2014; 5: 668.

65. Sas KM, Kayampolly P, Byun J, Nair V, Hinder LM, Hur J, et al. Tissue-specific metabolic reprogramming drives nutrient flux in diabetic complications. *JCI Insight*. 2016; 1: e86976.

66. Ochoa-Ruiz E, Díaz-Ruiz R, Hernández-Vázquez Ade J, Ibarra-González I, Ortiz-Plata A, Rembao D, et al. Biotin deprivation impairs mitochondrial structure and function and has implications for inherited metabolic disorders. *Mol Genet Metab*. 2015; 116: 204-14.

-
67. Xu B, Chen M, Ji X, Yao M, Mao Z, Zou K, et al. Metabolomic profiles reveal key metabolic changes in heat stress-treated mouse Sertoli cells. *Toxicol In Vitro*. 2015; 29: 1745-52.
68. Imperlini E, Santorelli L, Orrù S, Scolamiero E, Ruoppolo M, Caterino M. Mass spectrometry-based metabolomic and proteomic strategies in organic acidemias. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9210408.
69. Ribas GS, Manfredini V, de Mari JF, Wayhs CY, Vanzin CS, Biancini GB, et al. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of l-carnitine supplementation. *Int J Dev Neurosci*. 2010; 28: 127-32.
70. Dercksen M, Ijlst L, Duran M, Mienie LJ, van Cruchten A, van der Westhuizen FH, et al. Inhibition of N-acetylglutamate synthase by various monocarboxylic and dicarboxylic short-chain coenzyme A esters and the production of alternative glutamate esters. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842: 2510-6.
71. Maeda Y, Kawata S, Inui Y, Fukuda K, Igura T, Matsuzawa Y. Biotin deficiency decreases ornithine transcarbamylase activity and mRNA in rat liver. *J Nutr*. 1996; 126: 61-6.