



11262 4
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
UNIDAD DE GENETICA DE LA NUTRICION**

**"ACTIVIDAD DE LA BIOTINIDASA SERICA EN
LA DESNUTRICION ENERGETICO-PROTEICA"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A
JOSE LUIS ZARUR AGUILAR**

ASESOR

DR. ANTONIO VELAZQUEZ ARELLANO

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1991



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 está 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.

I N D I C E

RESUMEN

I. INTRODUCCION	página
Antecedentes	
1. Biotina	2
2. Biotinidasa	8
3. Deficiencia Múltiple de Carboxilasas	12
4. Desnutrición energético-protéica	13
5. Justificación	18
6. Planteamiento del problema	19
7. Objetivos	20
8. Hipótesis	21
9. Plan de trabajo	22
II. MATERIAL Y METODOS	23
10. Determinación de la actividad de biotinidasa	25
11. Extracción de linfocitos	29
12. Determinación de la actividad de PCC	35
13. Determinación de proteínas	40
14. Determinación de albúmina	42
III. RESULTADOS	45
IV. DISCUSION	73
V. CONCLUSIONES	77
VI. BIBLIOGRAFIA	78

RESUMEN

La biotina es cofactor de las carboxilasas en mamíferos. Se une a una lisina de estas enzimas mediante un enlace covalente. La biotinidasa es la enzima que cataliza la hidrólisis de la biotinil-lisina (biocitina), el producto de degradación de las carboxilasas y su deficiencia genética conduce a deficiencia de biotina en los pacientes afectados. Recientemente nosotros encontramos que también existe un déficit de esta vitamina en desnutrición energético-proteica (DEP) (Velázquez et al. Eur J Clin Nutr 43: 169-73, 1988) pero solo en algunos pacientes. Esto puede deberse parcialmente a la actividad de biotinidasa sérica, la cual puede estar por debajo de lo normal, debido a que muchas proteínas séricas, entre ellas la albúmina, están disminuidas en la DEP.

Con el fin de conocer la actividad de biotinidasa sérica en niños con DEP, averiguar si existe en ellos una relación de esta con el status de biotina y al mismo tiempo con la concentración de albúmina, se efectuaron las determinaciones correspondientes.

Se estudiaron 39 pacientes con DEP, 26 niños con marasmo y 13 con kwashiorkor. Los controles normales fueron 17 niños sanos de edad y sexo similar a los niños con desnutrición. La actividad de biotinidasa fue determinada por el método colorimétrico de Wolf. El status de biotina fue determinado

midiendo la actividad de la PCC por el método radioenzimático de Sweetman y la albúmina fue determinada usando verde de bromocresol y un autoanalizador.

La actividad de biotinidasa en los niños con kwashiorkor, se encontró más elevada que en los niños con marasmo e incluso que en los controles sanos, con un promedio de 11.96 nmolas \times min⁻¹ \times ml⁻¹ y una desviación estándar de 2.54; en los niños con marasmo el promedio fue de 7.35 con desviación estándar de 2.22 y en los controles sanos de 8.08 con desviación de 1.51. La albúmina tal como se esperaba se encontró más baja en los niños con kwashiorkor que en los niños con marasmo, mientras que en los niños sanos, se encontró normal. El promedio de concentración de albúmina en niños con kwashiorkor fue de 2.16 con desviación estándar de 0.86; en niños con marasmo, fue de 2.81 con desviación estándar de 0.60 y en los niños sanos, el promedio fue de 3.83 con desviación de 0.24. Al analizar el comportamiento de la PCC, se obtuvieron los siguientes datos: en niños con kwashiorkor, la actividad se encontró en límites normales, en niños con marasmo, se encontró por debajo de la actividad que presentan los controles (260-580 pmolas 14 CO₂ fijadas \times min \times mg de proteína).

Al analizar la actividad de biotinidasa, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de kwashiorkor y los grupos de marasmo y normales y solo entre el grupo de marasmo y sanos, no existe diferencia estadística significativa (análisis de varianza y prueba de

comparación múltiple de medias). No existe correlación entre la actividad de biotinidasa y la concentración de albúmina (r de Pearson) y si hay correlación entre la actividad de PCC y la actividad de biotinidasa en niños con DEP (r de Pearson).

Estos resultados cuestionan una posible contribución de la biotinidasa sérica a una probable deficiencia de biotina en la DEP. No está clara la razón para este incremento paradójico en la actividad de biotinidasa en kwashiorkor. Puede deberse a un aumento de moléculas de biotinidasa por liberación de los tejidos dañados, o bien, si el número de moléculas estuviera disminuido o incluso igual, el incremento en la actividad enzimática, podría deberse a disminución de inhibidores de la enzima (péptidos biotinilados) que normalmente se encuentran presentes en individuos sanos.

I. INTRODUCCION

1. Antecedentes

Biotina.

El descubrimiento de la biotina es el resultado de tres líneas independientes de investigación con un denominador común: estudios sobre los efectos de una deficiencia nutricional. La primera pista de un factor nutricional para las levaduras, fue dada por Wildiers en 1901, seguida por Boas en 1927 para las ratas y por Allison y cols. en 1933 para las bacterias (1).

En 1901, E. Wildiers hizo una observación importante, que las levaduras no solo requieren sales y azúcar para su crecimiento, sino también extracto de carne y levadura. El factor requerido para este crecimiento fue llamado "bios", e inmediatamente se iniciaron esfuerzos para su aislamiento.

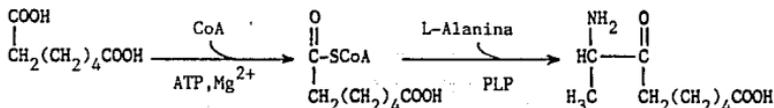
El primer factor llamado "bios I", fue posteriormente identificado como meso-inositol. El factor "bios IIA" resultó ser el ácido pantoténico. El tercer componente de la mezcla bios, el "bios IIB", fue aislado de la yema de huevo y cristalizado por F. Kogl en 1936. A este factor, él le llamó biotina (2).

El descubrimiento de la biotina fue ayudado por otra observación, realizada por F. Steinitz en 1898, de que los huevos crudos en la dieta de los animales, les resultaban ser tóxicos, y que las lesiones en la piel causadas por esta dieta podían ser curadas mediante tratamiento a base de un factor termo-estable el cual se encontraba presente en las levaduras o en el hígado. Este factor fue llamado "vitamina H" (esto por "Haut" que en alemán significa piel). Pasaron muchos años para que E.E. Snell en 1941, descubriera que la avidina, un antagonista de la biotina, es la causa de la toxicidad de los huevos crudos.

P. Gyorgy, en 1939 encontró que la "vitamina H", era en realidad biotina (3).

La estructura de la biotina fue determinada en 1942 por V. du Vigneaud (4) y confirmada por la síntesis total (K. Folkers, en 1943) y análisis de rayos X (W. Traub, en 1956).

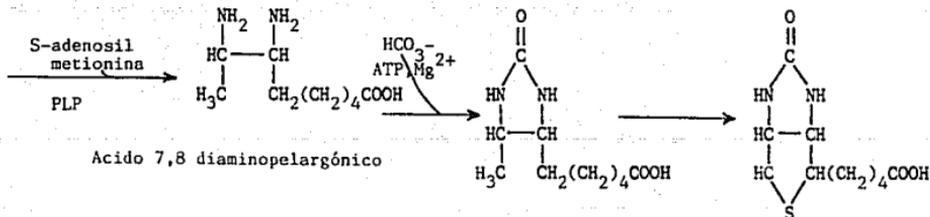
La primera información de la biosíntesis de la biotina fue obtenida probablemente por du Vigneaud en 1942, quien mostró que en el *Corynebacterium diphtheriae*, la biotina podía ser reemplazada como un factor de crecimiento por el ácido pimélico. Al mismo tiempo, se encontró que la síntesis de biotina en el *Aspergillus niger*, era fuertemente estimulada por dicho ácido. Esto permitió que se postulara en forma correcta que el ácido pimélico estaba involucrado en la biosíntesis de biotina. Ahora se conoce que la secuencia biosintética de la biotina en la mayoría de los microorganismos incluye las siguientes reacciones:



Acido Pimélico

Pimeloil-CoA

Acido 7 oxo 8 aminopelargónico



Acido 7,8 diaminopelargónico

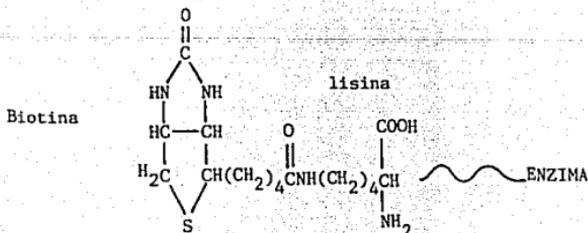
Detiobiotina

Biotina

La biotina se encuentra en muchos alimentos, aunque en concentraciones muy bajas: leche, hígado, riñón, yema de huevo y algunos vegetales. La biotina natural se encuentra parcialmente en forma libre (vegetales, frutas, leche) y parcialmente unida a proteínas (tejidos animales, levaduras) (5).

Esta vitamina hidrosoluble, participa en diversas reacciones esenciales en el organismo humano. Actúa como cofactor de las enzimas que catalizan las cuatro reacciones de carboxilación en las células de mamíferos. Tres de estas enzimas se encuentran localizadas en la mitocondria: propionil CoA carboxilasa (PCC), piruvato carboxilasa (PC) y 3-beta-metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC). Una más, la acetil CoA carboxilasa (ACC), está en el citosol.

La biotina se une a un residuo de lisina de las apocarboxilasas mediante un enlace covalente entre el grupo carboxilo de la porción alifática de la biotina y el grupo épsilon-amino de la lisina. Esta unión requiere de una enzima llamada sintetasa de holocarboxilasas (SH). La especificidad de esta enzima para la biotina es muy alta, con una K_m de 4.2×10^{-7} M (6).



Parece existir solo una sintetasa de holocarboxilasas para todas las carboxilasas. La SH de mamíferos ha sido solo parcialmente caracterizada. Chiang y Mistry (7) fueron los primeros en demostrar que la sintetasa localizada en el citosol puede activar igualmente a la apopiruvato carboxilasa (enzima mitocondrial) como a la apoacetil CoA carboxilasa (enzima citosólica), sugiriendo esto que una sintetasa de holocarboxilasas puede activar a todas las apocarboxilasas.

La PCC ha sido aislada y purificada de homogenados de mitocondrias de corazón de cerdo (8,9), de mitocondrias de riñón de res (10) y de hígado humano (11). Más recientemente esta enzima ha sido purificada del hígado de la oveja (12). En todos los casos, se ha encontrado que la enzima consiste de 2 subunidades no-identicas; la que tiene el peso molecular más elevado es la que transporta la molécula de biotina. En la PCC de hígado humano, la subunidad que contiene a la biotina tiene un peso molecular de 72,000 (subunidad alfa) y la subunidad libre de biotina tiene un peso molecular de 56,000 (subunidad beta). La PCC está involucrada en el catabolismo de aminoácidos (isoleucina, valina, treonina y metionina), al igual que en el del colesterol y en el de los ácidos grasos de cadena impar.

La PC aislada de tejidos animales es una enzima tetramérica. Está compuesta de subunidades similares o idénticas y cada polipéptido contiene una molécula de biotina. La PC cataliza la conversión de piruvato a oxaloacetato en la gluconeogénesis y en la anaplerosis del ciclo de Krebs.

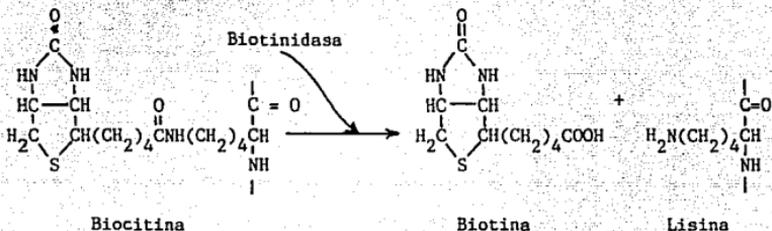
La MCC está compuesta de dos subunidades no idénticas, la A con peso molecular de 61,000 y la B con peso molecular de 73,500. La más grande es la que transporta la molécula de biotina. La MCC es necesaria para la degradación de la leucina.

La cuarta enzima dependiente de biotina es la acetil CoA carboxilasa (ACC). Esta enzima cataliza la síntesis de malonil CoA, que es uno de los pasos limitantes de la síntesis de ácidos grasos (13). La ACC tiene una estructura compleja, sujeta a regulación alostérica, particularmente por el citrato. La enzima de tejidos animales puede encontrarse en un estado protomérico, catalíticamente inactiva, y en estado polimérico, el cual es el estado activo de la enzima. El citrato favorece la formación de polímeros. La forma polimérica puede ser disociada en protómeros, los cuales están compuestos de 4 polipéptidos de diferente peso molecular: 117,000, 129,000 y 139,000. La biotina se asocia con los polipéptidos con peso molecular de

117,000 (14). Sin embargo, recientemente se ha observado (15) que la ACC protomérica es catalíticamente activa, si bien se piensa que el citrato es necesario para la activación y polimerización.

Biotinidasa.

La biotinidasa es la enzima que cataliza la hidrólisis del producto de degradación de las carboxilasas: biocitina (épsilon-n-biotinil-L-lisina); los productos de esta hidrólisis son biotina y lisina (16).



La biotinidasa fue descrita inicialmente por Thoma y Peterson en 1954 los cuales identificaron una enzima en el hígado y riñón del cerdo capaz de convertir la biotina unida a proteínas a biotina libre. Ellos propusieron el nombre de "biotinidasa" para esta enzima (17). Durante el mismo año, Wright y cols. (16) observaron una enzima similar en el

plasma humano que hidrolizaba la biocitina. En 1963, Koivusalo y cols. purificaron la biotinidasa de la bacteria, *Streptococcus faecalis* (18).

En 1963, Koivusalo y Pispa estudiaron la distribución de la actividad de biotinidasa en los tejidos animales. La actividad de biotinidasa en el suero de la rata fue de la misma magnitud que en el suero humano. Considerablemente menor actividad fue detectada en el suero obtenido de cobayos y de conejos. El hígado e intestino de rata mostraron tener una actividad relativamente alta (19).

Pispa, en 1965, purificó parcialmente la biotinidasa del suero e hígado del cerdo; encontró que la actividad de biotinidasa era mas alta en el hígado, riñón, intestino y suero de los cerdos, ratas, gatos y humanos. Los animales carnívoros mostraron actividades más altas que los animales herbívoros (20).

Más recientemente, la biotinidasa ha sido purificada del plasma y suero humano (21-23). La biotinidasa humana ha mostrado ser una glicoproteína que contiene residuos de ácido siálico (22,24).

Estudios de ratas hepatectomizadas y ratas tratadas con tetracloruro de carbono sugieren que la biotinidasa se sintetiza primariamente en el hígado (20). Estudios in vivo de la actividad de biotinidasa en individuos con cirrosis hepática y estudios in vitro de cultivos de hepatocitos de rata confirman este hallazgo (25). Estudios de fraccionamiento subcelular indican que la biotinidasa se localiza en las fracciones microsomal y nuclear de los hepatocitos (20,24). Se ha propuesto que la biotinidasa se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso, es sialilada en el aparato de Golgi y finalmente es secretada al plasma donde actúa sobre la biocitina o sobre pequeños péptidos biotinilados (24). La actividad específica relativamente alta de la biotinidasa en el suero es consistente con esta teoría.

Esta enzima es indispensable para la utilización tanto de la biotina unida a proteínas, proveniente de los alimentos, como de la endógena producto del recambio de las carboxilasas. La enzima humana tiene un pH óptimo amplio (pH 5-7), y es específica para el residuo biotinil de varios sustratos. hidrolizando las uniones amidas o éster.

El peso molecular de la enzima se encuentra entre 68,000 y 76,000 daltones; migra a la región alfa -1 por electroforesis del suero (19). Muestra una banda única de proteína en electroforesis en gel y poliacrilamida (21,22).

Estos hallazgos sugieren que la biotinidasa se compone de un polipéptido único.

Estudios usando inhibidores de grupos tiol y serina indican que esos grupos son esenciales en el, o cerca del sitio activo de la enzima (20,21).

La actividad de biotinidasa en suero y homogenado de tejidos ha sido determinada midiendo la liberación de biotina de la biocitina (16,19) y de compuestos aminocromofóricos de los sustratos biotinil-amino (26,20) como el sustrato artificial, n-biotinil-p-aminobenzoato. Las K_m de la biotinidasa sérica para el sustrato artificial y para el sustrato natural (biocitina) se encuentran en un intervalo de 5 a 10 μM (21,22).

Deficiencia Múltiple de Carboxilasas

La deficiencia genética de biotinidasa ocasiona carencia de biotina y ésta a su vez conduce a deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC), caracterizada por erupción cutánea, alopecia, convulsiones, ataxia y ocasionalmente retraso en el desarrollo psicomotor (13,27). La deficiencia de biotinidasa usualmente se presenta después de los 3 meses de edad.

Existe otra forma genética de DMC, causada por defectos de la SH, en la que los síntomas usualmente aparecen en los primeros días de vida, incluyendo vómitos, letargo, hipotonía y evolución a un cuadro muy grave y muerte (28). Ambos tipos de DMC responden satisfactoriamente a la administración de grandes cantidades de biotina.

Además de las formas genéticas, la DMC puede tener un origen nutricional, en sujetos que ingieren grandes cantidades de la proteína avidina (que une muy fuertemente a la biotina y que está presente en la clara de huevo); en pacientes con alimentación parenteral total prolongada con insuficiente biotina; en pacientes con hemodiálisis prolongada (29) y en sujetos con terapia anticonvulsivante prolongada -primidona y carbamazepina- (30).

Desnutrición Energético-protéica

Recientemente se ha utilizado el término de desnutrición energético-protéica (DEP) para sustituir la denominación anterior de desnutrición calórica protéica y describir un grupo de enfermedades que frecuentemente afectan a los niños que viven en comunidades pobres de los países en vías de desarrollo.

La DEP es básicamente sistémica e inespecífica por cuanto afecta -en grado variable- a todas y a cada una de las células del organismo y se instala cuando el balance negativo de alguno de los componentes del complejo nutricio desencadena una alteración metabólica que afecta al resto de los componentes. Como consecuencia, la sintomatología de este estado patológico es extraordinariamente diversa; prácticamente no tiene límite, y aún en el terreno de lo bioquímico existe la posibilidad teórica de que en algún momento, cada una de las diversas funciones del organismo, se vea afectada.

La desnutrición tradicionalmente se ha clasificado en tres grados: (31)

a. Desnutrición de primer grado. Puede ser aguda, subaguda o crónica. Es la más frecuente. Se incluyen pacientes con peso poco afectado (10-25%) que, en los casos crónicos, se encuentra en equilibrio aceptable con la talla; estos enfermos no muestran edema ni alteraciones ostensibles de mucosas, piel o estructuras accesorias.

b. Desnutrición de segundo grado. Puede ser subaguda o crónica. Resulta menos frecuente que la anterior. Los enfermos con una desnutrición de segundo grado no presentan edema y su piel muestra escasas modificaciones a simple vista -piel seca e hipercrómica-. La pérdida de peso es mayor que en el caso anterior (25-40%).

c. Desnutrición de tercer grado. Es una condición necesariamente crónica, aunque en ella se establezcan frecuentemente episodios agudos los cuales originan la muerte del enfermo. En el terreno clínico este tipo de desnutrición puede manifestarse en diversas formas, cuyos extremos son dos formas diametralmente opuestas: desnutrición crónica avanzada sin edema ni lesiones muy ostensibles de la piel y mucosas, y desnutrición crónica avanzada con edema y lesiones extensas e intensas de la piel y mucosas. La pérdida de peso es de más del 40% .

Conviene aclarar la connotación de algunas denominaciones para los casos extremos de desnutrición:

† Marasmo. Se consideran marasmáticos a los niños muy gravemente desnutridos y sin edema, ya que su principal característica es la ausencia de panículo adiposo; la piel es uniformemente queratósica y descama en forma tórpida y furfurácea. Las lesiones en mucosas son muy poco conspicuas. Generalmente se presenta en lactantes menores de un año.

† Kwashiorkor. Bajo este término son clasificados los niños con desnutrición grave, con edema y lesiones acentuadas de la piel. El panículo adiposo existe en cantidad variable y el edema es un signo característico de estos enfermos, que con frecuencia enmascara la magnitud del déficit ponderal. Las lesiones de la piel son discrómicas y queratósicas; a veces revisten un aspecto pelagroide, otros, el de gota de esmalte, o bien se sitúan sobre trazos previos de piel marmórea o sobre lesiones anteriores de púrpura. Las alteraciones de las mucosas son de diversidad muy grande y de diferente grado de intensidad; las faneras están necesariamente afectadas. Generalmente se presenta en niños en edad preescolar (31).

Los niños marasmáticos, si bien presentan manifestaciones clínicas diferentes a los niños con kwashiorkor, tienen semejante patrón electrolítico y funcionamiento renal que éstos, y, aunque también en el marasmo se observa reducción del total de las proteínas plasmáticas, esta es menor, especialmente en relación a la albúmina.

La albúmina se encuentra a partes iguales dentro y fuera del espacio vascular y para que su concentración en el plasma se mantenga constante, debe serlo también en el espacio extravascular. De las alteraciones bioquímicas que se observan en la desnutrición, la hipoalbuminemia es la más característica (31). Cohen y Hansen (32) encuentran que la albúmina total del organismo se reduce hasta en un 50% en los enfermos con kwashiorkor, siendo la reducción proporcionalmente mayor en el espacio extravascular que en el intravascular.

Algunas de las manifestaciones de deficiencia de biotina son similares a las observadas en algunos pacientes con desnutrición energético-proteica (DEP) de tercer grado, particularmente niños con kwashiorkor. Aunado a lo anterior, es importante mencionar que Wolff (33) ha comunicado la existencia de anomalías de lípidos en membranas de eritrocitos y en suero de niños desnutridos, que él propuso que podrían ser debidas a deficiencia de biotina, principalmente en niños con kwashiorkor. Más recientemente,

en nuestro laboratorio, demostramos la deficiencia de esta vitamina en niños con desnutrición energético-proteica; a este respecto, es interesante señalar que no todos los desnutridos que estudiamos tuvieron deficiencia de biotina (34).

Como ya se mencionó, Wolf (35) ha reportado que en individuos con cirrosis hepática la actividad de biotinidasa sérica se encuentra por debajo de los límites normales. Esta observación es de interés para los estudios sobre desnutrición, ya que en estos pacientes existe una alta correlación entre esta actividad y la concentración de otras proteínas séricas, en particular la albúmina, la cual también se encuentra disminuida en ellos.

2. Justificación

Se puede suponer que en la desnutrición energético-protéica (DEP), la biotinidasa sérica se encuentra más baja que en los niños sanos, tal como sucede con muchas otras proteínas del suero, entre ellas la albúmina. Esto podría contribuir a la deficiencia de biotina, especialmente si, como ha sido propuesto por Wolf (36), el reciclamiento de esta vitamina se lleva a cabo principalmente en el torrente sanguíneo. Así, la desnutrición energético-protéica podría considerarse, probablemente, una fenocopia nutricional de la deficiencia genética de biotinidasa. Y si, al igual que la albúmina, la biotinidasa sérica estuviese aún más baja en kwashiorkor que en marasmo, entonces esto podría explicar el por qué las manifestaciones clínicas y bioquímicas sugestivas de deficiencia de biotina son más frecuentes en el primero de estos dos tipos de DEP.

3. Planteamiento del problema

Con base en lo anteriormente citado, se plantearon las siguientes interrogantes:

a. ¿Es diferente la actividad de biotinidasa sérica en niños con desnutrición energético-protéica que en niños sanos?

b. ¿Es menor la actividad de la biotinidasa sérica en niños con kwashiorkor que en niños con marasmo?

c. ¿Existe una asociación entre la actividad de biotinidasa sérica y la concentración de albúmina en suero de niños con desnutrición energético-protéica?

d. ¿Existe una asociación entre la actividad de biotinidasa sérica y el estado nutricional de biotina en niños con desnutrición energético-protéica?

4. Objetivos

a. Conocer la actividad de biotinidasa sérica en niños con desnutrición energético-protéica.

b. Conocer la actividad de la biotinidasa sérica en niños con kwashiorkor y en niños con marasmo.

c. Conocer si existe relación entre la actividad de biotinidasa sérica y la concentración de albúmina en suero de niños con desnutrición energético-protéica.

d. Averiguar si existe una relación entre la actividad de biotinidasa en suero y el estado nutricional de biotina en niños desnutridos, estimado por medio de la actividad de la PCC de linfocitos de sangre periférica.

5. Hipótesis

a. La actividad de biotinidasa sérica es diferente en niños con desnutrición energético-proteica que en niños sanos.

b. La actividad de la biotinidasa sérica es menor en niños con kwashiorkor que en niños con marasmo.

c. Existe una correlación positiva entre la actividad de biotinidasa sérica y la concentración de albúmina en suero de niños con desnutrición energético-proteica.

d. Existe una correlación positiva entre la actividad de biotinidasa sérica y el estado nutricional de biotina de niños desnutridos, estimado por medio de la actividad de la PCC de linfocitos de sangre periférica.

6. Diseño del estudio

Se trata de un estudio prolectivo, observacional y transversal.

7. Plan de trabajo

El plan de trabajo se llevó a cabo de la siguiente manera:

- elaboración del protocolo
- captación y selección de la muestra definida
- toma y procesamiento de las muestras
- determinación de la actividad de biotinidasa sérica
- determinación de la actividad de PCC en linfocitos
- determinación de la concentración de albúmina sérica
- análisis e interpretación de los resultados
- análisis estadístico
- manejo e interpretación de la bibliografía
- comparación de la bibliografía con los resultados obtenidos
- elaboración de conclusiones

II. MATERIAL Y METODOS

SUJETOS

Se estudiaron a 39 pacientes con desnutrición energético-protéica: 26 niños con marasmo y 13 niños con kwashiorkor. Dos de los pacientes con kwashiorkor, en particular uno de ellos, y ninguno de los afectados con marasmo, tuvieron manifestaciones clínicas sugestivas de deficiencia de biotina: alopecia, dermatitis periorificial y datos neurológicos como irritabilidad y/o letargo.

Los controles normales fueron 17 niños sanos de edad y sexo similares a los de los niños con desnutrición; acudieron al hospital para ser sometidos a cirugía electiva (estrabismo, fimosis o hernia).

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

1. Niños con DEP y con diagnóstico de kwashiorkor que ingresaron al servicio de nutrición del INP, no importando el sexo.

2. Niños con DEP y con diagnóstico de marasmo que ingresaron al servicio de nutrición del INP, sin importar el sexo.

3. Niños sanos que acudieron a la sección de toma de productos del INP para cirugía electiva, de edad y sexo similares a los de los niños con DEP.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

Niños con DEP (kwashiorkor o marasmo) que fueran transfundidos antes de la toma de la muestra.

Tamaño de la muestra

Esta consistió en los niños con kwashiorkor y con marasmo que ingresaron al servicio de nutrición del INP del mes de Enero de 1969 al mes de Julio de 1990 y que no correspondieron al criterio de exclusión antes señalado.

MÉTODOS

1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE BIOTINIDASA

Para determinar la actividad de biotinidasa, se utilizó el método descrito por Wolf (37), que mide colorimétricamente el p-aminobenzoato producto de la hidrólisis del sustrato artificial N-biotinil-p-aminobenzoato.

1.1 Reactivos

1.1.1. Solución amortiguadora de fosfato de potasio: 1 M

Se disuelven 13.61 g de fosfato monobásico (J.T. Baker) en 100 ml de agua destilada y posteriormente se ajusta a pH de 6.0 con el fosfato de potasio dibásico (J.T. Baker) disuelto en agua destilada (3.40 g en 20 ml). Conservar en refrigeración.

1.1.2. Solución de EDTA -ácido etilendinitrilotetracético- :
0.2 M

Disolver 7.444 g de EDTA (Merck) en 100 ml de agua
destilada. Conservar en refrigeración.

1.1.3. Solución de albúmina bovina al 0.5% :

Disolver 500 mg de albúmina bovina (Sigma) en 100 ml de agua
destilada. Conservar en refrigeración.

1.1.4. Solución de PAB (p-aminobenzoato): 1.5 mM

Disolver 11.932 mg de PAB (Sigma) en 50 ml de agua
destilada. Conservar en refrigeración.

1.1.5. Acido tricloroacético al 30% -TCA- (J.T. Baker).
Mantener a temperatura ambiente.

1.1.6. Solución de ácido N-biotinil-p-aminobenzoato: 1.5 mM

Disolver 10 mg de ácido N-biotinil-p-aminobenzoato (Sigma)
en 17.30 ml de agua destilada. Conservar en refrigeración.

1.1.7. Nitrito de sodio al 0.1% :

Disolver 0.01 g de nitrito de sodio (Sigma) en 10 ml de agua destilada. Esta solución se prepara inmediatamente antes de usar.

1.1.8. Sulfamato de amonio al 0.5% :

Se disuelven 500 mg de sulfamato de amonio (Sigma) en 100 ml de agua destilada. Conservar en refrigeración.

1.1.9. Solución de Hidroclorhidro-N-1-naftil etilendiamino - HNED- al 0.1% :

Disolver 100 mg de HNED (Sigma) en 100 ml de agua destilada. Conservar en refrigeración.

1.2 Técnica para determinar la actividad de biotinidasa

Posterior a una preincubación de 15 minutos a 37 grados centígrados, la prueba enzimática se inició agregando 0.1 ml de suero a 1.9 ml de una mezcla que contiene 200 μ mol de solución amortiguadora de fosfato de potasio -pH 6-, 20 μ mol de EDTA -ácido etilendinitrilotetracético-, 0.5 mg de albúmina bovina y 0.3 μ mol de N-biotinil-p-aminobenzoato, llevando el volumen final a 2 ml. Esta mezcla se incubó por 60 minutos a 37 grados centígrados y la reacción se detuvo agregando 0.2 ml de ácido tricloroacético al 30% ; en seguida la mezcla se centrifugó a 3000 RPM por 10 minutos. Posteriormente a 1.5 ml del sobrenadante se le agregó 0.5 ml de agua y se procedió a realizar la reacción de color, para lo cual a intervalos de 3 minutos se agregaron los siguientes reactivos: 0.2 ml de nitrito de sodio al 0.1% , 0.2 ml de sulfamato de amonio al 0.5% y 0.2 ml de hidroclorehidro N-1-naftil etilendiamino (HNED) al 0.1%. Posteriormente con un intervalo de 10 minutos se procedió a la medición colorimétrica del p-aminobenzoato liberado (546 nm).

La actividad de biotinidasa se expresa como nmolas de p-aminobenzoato liberado por minuto y por ml de suero.

2. EXTRACCION DE LINFOCITOS

2.1 Reactivos

2.1.1. Anticoagulante: ACD -ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa- a pH de 5.0

- a. Citrato trisódico (J.T. Baker): 2.5 g
- b. Acido cítrico (J.T. Baker): 0.798 g
- c. Dextrosa anhidra (J.T. Baker): 2.45 g
- d. NaCl (J.T. Baker): 0.9 g

Se afora la solución a 100 ml con agua destilada y se ajusta a pH de 5.0. El ACD se esteriliza por filtración usando un filtro Millipore con poro de 0.2 micras. Se conserva en refrigeración.

La cantidad usada de ACD es de 380 μ l por cada 3 ml de sangre.

2.1.2. Solución amortiguadora de tris salina modificada (TBS)

- a. Tris-HCl (Sigma): 1.82 g
- b. NaCl (J.T. Baker): 9.0 g
- c. EDTA (J.T. Baker): 20.0 ml

Se disuelven los reactivos en 900 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 7.4 con ácido clorhídrico, se afora a 1000 ml con agua destilada. Se conserva en refrigeración.

2.1.3. Ficoll-Hypaque

- a. Diatrizoato de sodio (Sigma): 20.0 g
- b. Ficoll (Sigma): 12.2 g

Se disuelven los reactivos en 190 ml de agua destilada y se mide la densidad ajustándola a 1.077 g/ml con agua, hasta tener un volumen de 200 ml. Se conserva en refrigeración.

2.1.4. Medio mínimo esencial

- a. Medio mínimo esencial eagle (Gibco): 9.8 g
- b. Bicarbonato de sodio (J.T. Baker): 2.2 g
- c. Piruvato de sodio (Sigma): 0.1 g
- d. Glutamina (Sigma): 12.0 ml
- e. Antibióticos 100% 20.0 ml

* Solución concentrada de antibióticos

- a. Estreptomina (Lakeside): 2.0 g
- b. Unidades de penicilina (Lakeside): 2 x 10⁶
- c. Agua bidestilada: 200 ml

El medio mínimo esencial se esteriliza por filtración usando un filtro Millipore con poro de 0.22 micras. Se conserva en refrigeración.

2.2 Técnica para extracción de linfocitos

Los linfocitos se aislaron a partir de 3 ml de sangre venosa, la cual se colocó inmediatamente en tubos de centrifuga de 15 ml con 380 μ l de ACD, mezclándose suavemente y manteniéndose a temperatura ambiente.

La muestra se centrifugó durante 15 minutos a 1200 RPM, al término de la centrifugación se retiró el plasma el cual fue dividido en alícuotas de 300 μ l en tubos Eppendorf para posteriormente congelarse.

Al paquete globular que quedó en el tubo se le adicionó un volumen de TBS a temperatura ambiente igual al del plasma retirado, evitando producir hemólisis para tener finalmente una dilución 1:1.

En tubos de centrifuga de 15 ml se colocaron 4 ml de ficoll-hypaque 1077 y sobre él se agregó la sangre diluida, evitando su mezcla. Al terminar de agregar la mezcla, se observaron dos fases: la inferior incolora (ficoll-hypaque) y la superior roja (sangre). Se centrifugó durante 30 minutos a 1600 RPM y al terminar esto se observaron en los tubos 4 fases: plasma y TBS, linfocitos, ficoll-hypaque y eritrocitos.

Posteriormente con una pipeta pasteur se retiró y desechó la primera fase de plasma hasta aproximadamente 0.5 cm de la banda opaca de linfocitos, la cual se colectó y se transfirió a otro tubo de centrifuga de 15 ml al cual se le agregaron 15 ml de TBS, se mezcló suavemente y se dividió en dos tubos donde se lavaron las células dos veces con 10 a 15 ml de TBS centrifugando a 1200 RPM por 15 minutos en cada lavado, con el fin de concentrar en el fondo los linfocitos, retirando después el sobrenadante.

En una campana de flujo laminar se agregó a cada tubo 2.5 ml de medio mínimo esencial (MEM) uno sin biotina y otro con una concentración de biotina de 400 nM. Se resuspendieron las células con pipeta pasteur. La incubación se llevó a cabo en un incubador con atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C durante 2 horas, con el objeto de que la biotina del medio penetrara a las mitocondrias de las células y fuese utilizada como cofactor estimulando la actividad de las carboxilasas.

Finalizada la incubación se lavaron los linfocitos con TBS para eliminar el exceso de medio de cultivo y se centrifugaron a 1200 RPM durante 15 minutos, retirando después el sobrenadante; en el fondo del tubo se concentraron los linfocitos y eritrocitos.

Una vez retirado el sobrenadante, se adicionaron 300 μ l de agua helada para dar un choque hipotónico e hipotérmico y de esta manera lisar los eritrocitos remanentes, agitándose en vórtex durante 30 segundos cada tubo. Se recuperaron los linfocitos y se colocaron en un tubo Eppendorf volviendo a lavar con TBS y se centrifugó a 1800 RPM por 5 minutos; se desechó el sobrenadante secándose posteriormente las paredes del tubo y con la boca del mismo hacia abajo, se congelaron los linfocitos a -70°C hasta el día del ensayo enzimático.

2.3 Lisado de linfocitos

Para la preparación del homogenado celular, los linfocitos se descongelaron justo antes del ensayo enzimático y se colocaron en hielo, se diluyeron con 300 μ l de buffer de lisis y se resuspendieron muy bien con una pipeta pasteur.

La ruptura de los linfocitos para dejar libres las carboxilasas mitocondriales, se lleva a cabo mediante sonicación descargando en cada tubo 20 pulsos de 0.5 segundos con un descanso intermedio de 40 segundos, manteniendo los tubos en hielo.

3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PCC

Para la determinación de la actividad de PCC, se empleó el método utilizado por Sweetman (38), el cual se basa en la incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ del bicarbonato de sodio radiactivo en el sustrato apropiado para dar un producto marcado por un isótopo radiactivo (^{14}C) el cual puede ser cuantificado en un contador de centelleo líquido, mientras que el bicarbonato radiactivo que no reaccionó es eliminado como $^{14}\text{CO}_2$.

Esta determinación fue utilizada como un indicador del estado nutricional de biotina (34).

3.1 Reactivos

3.1.1. Solución amortiguadora de Tris 8X :

- a. Tris (Sigma): 9.69 g
- b. MgCl (J.T. Baker): 4.8 ml solución concentrada 1 M
- c. KCl (J.T. Baker): 2.98 g
- d. EDTA (J.T. Baker): 4.0 ml solución concentrada 0.1 M

Se disuelven los reactivos en 90 ml de agua destilada, ajustando el pH a 8.0 con ácido clorhídrico. Se afora la solución a 100 ml con agua destilada. Para conservar la solución amortiguadora se divide en alícuotas de 10 ml y se mantiene en congelación.

3.1.2. n-Propionil Coenzima A (PCoA)

Disolver 27.6384 mg de PCoA en 1.5 ml de agua destilada. Para conservar la solución se divide en alícuotas de 0.5 ml y se mantiene en congelación. Cuando se utilice, se descongela en hielo.

3.1.3. Solución concentrada BX + ATP + glutatión reducido (GSH)

- a. ATP (Sigma): 0.0144 g
- b. GSH (Sigma): 0.0061 g
- c. Solución amortiguadora Tris BX: 1.0 ml

La solución amortiguadora tris BX se descongela a temperatura ambiente, se mezclan los reactivos perfectamente y se dejan en hielo para su uso inmediato en el ensayo enzimático.

3.1.4. Solución de centelleo (Solución Bray)

- a. Naftaleno (J.T. Baker): 180 g
- b. PPD (New England): 12 g
- c. Etilenglicol (Sigma): 60 ml
- d. Metanol (Merck): 300 ml
- e. Dioxano cbp (J.T. Baker): 3000 ml

Agregar cada uno de los reactivos con agitación hasta la completa disolución del naftaleno y el PPD. Mantener a temperatura ambiente en un frasco ámbar para evitar quimioluminiscencia.

3.1.5. Bicarbonato de sodio radiactivo

- a. Actividad específica: 7.7 microCi/micromol
- b. Molaridad: 0.1
- c. Isótopo radiactivo: ^{14}C

3.2 Técnica para la determinación de la actividad enzimática de PCC

Las células en las que se realiza este ensayo son linfocitos por su gran contenido de mitocondrias y fácil obtención. En tubos Eppendorf previamente marcados para reconocer los blancos y los problemas de cada enzima, se le adiciona a cada uno 10 μ l de la mezcla de reacción correspondiente (manteniendo los tubos y reactivos en hielo). Estas mezclas contienen en volúmenes iguales los siguientes reactivos:

Reactivos	blanco PCC (μ l)	PCC (μ l)
Agua	25	25
Stock BX+ATP+GSH	25	25
CoAs o Agua	25 (agua)	25 (PCoA)
Bicarbonato de sodio radiactivo	25	25
		(55x10 dpm)
Volumen total	100	100

Una vez que se tienen preparados los tubos con las mezclas de reacción, se prepara el homogenado de linfocitos e inmediatamente se adicionan 10 μ l de las células sonicadas a cada tubo que contiene la mezcla de reacción, después de

mezclar y tapar los tubos, para evitar la evaporación del bicarbonato, se incuba en baño maría durante una hora a 30°C con agitación.

Posteriormente la reacción se detiene metiendo los tubos en hielo y se adiciona a cada tubo 10 µl de ácido fórmico al 15% ,se mezcla muy bien y se espera 15 minutos.

Se recorta papel Whatmann de 3mm para cromatografía, en tiras que contengan cuadros de 3 x 3 cm y se marcan con el número de cada tubo; aplicar en el centro de cada cuadro 25 µl de su correspondiente mezcla. Se deja secar 15 minutos y se adicionan 30 µl de ácido fórmico al 15% a cada muestra y se seca el papel con una pistola de aire durante 30 minutos. Posteriormente se corta el papel en pequeños fragmentos y se coloca en viales de vidrio con 1 ml de agua destilada en cada uno para eluir la muestra y se agrega 5 ml de solución Bray. Se agita vigorosamente y se pone a contar en el contador de centelleo líquido, 10 minutos, cada vial, el isótopo ^{14}C y el standard externo.

Es necesario medir proteínas en las células sonicadas para poder reportar la actividad específica en pmolas de $^{14}\text{CO}_2$ fijado por minuto por mg de proteína. (Método de Lowry) (39).

4. DETERMINACION DE PROTEINAS (LOWRY)

4.1 Reactivos

a. Carbonato de sodio (J.T. Baker): 20 g

b. Hidróxido de sodio (J.T. Baker): 4 g

Disolver los reactivos en agua destilada y aforar a 10 ml.

* Sulfato cúprico al 1% : Pesar 1 g de sulfato cúprico y disolverlo en agua destilada. Aforar a 100 ml.

* Tartrato de sodio y potasio al 2% : 2 g de tartrato de sodio y potasio se disuelven en 100 ml de agua destilada.

* Albúmina sérica bovina (BSA): Pesar 100 g de BSA y adicionar 100 ml de agua destilada. Hacer alicuotas en pequeños volúmenes y conservar a -20°C

4.2 Técnica de Lowry para determinar proteínas

1. Solución A

- | | |
|---|------------|
| a. Carbonato de sodio al 2% (J.T. Baker): | 100 partes |
| b. Sulfato cúprico al 1% (J.T. Baker): | 1 parte |
| c. Tartrato de Na y K al 2% (J.T. Baker): | 1 parte |

2. Solución B

- | | |
|--------------------|---------|
| a. Folin (Sigma): | 1 parte |
| b. Agua destilada: | 1 parte |

Ambas soluciones deben ser preparadas inmediatamente antes de usarse.

A los tubos se les adiciona 20 μ l de albúmina, 460 μ l de agua destilada, 20 μ l de buffer de lisis y 2500 μ l de la solución A; para desarrollar el color que es proporcional al contenido de proteínas, se adiciona a todos los tubos 250 μ l de la solución B, se mezcla perfectamente y se deja reposar 30 minutos a temperatura ambiente antes de la lectura a 700 nm en un espectrofotómetro. El color es estable por dos horas.

Se grafica μg de proteína -albúmina- (abscisas) contra densidad óptica (ordenadas).

5. DETERMINACION DE ALBUMINA

Para la determinación de la concentración de albúmina sérica se utilizó la prueba A-Gent de los laboratorios Abbott, la cual es un sistema reactivo para medir cuantitativamente albúmina en el suero (40).

5.1 Reactivos

	nmol/l de mezcla de reacción
a. Verde de bromocresol	0.37
b. Acido succinico	100.8
c. Tris (hidroximetil)aminometano	55

La prueba A-Gent para albúmina está basada en la capacidad de la albúmina para unir verde de bromocresol. La prueba fue desarrollada por la división de diagnóstico de Abbott para utilizarse en los analizadores bicromáticos Abbott y

para otros de uso rutinario. La prueba requiere de un solo reactivo que se suministra en forma seca. No es necesario ningún pretratamiento del suero. El producto final absorbe en el rango de luz visible. El método es sencillo, preciso, específico y lineal a 9g/dl. Una sola muestra puede ser analizada en 5 minutos.

Durante muchos años se han usado técnicas ligadoras de colorantes para la determinación de albúmina y están basadas en la capacidad de la proteína de formar un complejo colorante-proteína que muestra propiedades ópticas diferentes a los que presentan los colorantes libres.

Los colorantes como el naranja de metilo, ácido 2-(4-hidroxiazobenceno) benzoico (HABA) y verde de bromocresol (BCG) han sido empleados para la determinación de albúmina. De estos colorantes, el procedimiento que utiliza verde de bromocresol es más específico para la medición de albúmina en suero y es 20 veces más sensible que el método HABA.

La albúmina del suero une al verde de bromocresol a pH de 4.2 y forma un complejo que absorbe a 630 nm. La presencia de un factor tensoactivo evita la precipitación del complejo albúmina-BCG y proporciona linealidad.

Análisis de datos

El análisis de los datos, así como los métodos estadísticos aplicados se describen en la sección de resultados.

III. RESULTADOS

1. Estandarización del ensayo de biotinidasa

Para estandarizar la técnica y saber las condiciones óptimas que requería el ensayo de biotinidasa, se procedió a determinar lo siguiente:

a. Efecto de la temperatura de almacenamiento.

Se observó que la actividad de la biotinidasa no variaba a lo largo de varios meses independientemente de si la enzima se almacenaba a -10°C ó a -70°C (Fig. 1).

b. Efecto del tiempo de incubación.

Se observó que cuando menos hasta los 90 minutos de incubación había linealidad entre el tiempo de incubación y la actividad enzimática (Fig. 2).

c. Efecto de la cantidad de proteína.

También se observó linealidad al agregar diferentes cantidades de volumen de suero (50-200 μ l) y observar la actividad enzimática (Fig. 3).

d. En la curva estándar de producto (p-aminobenzoato) contra densidad óptica, se observó linealidad hasta los 75 nmolas de p-aminobenzoato (Fig. 4).

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO

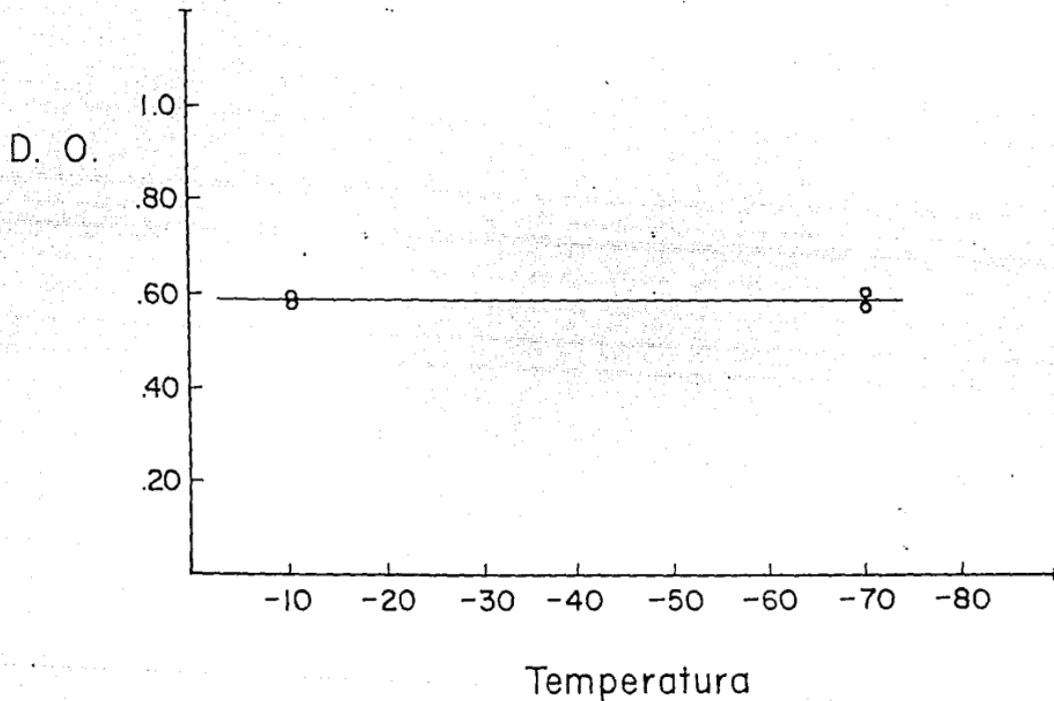


FIGURA 1

EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION

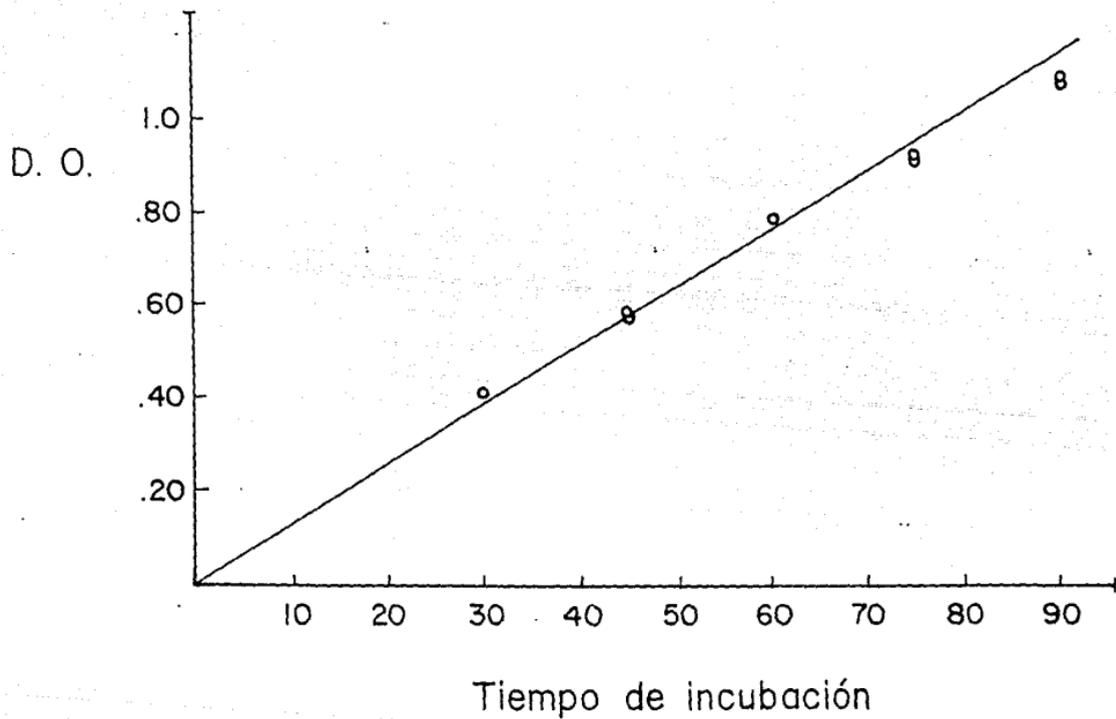


FIGURA 2

EFFECTO DE LA CANTIDAD DE PROTEINA

D. O.

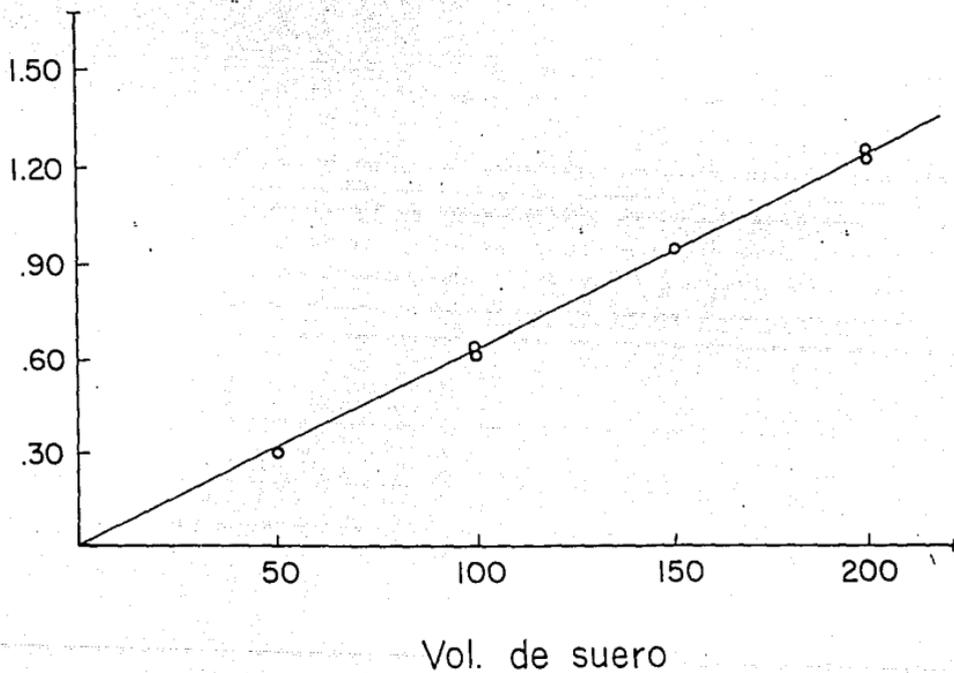


FIGURA 3

CURVA ESTANDAR DE PRODUCTO / DENSIDAD OPTICA

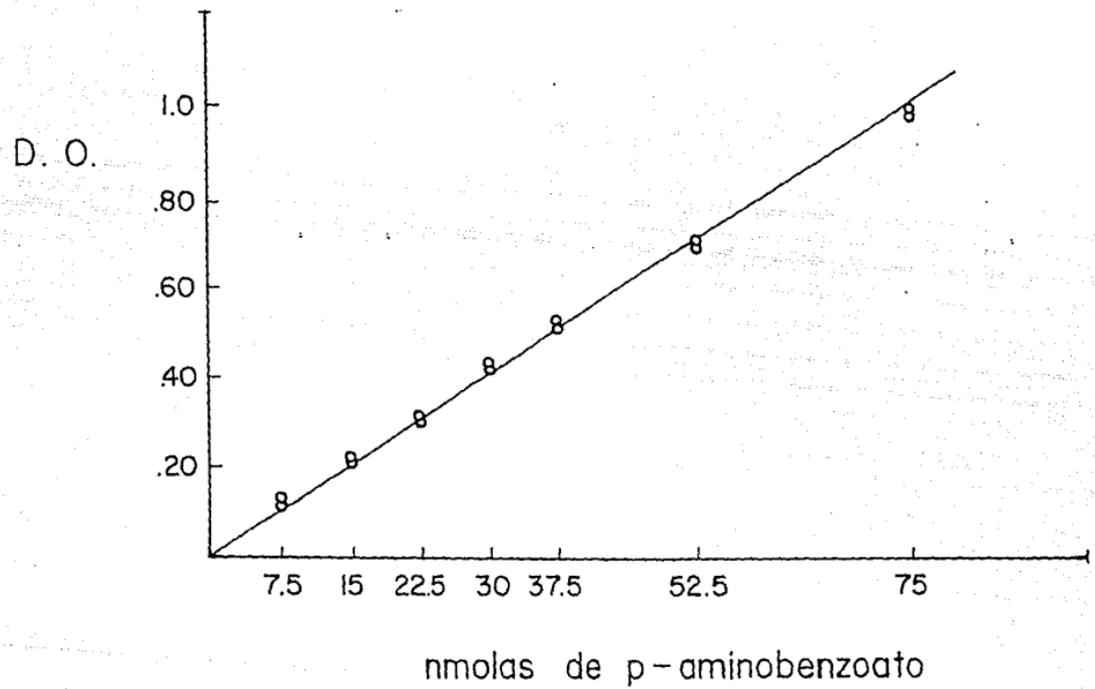


FIGURA 4

2. Actividad de biotinidasa sérica en los sujetos estudiados (Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3 y Fig. 5).

a. La actividad de biotinidasa en los niños con kwashiorkor fue en promedio de 11.96 nmolas $\text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ con una desviación estándar de 2.54; se encontró más elevada que en los niños con marasmo e incluso más elevada que en los sujetos controles sanos.

b. El promedio de actividad de biotinidasa en los niños con marasmo fue de 7.35 nmolas $\text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ con una desviación estándar de 2.22. Aunque como grupo no fue estadísticamente diferente del grupo control (ver más adelante), varios pacientes con marasmo tuvieron actividades de biotinidasa considerablemente por debajo del grupo control (Figura 5).

c. El promedio de actividad de biotinidasa en los controles sanos fue de 8.08 nmolas $\text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ con una desviación estándar de 1.51.

d. Al analizar la actividad de biotinidasa se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de kwashiorkor y los grupos de marasmo y controles, mientras que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los normales y los pacientes con marasmo.

Tabla 1

ACTIVIDAD DE BIOTINIDASA SERICA EN NIÑOS CON DEP TIPO
KWASHIORKOR

	Paciente	Biotinidasa (nmolas min ⁻¹ ml ⁻¹)
1.	H.L.H	13.83
2.	J.M.M	7.10
3.	R.S.C	8.76
4.	A.R.S	11.83
5.	L.A.L	14.25
6.	E.G.V	13.62
7.	E.G.J	13.20
8.	E.G.A	15.20
9.	I.G.S	10.91
10.	E.M.H	15.12
11.	V.G.A	11.87
12.	E.A.H	9.00
13.	E.N.M.	10.95

Tabla 2

ACTIVIDAD DE BIOTINIDASA SERICA EN NIÑOS CON DEP TIPO
MARASMO

	Paciente	Biotinidasa (nmolas min ⁻¹ ml ⁻¹)
1.	G.R.S	10.95
2.	H.G.G	8.55
3.	E.G.A	7.50
4.	L.M.T	9.58
5.	M.C.S	9.37
6.	A.M.O	7.41
7.	G.R.R	6.87
8.	U.P.C	10.12
9.	E.G.M	4.91
10.	R.A.H	6.58
11.	S.O.G	6.54
12.	A.P.E	3.95
13.	I.C.O	2.75
14.	M.P.V	5.60
15.	L.E.R	4.08
16.	J.D.T	6.25
17.	V.F.V	6.45
18.	F.H.M	6.58
19.	A.H.T	7.62
20.	V.L.V	7.10

Tabla 2 -continúa-

ACTIVIDAD DE BIOTINIDASA SERICA EN NIÑOS CON DEP TIPO
MARASMO

21.	M.A.A	5.04
22.	A.M.V	7.55
23.	L.G.S	11.00
24.	N.Z.M	9.04
25.	F.G.E	10.79
26.	B.D.H	8.87

Tabla 3

ACTIVIDAD DE BIOTINIDASA SERICA EN NIÑOS CONTROLES SANOS

	Paciente	Biotinidasa (nmolas min ⁻¹ ml ⁻¹)
1.	A.R.H	8.79
2.	J.R.E	9.37
3.	N.B.M	9.62
4.	E.C.C	7.00
5.	R.C.C	7.76
6.	B.C.R.	6.25
7.	E.O.D	8.29
8.	I.E.R	6.90
9.	A.M.A	10.37
10.	A.J.H	5.79
11.	S.A.G	7.62
12.	A.R.C	5.91
13.	A.S.G	6.66
14.	A.G.B	8.87
15.	F.S.S	11.04
16.	P.L.H	9.25
17.	Q.M.J	8.00

BIOTINIDASA SERICA EN DIFERENTES FENOTIPOS CLINICOS

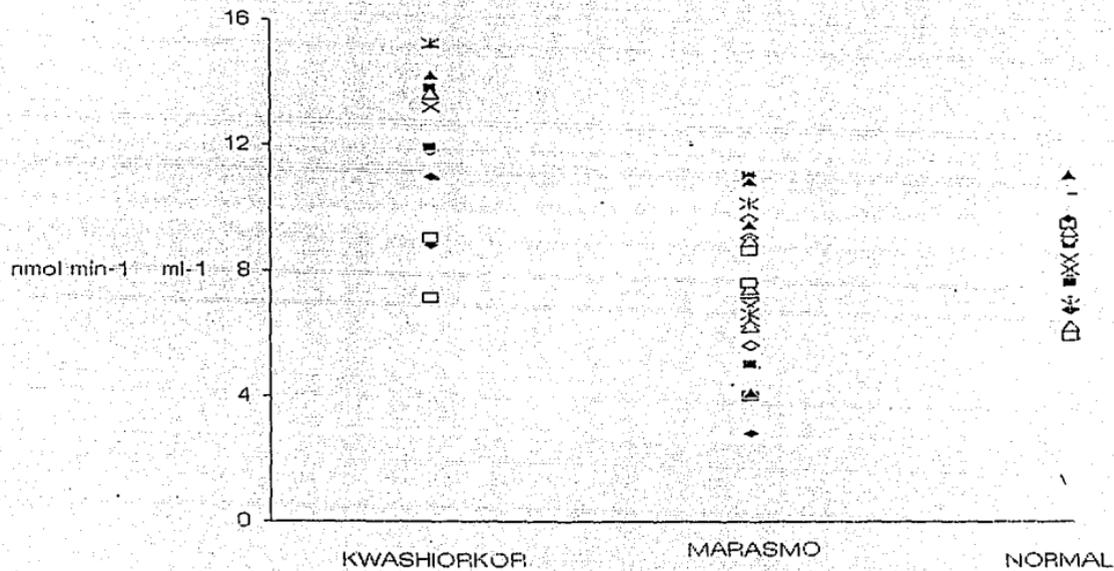


FIGURA 5

3. Debido a que los resultados anteriores fueron diferentes a lo esperado, se analizó el comportamiento de la albúmina en los diferentes tipos de desnutrición y en los controles sanos, para descartar un sesgo de muestreo y se encontró lo siguiente (Tabla 4, Tabla 5, Tabla 6 y Figura 6):

a. La albúmina, tal como se esperaba, fue más baja en los niños con kwashiorkor que en los niños con marasmo, mientras que en los controles sanos, se encontró normal. El promedio de la concentración de albúmina en los niños con kwashiorkor fue de 2.16 g dl⁻¹ con una desviación estándar de 0.86

b. El promedio de la concentración de albúmina para los niños con marasmo fue de 2.81 g dl⁻¹ con una desviación estándar de 0.60

c. El promedio de la concentración de albúmina para los controles sanos fue de 3.83 g dl⁻¹ con una desviación estándar de 0.24

d. No se observó correlación entre la actividad de biotinidasa sérica y la concentración de albúmina en suero (Figura 7).

Tabla 4

CONCENTRACION DE ALBUMINA EN NIÑOS CON DEP TIPO KWASHIORKOR

	Paciente	Albúmina (g dl ⁻¹)
1.	H.L.H	2.2
2.	J.M.M	1.0
3.	R.S.C	2.4
4.	A.R.S	3.9
5.	L.A.L	2.7
6.	E.G.V	2.3
7.	E.G.J	1.9
8.	E.G.A	3.6
9.	I.G.S	2.3
10.	E.M.H	1.5
11.	V.B.A	1.2
12.	E.A.H	1.6
13.	E.N.M	1.6

Tabla 5

CONCENTRACION DE ALBUMINA EN NIÑOS CON DEP TIPO MARASMO

	Paciente	Albumina (g dl-1)
1.	G.R.S	2.8
2.	H.G.G	3.4
3.	E.G.A	2.8
4.	L.M.T	4.1
5.	M.C.S	3.2
6.	A.M.O	2.9
7.	G.R.R	3.5
8.	U.P.C	2.7
9.	E.G.M	3.3
10.	R.A.H	2.6
11.	S.O.G	2.3
12.	A.P.E	2.4
13.	I.C.O	2.9
14.	M.P.V	4.2
15.	L.E.R	1.8
16.	J.D.T	2.0
17.	V.F.V	2.5
18.	F.H.M	3.2
19.	A.H.T	2.5

Tabla 5 -continúa-

CONCENTRACION DE ALBUMINA EN NIÑOS CON DEP TIPO MARASMO

20.	V.L.V	1.9
21.	M.A.A	2.7
22.	A.M.V	2.6
23.	L.G.S	2.9
24.	N.Z.M	2.5
25.	F.G.E	3.4
26.	B.O.H	2.1

Tabla 6

CONCENTRACION DE ALBUMINA EN NIÑOS CONTROLES SANOS

	Paciente	Albumina (g dl ⁻¹)
1.	A.R.H	3.9
2.	J.R.E	3.9
3.	N-B.M	3.6
4.	E.C.C	3.5
5.	R.C.C	3.8
6.	B.C.R	4.1
7.	E.D.D	3.8
8.	I.E.R	4.4
9.	A.M.A	3.6
10.	A.J.H	4.0
11.	S.A.G	4.0
12.	A.R.C	3.4
13.	A.S.G	3.7
14.	A.G.B	3.9
15.	F.S.S	3.8
16.	P.L.H	4.1
17.	G.M.J	3.6

ALBUMINA SERICA EN DIFERENTES FENOTIPOS CLINICOS

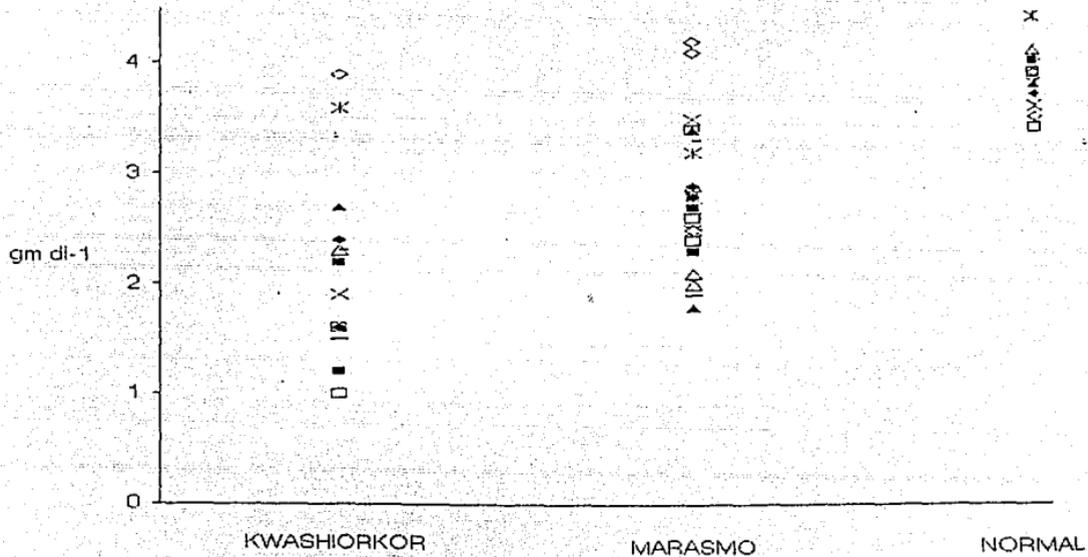


FIGURA 6

BIOTINIDASA vs ALBUMINA EN DESNUTRICION ENERGETICO-PROTEICA

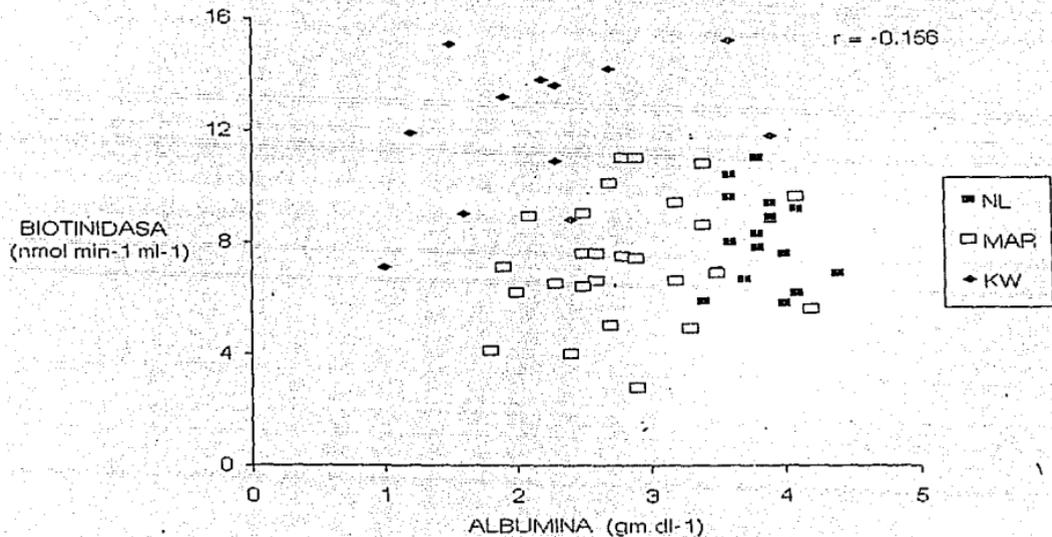


FIGURA 7

4. Al analizar el comportamiento de la PCC -para conocer el status de biotina-, se obtuvo la siguiente información (Tabla 7, Tabla 8, y Figura 8):

a. En niños con DEP tipo kwashiorkor, el promedio de la actividad de PCC fue de 410 pmolas 14CO_2 fijadas $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, con una desviación estándar de 112.62

b. La actividad de PCC en niños con marasmo, se encontró por debajo de la actividad de los niños con kwashiorkor, con un promedio de 208.05 y una desviación estándar de 130.19

c. Aunque no se midió en este estudio, la actividad de PCC en niños normales en nuestro laboratorio se encuentra entre 260 a 580 pmolas 14CO_2 fijadas $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

d. Si se encontró correlación entre la actividad de biotinidasa y la actividad de PCC (utilizada en este trabajo como indicador del estado nutricional de biotina) en los niños con DEP.

Tabla 7

ACTIVIDAD DE PCC EN NIÑOS CON DEP TIPO KWASHIORKOR

	Paciente	PCC (pmolas 14 CO ₂ fijadas min ⁻¹ mg prot.)
1.	L.A.L	493
2.	E.G.V	467
3.	E.G.A	510
4.	I.G.S	320
5.	E.M.H	260

Tabla B

ACTIVIDAD DE PCC EN NIÑOS CON DEP TIPO MARASMO

Paciente	PCC (pmolas 14 CO ₂ fijadas min ⁻¹ mg prot.)
1. M.C.S	241
2. A.M.O	108
3. G.R.R	60
4. U.P.C	280
5. E.G.M	108
6. R.A.H	165
7. S.D.G	235
8. A.P.E	60
9. I.C.O	106
10. M.P.V	178
11. L.E.R	156
12. V.F.V	190
13. F.H.M	216
14. A.H.T	162
15. V.F.V	416
16. M.A.A	252
17. N.Z.M	113
18. F.G.E	597
19. B.O.H	310

BIOTINIDASA vs. PCC EN DESNUTRICION ENERGETICO - PROTEICA

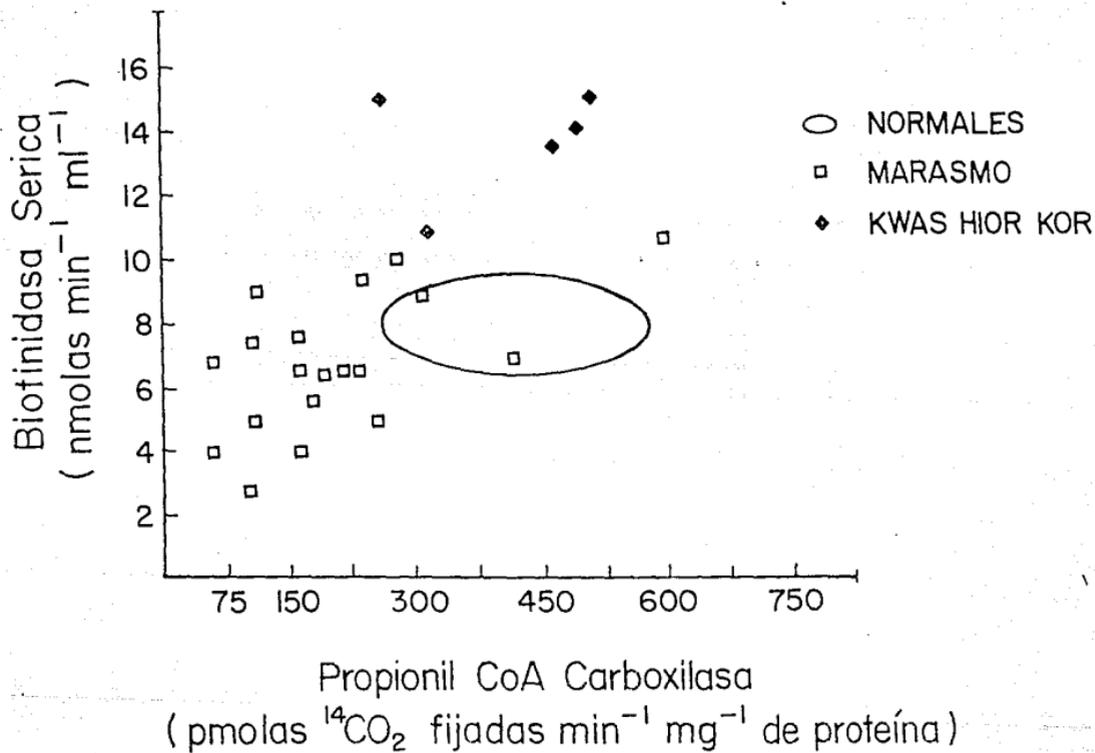


FIGURA 6

Métodos estadísticos para el análisis de los datos

1. Inicialmente se determinó si la distribución de los datos para la actividad de biotinidasa en los tres grupos estudiados era normal, para esto se determinó el sesgo y la curtosis para cada grupo y se observó que los datos presentaron una distribución normal. Posterior a esto, se realizó prueba de análisis de varianza y al existir diferencias estadísticamente significativas, se procedió a realizar una prueba de comparación múltiple de medias - Tukey- (Tabla 9).

2. Posteriormente se determinó mediante sesgo y curtosis que los datos para la concentración de albúmina presentaron una distribución normal, motivo por el cual se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre biotinidasa y albúmina (Tabla 10).

3. Al mismo tiempo se observó que los datos obtenidos para la PCC también presentaron una distribución normal al realizárseles sesgo y curtosis, motivo por el que también se determinó el coeficiente de correlación de Pearson entre biotinidasa y PCC (Tabla 11) (41).

Tabla 9

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD DE BIOTINIDASA

- a. DEP tipo Kwashiorkor: sesgo = .11 curtosis = 2.15
- b. DEP tipo Marasmo: sesgo = -.04 curtosis = 2.52
- c. Controles sanos: sesgo = 0.43 curtosis = 2.41

- d. Análisis de varianza: razón F obtenida = 21.29
razón F en tablas = 3.20

- e. Prueba de Tukey: con alfa de 0.05 = 3.42

- diferencia entre normales y DEP-M = 0.74
- diferencia entre DEP-Kw y DEP-M = 4.63
- diferencia entre normales y DEP-Kw = 3.89

Tabla 10

ANALISIS ESTADISTICO DE LA CONCENTRACION DE ALBUMINA

- a. Sesgo = .04
- b. Curtosis = 2.31
- c. Coeficiente de correlación de Pearson (r) = -.15

Tabla 11

ANALISIS ESTADISTICO DE LA ACTIVIDAD DE PCC

- a. Sesgo = .69
- b. Curtosis = 2.44
- c. Coeficiente de correlación de Pearson (r) = .74

IV. DISCUSION

En este trabajo encontramos que, en promedio, los pacientes desnutridos con kwashiorkor tuvieron actividades de biotinidasa sérica por arriba de los normales. En contraste, el grupo con marasmo no mostró una diferencia estadística significativa del grupo control. Sin embargo, varios de los marasmáticos presentaron actividades por debajo del intervalo normal, por lo que es posible que con una muestra mayor la diferencia entre estos dos grupos llegara a ser significativa. El comportamiento de la biotinidasa de los pacientes con kwashiorkor difiere del de otras proteínas séricas como la albúmina, a pesar de que al igual que ellas es sintetizada en el hígado y secretada a la circulación. Esto es particularmente sorprendente, en vista de que Wolf (35) encontró una excelente correlación entre la actividad de la biotinidasa y la concentración de albúmina en suero, en pacientes con cirrosis hepática.

El incremento en la actividad de la biotinidasa sérica en los niños con kwashiorkor podría deberse a un mayor número de moléculas de biotinidasa en su plasma, o bien a una mayor actividad con o sin cambio en su concentración. Para aclarar esta cuestión, sería necesario determinar la concentración

de la biotinidasa utilizando anticuerpos anti-biotinidasa (para esto se requeriría purificar la enzima).

Si el incremento en la actividad de la biotinidasa se debiera al aumento de su concentración en la sangre, ésta podría atribuirse a la liberación a la circulación de biotinidasa normalmente confinada en los tejidos, por daño de éstos. El kwashiorkor es una forma de DEP más aguda que el marasmo, lo que explicaría la diferencia entre ambas. Esta hipótesis puede explorarse determinando la proporción de biotinidasa sérica que tenga ácido siálico. Wolf (36) ha comunicado que normalmente la biotinidasa en la sangre tiene ácido siálico, al igual que muchas otras glicoproteínas (como la albúmina) circulantes; en contraste, la biotinidasa que se encuentra en los tejidos no está sialilada. El ácido siálico en glicoproteínas del suero parece impedir su captación y degradación rápida por órganos como el hígado.

En el caso de que el número de moléculas de biotinidasa fuese igual o incluso menor de lo normal, en niños con kwashiorkor, los resultados observados en el presente estudio serían consecuencia de una mayor actividad por molécula de enzima. Se sabe que en sujetos sanos, la biotinidasa sérica se encuentra fuertemente inhibida, al parecer por péptidos biotinilados que circulan por el torrente sanguíneo (42). Es concebible que en kwashiorkor la biotinidasa sérica esté menos inhibida que en sujetos sanos,

quizá por estar estos inhibidores en cantidad menor a la normal. Podría incluso especularse que una posible deficiencia de biotina se reflejaría en menores concentraciones de esos péptidos biotinilados (aunque se desconoce su naturaleza y origen). Lo interesante es que sería posible comparar los niveles en suero de inhibidores de biotinidasa, entre niños sanos y desnutridos con kwashiorkor y con marasmo. Para ello bastaría mezclar su suero inactivado por calor con una preparación purificada (i.e., ya sin inhibidores) de la enzima (42).

En este grupo de pacientes desnutridos encontramos una alta correlación ($r = 0.74$) entre la actividad de biotinidasa sérica y la de la carboxilasa linfocitaria (PCC); estas actividades tendieron a ser más bajas en aquellos desnutridos (con marasmo) que tuvieron niveles más bajos de biotinidasa sérica. En la deficiencia genética de biotinidasa, en la que existe una grave carencia de biotina, hay deficiencia múltiple de carboxilasas (37). La actividad de estas carboxilasas, en particular la de PCC, parece ser un buen indicador del estado nutricional de biotina (34,43). Por esto, una posible interpretación de nuestros resultados es que en algunos de los niños con marasmo existiera una deficiencia (subclínica) de biotina —puesta en evidencia por las bajas actividades de las carboxilasas— y que esta deficiencia está en parte condicionada por la actividad deficiente de biotinidasa sérica.

Aunque en un estudio previo (34) en pacientes con nutrición parenteral total prolongada, deficientes en biotina, no observamos una asociación entre biotinidasa y carboxilasas. Ninguno de los sujetos estudiados entonces tuvo actividades subnormales de biotinidasa, por lo que ambas poblaciones no son estrictamente comparables.

No es posible concluir respecto a una asociación entre biotinidasa y carboxilasas (y estado nutricional de biotina) en niños con kwashiorkor. De los 13 niños con este tipo de desnutrición, solo en 5 pudimos estudiar sus carboxilasas linfocitarias y de ellos, 3 no presentaron manifestaciones clínicas sugestivas de deficiencia de la vitamina y solo uno las tuvo en grado importante. Habrá pues que estudiar una muestra mayor y con un número suficiente de pacientes con deficiencia de biotina.

V. CONCLUSIONES

a. La actividad de biotinidasa se encontró sustancialmente elevada en los niños con kwashiorkor, mientras que en los niños con marasmo la actividad de la enzima fue similar a la actividad encontrada en los controles sanos.

b. Si existe correlación entre la actividad de biotinidasa y la actividad de propionil CoA carboxilasa (PCC) en niños con desnutrición energético-protéica.

c. No existe correlación entre la actividad de biotinidasa y la concentración de albúmina en niños con desnutrición energético-protéica.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Hommes, F.A: Biotin. *Wld Rev Nutr Diet.* (1986) 48: 34-84.

2. Kogl, F; Tonnies, B: Plant growth substances. XX. The bios problem. Isolation of crystal-line biotin from egg yolk. Hoppe-Seyler's. *Z Physiol Chem.* (1936) 242: 43-73.

3. Gyorgy, P: The curative factor (Vitamin H) for egg white injury, with particular reference to its presence in different foodstuffs and in yeast. *J Biol Chem.* (1939) 131: 733-44.

4. Du Vigneaud, V; Hofmann, K; Melville, D.B: On the structure of biotin. *J Am Chem Soc.* (1942) 64: 188-89.

5. Friedrich, W: *Vitamins (Biotin).* (1988) 753-805. Berlin: Walter de Gruyter.

6. Lane, M.D; Rominger, K.L; Young, D.L; Lynen, F: The enzymatic synthesis of holotranscarboxylase from apotranscarboxylase and (+) - biotin. II. Investigation of the reaction mechanism. J Biol Chem. (1964) 239: 2865-71.

7. Chiang, G.S; Mistry, S.D: A comparative study of pyruvate holocarboxylase synthesis in rat liver and kidney preparation. Int J Biochem. (1975) 6: 527-31.

8. Tietz, A; Ochoa, S: Metabolism of propionic acid in animal tissues. V. Purification and properties of propionyl carboxylase. (1959) 234: 1394-1400.

9. Kazizo, Y; Ochoa, S; Warner, R.C; Chen, J.Y: Metabolism of propionic acid in animal tissues. VIII. Crystalline propionyl carboxylase. (1961) 236: 1917-23.

10. Lau, E.P; Cockran, B.C; Manson, L; Fell, R.R: Bovine kidney 3-methylcrotonyl-CoA and propionyl-CoA carboxylases: each enzyme contains non-identical subunits. Proc Nat Acad Sci. USA. (1979) 76: 214-18.

11. Kalousek, F; Darigo, M.D; Rosenberg, L.E: Isolation and characterization of propionyl-CoA carboxylase from normal human liver. Evidence for a protomeric tetramer of non-identical subunits. J Biol Chem. (1980) 255: 60-65.

12. Goodall, G.J; Johannsen, W; Wallace, J.C; Keech, D.B: Sheep liver propionyl-CoA carboxylase: purification and some molecular properties. Ann NY Acad Sci. (1985) 447: 396-97.

13. Wolf, B; Feldman, G.L: The biotin dependent carboxylase deficiencies. Am J Hum Genet. (1982) 34: 699-716.

14. Guckhait, R.B; Zwergel, E.E; Lane, D.M: Acetyl coenzyme A carboxylase. Subunit structure of the protomeric form of the avian liver enzyme. J Biol Chem. (1974) 249: 4776-80.

15. Beaty, N.B; Lane, M.D: The polymerization of acetyl-CoA carboxylase. J Biol Chem. (1983) 258: 13051-13055.

16. Wright, L.D; Driscoll, C.A; Boger, W.P: Byocitinase, an enzyme concerned with hydrolytic cleavage of byocitin. Proc Soc Exp Biol Med. (1954) 86: 335-37.

17. Thoma, R.W; Peterson, W.H: The enzymatic degradation of soluble bound biotin. J Biol Chem. (1954) 210: 569-79.

18. Koivusalo, M; Elariaga, C; Kazizo, Y; Ochoa, S: Bacterial biotinidase. J Biol Chem. (1963) 238: 1038-42.

19. Koivusalo, M; Pispä, J: Biotinidase activity in animal tissues. Acta Physiol Scand. (1963) 58: 13-19.

20. Pispä, J: Animal biotinidase. Ann Med Exp Biol Fenn. (1965) 43: Suppl 5: 5-39.

21. Craft, D.V; Gross, N.H; Chandramouli, N; Wood, H.G: Purification of biotinidase from human plasma and its activity on biotinyl peptides. Biochem. (1985) 24: 2471-76.

22. Chauhan, J; Dakshinamurti, K: Purification and characterization of human serum biotinidase. J Biol Chem. (1986) 261: 4268-76.

23. Wolf, B; Miller, J.B; Hymes, J; Secor McVoy, J; Ishikawa, Y; Shapira, E: Immunological comparison of biotinidase in serum from normal and biotinidase-deficient individuals. Clin Chem Act. (1987) 164: 27-32.

24. Heard, G.S; Grier, R.E; Weiner, D.L; Secor McVoy, J.R; Wolf, B: Biotinidase --a possible mechanism for the recycling of biotin. Ann Acad Sci. (1985) 447: 259.

25. Weiner, D.L; Grier, R.E; Watkins, P; Heard, G.S; Wolf, B: Tissue origin of serum biotinidase: implication in biotinidase deficiency. Am J Hum Genet. (1983) 34: 56A.

26. Knappe, J; Brommer, N; brederbick, K: Reinigung un Eigenschaften der biotinidase aus Schweinenicren und lactobacillus casei. Biochem Z. (1963) 338: 599-613.

27. Sweetman, L: Two forms of biotin responsive multiple carboxylase deficiency. J Inher Metab Dis. (1981) 4: 53-54.

28. Burry, B.J; Sweetman, L; Nyhan, W.L: Heterogeneity of holocarboxylase synthetase in patients with biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. Am J Hum Genet. (1985) 37: 326-37.

29. Yatsidis, H; Koutsinas, D; Agrayannis, B; Papastephanidis, C; Francos-Pheanis, M; Delatala, Z: Biotin in the management of uremic neurologic disorders. Nephron. (1984) 36: 183-85.

30. Krause, K.H; Berlit, P; Bonjour, J.P: Impaired biotin status in anticonvulsant therapy. Ann Neurol. (1982 b) 12: 485-86.

31. Ramos, G. R; Mariscal, A.C; Viniegra, C.A; Perez, O.B. (1969) Desnutrición en el niño. 165-334. Hospital Infantil de México.

32. Cohen, S; Hansen, J.D.L: Metabolism of albumin and gamma-globulin in kwashiorkor. Clin Sc. (1962) 23: 351.

33. Wolff, J.A; Margolis, S; buidoso-Wolff, K; Matusick, E; Mac Lean, W.C: Plasma and red blood cell fatty acid composition in children with protein-calorie malnutrition. *Pediatr Res.* (1984) 18: 162-67.

34. Velázquez, A; Martín del Campo, C; Baez, A; Zamudio, S; et al: Biotin deficiency in severe protein energy malnutrition. *Eur J Clin Nutr.* (1988) 43: 169-73.

35. Grier, R.E; Heard, G.S; Watkins, P; Wolf, B: Low biotinidase activities in the sera of patients with impaired liver function: evidence that the liver is the source of serum biotinidase. *Clin Chim Acta.* (1989) 186: 397-400.

36. Wolf, B; Grier, R.E; Secor Mc Voy, J.R; Heard, G.S: Biotinidase deficiency: A novel vitamin recycling defect. *J Inher Metab Dis.* (1985) 8: Suppl 1: 53-58.

37. Wolf, B; Grier, R.E; Parker, W.D; et al: Biotinidase deficiency: The enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clin Chim Acta.* (1983c) 131: 273-81.

38. Sweetman, L: Protocol minniaturized assay, Comunicación personal.

39. Lowry, O.H: Protein measurements with folin phenol reagent. J Biol Chem. (1951) 193-265.

40. Abbott Laboratories. Diagnostics Division: A-Gent. Reactivo de Química Clínica para la determinación de albúmina. Pasadena, Ca. U.S.A.

41. Daniel, W.W: Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. (1984) 193-237, 272-85. Ed. Limusa.

42. Dizumi, J; Hayakawa, K: Effect of plasma biotinyl-peptides on biotinidase activity. Biofactors. (1988) 1: 179-185.

43. Whitehead, C.C: Assessment of biotin deficiency in animals. Ann NY Acad Sci. (1985) 447: 86-96.