



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de la suplementación con Biotina en la  
fibra muscular de ratón

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

PRESENTA:

Sofía Enciso Pinto

TUTORA

Dra. María Cristina Regina Fernández Mejía



Ciudad Universitaria, CD. MX. Enero 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Hoja de datos del jurado**

### **1. Datos del alumno**

Apellido Paterno: Enciso  
Apellido Materno: Pinto  
Nombre(s): Sofía  
Teléfono: 55-70-31-62-18  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Carrera: Biología  
Número de cuenta: 414004810

### **2. Datos del tutor**

Grado: Dra.  
Nombre(s): María Cristina Regina  
Apellido Paterno: Fernández  
Apellido Materno: Mejía

### **3. Datos del Sinodal 1**

Grado: M. en C.  
Nombre (s): Aarón  
Apellido Paterno: Rodríguez  
Apellido Materno: Caballero

### **4. Datos del Sinodal 2**

Grado: Dra.  
Nombre (s): Patricia  
Apellido Paterno: Rivas  
Apellido Materno: Manzano

### **5. Datos del Sinodal 3**

Grado: Dra.  
Nombre (s): Bianca Julieta  
Apellido Paterno: Vizcarra  
Apellido Materno: Chacón

### **6. Datos del Sinodal 4**

Grado: Dra.  
Nombre (s): María Cristina Regina  
Apellido Paterno: Fernández  
Apellido Materno: Mejía

### **7. Datos del Sinodal 5**

Grado: M. en C.  
Nombre (s): Nelly  
Apellido Paterno: López  
Apellido Materno: Valdez

### **8. Datos del trabajo escrito**

Título: Efecto de la suplementación con Biotina en la fibra muscular de ratón.  
Número de Páginas: 66  
Año: 2020

Esta tesis fue dirigida por:

Dra. María Cristina Fernández Mejía

Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de  
Investigaciones Biomédicas, UNAM / Instituto Nacional de  
Pediatria.

El trabajo de esta tesis fue realizado gracias al apoyo de:  
PROYECTO PAPIIT IN210714

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis no habría sido posible sin el invaluable apoyo de la Doctora Cristina Fernández Mejía. Gracias por su paciencia y su guía para desarrollarme profesionalmente en la ciencia, pero sobretodo gracias por todo el apoyo a nivel personal para seguir conquistando cada una de mis metas.

Agradezco infinitamente a Esmeralda Enríquez Calderón por tomarme de la mano y darme el apoyo necesario para conseguir escribir esta tesis y su invaluable guía como co-directora de este proyecto. Gracias también a mis compañeros de laboratorio: M en C. Gustavo Adolfo Rojas Olave, Dra. Ericka Moreno Mendez y Dra. Wilma Tixi Verdugo por todo el apoyo y la orientación para el aprendizaje de las técnicas, la organización y la disciplina necesaria en el laboratorio.

Gracias a todos mis compañeros del Laboratorio número 3 de la Unidad de Genética de la Nutrición y al resto del personal que labora en ella por el apoyo y la orientación obtenidas durante mi estancia.

Agradezco infinitamente el apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de México para mi realización tanto personal como profesional.

## DEDICATORIA

A mi padre, Samuel Enciso Sáenz. Gracias por enseñarme que es ser un científico. Gracias por enseñarme todo lo que podía aprender. Gracias por esperarme siempre despierto. Gracias por ser tú, gracias por estar. Gracias por darme las alas para volar.

A mi madre, Cruz del Carmen Pinto Vera. Gracias por cada mirada, por cada caricia, por cada palabra de aliento. Gracias por enseñarme a no darme por vencida, a saber esperar y tomar la vida por los cuernos. Gracias por intentar, luchar y lograr conmigo.

A ti, Andrea, que has sido un huracán en mi mundo desde que puedo recordar, que eres mi compañera incansable, mi crítica ferviente, mi pequeña gran inspiración. Gracias por ser mi eterna cómplice de vida.

A mi abuela, Esther Sáenz Pérez. Gracias por rezar, por tu bendición, por dejarme ser tu bastón en la vejez. Gracias por enseñarme a ser fuerte. Gracias por enseñarme que todo se consigue con paciencia y fe. Gracias por todo, simplemente por todo.

A mi primera amiga en esta ciudad tan loca, Adileily, gracias por ir conmigo a cada aventura, por descubrir lo que significaba ser adulto de la mano. Gracias por enseñarme a relajarme, a disfrutar mi libertad y a ser joven más de solo unas pocas veces en la vida.

A Fernanda. Gracias por darme la mano cuando no tenía de dónde agarrarme, por dejarme llorar y reír hasta la histeria, gracias por no dejarme ir, por hacerme poner los pies en la tierra, gracias por regalarme la inocencia en forma de Grecia y su forma de ver la vida.

A Fernando. Gracias por ponerme en mi lugar y hacerme bajarle al drama. Gracias por las carcajadas y por enseñarme que muchas veces es bueno dejarse llevar por la broma. Gracias por ser mi cómplice, y por aguantarme más de lo que debías. Gracias por escoger ser mi hermano de vida.

A Aline. Gracias por mostrarme que los amigos llegan en el momento indicado. Gracias por enseñarme que es genial ser quien soy y que voy a encontrar aventureros que son como yo. Gracias por cada palabra de conexión y complicidad.

A mi familia: a mi nana, gracias por todos los abrazos y los mimos de estos años, a mis primos gracias por dejarme pertenecer, por todas las aventuras y por todas las experiencias compartidas; a mis tíos y mis padrinos, gracias por no dejarme nunca ser débil, por enseñarme que a pesar de todo, soy más fuerte y más valiente de lo que creo; mis sobrinos y mis ahijados, gracias por regalarme la inocencia y la fe para creer en todo, gracias por recordarme esa curiosidad que me llevó a hacer ciencia. Gracias a todos porque soy, fui y seré lo que ustedes me han ayudado a ser. Gracias por cada minuto de paz y alegría a su lado.

A la familia que yo escogí, a las que me cuidaron, me apoyaron, me regañaron, me abrazaron mucho y me escucharon quejarme, a mi red de seguridad, a mis amigos: Victoria, Linett, Roberto, Ilse, Meshu, Gaby, Carla, Andy, Dannie, Diana gracias por acompañarme en la aventura más grande hasta ahora.

A los tres pilares de mi vida que me cuidan desde las estrellas, mis abuelos Enrique, Ernesto y Carmen. Brillen siempre conmigo, por favor.

## INDICE

<b>A. RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>B. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
B.1 SISTEMA MUSCULAR .....	9
B.1.1.1 MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	10
B.1.1.2 DESARROLLO EMBRIONARIO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	10
B.1.1.3 DESARROLLO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN ETAPA POSTNATAL .....	11
B.1.1.4 REGENERACIÓN DE LA FIBRA MUSCULAR .....	12
B.1.1.5 HISTOLOGÍA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	13
B.1.2 NÚCLEO CELULAR DE LA FIBRA MUSCULAR .....	16
B.1.3 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES .....	17
B.1.4 TIPOS DE FIBRAS MORFOFUNCIONALES DE MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	18
B.1.5 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS EN MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	19
B.1.6 PATOLOGÍAS EN EL DESARROLLO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	21
B.2 BIOTINA .....	24
B.2.1 ESTRUCTURA QUÍMICA .....	24
B.2.2 FUNCIÓN Y REQUERIMIENTOS DE LA BIOTINA .....	24
B.2.3 EFECTOS DE LA BIOTINA EN DOSIS FARMACOLÓGICAS .....	26
<b>C. ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PROYECTO</b> .....	<b>28</b>
<b>D. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>29</b>
<b>E. HIPÓTESIS</b> .....	<b>30</b>
<b>F. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>30</b>
<b>G. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>30</b>
<b>H. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>31</b>
<b>I. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
I.1 MODELO ANIMAL Y ADMINISTRACIÓN DE DIETAS .....	31
I.2 PRUEBA INTRAPERITONEAL DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA .....	32
I.3 ANÁLISIS DE MORFOLOGÍA .....	33



<i>I.3.1 CRITERIOS PARA EL CONTEO DE NÚCLEOS</i> .....	34
I.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	34
<b>J. RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
J.1 EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN EL PESO DEL ANIMAL. ....	35
J.2 EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO. ....	35
J.3 EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA.....	36
J.4 EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN LA HISTOLOGÍA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	37
J.5 EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN EL NÚMERO TOTAL DE NÚCLEOS. ....	39
J.6 EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN EL NÚMERO DE NÚCLEOS REACTIVOS .....	40
J.7 EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN EL DIAMETRO MAYOR DE LOS NÚCLEOS .....	41
J.8 EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN EL DIAMETRO MENOR DE LOS NÚCLEOS. ....	42
J.9 EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN LA FORMA ELIPTICA DEL NÚCLEO. ....	43
<b>K. DISCUSIÓN</b> .....	<b>44</b>
<b>L. CONCLUSIONES</b> .....	<b>51</b>
<b>M. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>52</b>
<b>N. REFERENCIAS</b> .....	<b>53</b>

## A. RESUMEN

La biotina, también conocida como vitamina B7 o H, es una vitamina hidrosoluble perteneciente al complejo B. En concentraciones fisiológicas, medidas de acuerdo a la ingesta diaria recomendada del orden de microgramos, la biotina actúa como grupo prostético de carboxilasas que juegan un papel importante en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, en la gluconeogénesis y en el metabolismo de aminoácidos. La ingesta diaria promedio recomendada de esta vitamina se ha estimado en los 30 µg para adultos. De manera independiente a su función clásica, se ha reportado que, en dosis farmacológicas, la biotina modifica la expresión de genes de procesos biológicos como el metabolismo de triglicéridos y carbohidratos, este efecto se ve reflejado en una disminución de la lipemia y la hiperglucemia. Recientemente estudios en la Unidad de Genética de la Nutrición (UGN) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM han encontrado que las concentraciones farmacológicas de biotina son capaces de modificar la organización tisular provocando cambios morfológicos negativos en los tejidos de ratones. Estos efectos se han observado en el islote pancreático, los hepatocitos y las células que conforman el tejido testicular. En este proyecto se analizaron los efectos de la suplementación con biotina administrada de manera oral durante ocho semanas inmediatamente después del destete en la morfología del músculo esquelético. Los ratones estudiados durante este proyecto recibieron una cantidad de 1.76 mg de biotina por kilogramo de alimento en la dieta denominada "control" y 97.6 mg de biotina por kilogramo de alimento en la dieta denominada "suplementada", llevando un registro del peso de cada animal y su consumo de alimento. A estos roedores se les realizó una prueba de tolerancia a la glucosa después de la inyección de 6 mg por kilogramo de peso de glucosa intraperitoneal, una, dos y cuatro horas después de aplicada esta. Al finalizar el experimento no se encontró diferencia significativa en el peso y consumo de alimento del grupo control y

el grupo suplementado. Los resultados obtenidos mostraron cambios importantes en la morfología del músculo cuádriceps femoral. Con una tinción con hematoxilina-eosina se encontró que en las muestras suplementadas con biotina se produjo un aumento en los núcleos alejados de la posición canónica a la periferia de la fibra. El número de núcleos no fue diferente entre ambos grupos, pero si difieren notablemente en su posición al estudiar todos los grupos durante la administración de una dosis alta de glucosa (6 mg/kg de peso del ratón), se observó un porcentaje significativamente alto de núcleos en el centro de la fibra (50% de los núcleos presentaban esta característica). De igual manera se midió la forma elíptica del núcleo, analizando sus ejes mayor y menor así como su excentricidad. Se observó que hubo un cambio significativo en el diámetro mayor y la excentricidad de los ejes después de una y cuatro horas de aplicada la dosis alta de glucosa. Se observó también, la pérdida de organización de la fibra muscular, así como la aparición de espacios y ondulaciones entre las fibras que componen el músculo. En conclusión los resultados revelaron que la suplementación con biotina durante 8 semanas modificó la posición de los núcleos y la organización de la fibra muscular. Así mismo, se encontró que al administrar una dosis alta de glucosa, después de 8 semanas de suplementación con biotina, cambió la forma y posición de los núcleos de la fibra muscular.

## **B. INTRODUCCIÓN**

### **B.1 SISTEMA MUSCULAR**

## **EL SISTEMA MUSCULAR**

Se conoce como sistema muscular al conjunto de estructuras que incluyen las células musculares, redes organizadas de tejido nervioso, vasos sanguíneos, la matriz extracelular y el tejido conectivo. Este sistema es vital pues provee al cuerpo la capacidad de locomoción y la regeneración después de un periodo de trabajo o una lesión del tejido, además de los movimientos involuntarios que llevan a cabo los procesos de respiración y oxigenación sanguínea. Por otra parte, el sistema muscular comprende tres tipos de músculo; músculo cardíaco presente en el miocardio, músculo liso que se encuentra en órganos internos y músculo esquelético o estriado que da sostén al cuerpo. Este último, en los seres humanos está compuesto de aproximadamente 600 músculos y comprende entre 40 y 50% del peso corporal (Huard et al., 2002).

### **B.1.1.1 MÚSCULO ESQUELÉTICO**

#### **B.1.1.2 DESARROLLO EMBRIONARIO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO**

El desarrollo del músculo esquelético en los vertebrados durante la etapa embrionaria, procede de las estructuras transitorias conocidas como somitas, originadas a partir del mesodermo paraxial (Tajbakhsh, 2003; Tajbakhsh & Buckingham, 2000), las cuales se localizan en pares a cada lado del tubo neural. Estas células proliferan de manera regular hasta la mitad de la gestación donde el esclerotomo, lado ventral de las somitas, da lugar al cartílago y hueso mientras que el dermomiótomo, lado dorsal de las somitas, se transforma en el músculo esquelético, el endotelio y la dermis dorsal (Tajbakhsh, 2003).

En esta etapa, las células progenitoras de músculo se deslaminan del dermomiótomo migrando a las extremidades, lugar en el que proliferan y se diferencian gracias a los precursores del linaje miogénico (Figura 1). Las células denominadas mioblastos, células precursoras no diferenciadas con un único núcleo, se reorganizan y se unen para formar un miotubo

caracterizado por sus núcleos centrales. Esta estructura celular se diferencia dando lugar a otra alargada y multinucleada denominada fibra muscular en la cual los núcleos se re-acomodan, situándose en la periferia de la célula. El movimiento de los núcleos se produce por fuerzas polarizadas (proteínas motoras y citoesqueleto) y es impulsado por la relajación y contracción de las miofibrillas (Roman, 2017).

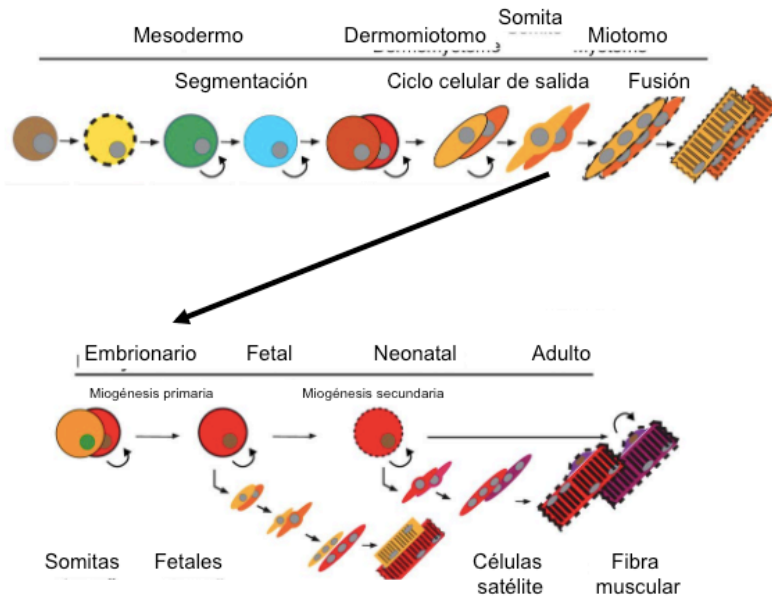


Figura 1. Organogénesis del músculo esquelético. **Figura modificada de:** [REVIEW Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro](#) Chal J, Pourquoié O. Development 2017 144: 2104-2122; doi: 10.1242/ dev. 151035

### B.1.1.3 DESARROLLO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN ETAPA POSTNATAL

Al llegar a la edad adulta, el crecimiento muscular es detenido y las células precursoras musculares entran a un estado quiescente, volviéndose inactivas. Sin embargo, el músculo esquelético puede aumentar su tamaño y responder al daño, para ejercer sus funciones de locomoción y de

actividad contráctil, así como su reacción a los factores de señalización que regulan el crecimiento para que este aumente su tamaño. Este proceso es conocido como hipertrofia y se caracteriza por el aumento de las proteínas que conforma al músculo esquelético; se han estudiado diferentes vías de señalización involucradas en la regulación de la síntesis proteica como la vía Akt-mTOR (Eguchi et al., 2006), la activación de *p38* en respuesta a estímulos extracelulares a través de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Keren et al., 2006; Williamson et al., 2003), así como la señalización mediada por calcio (Sandri et al., 2006).

Se conoce como hipertrofia al aumento del tamaño de la masa muscular causada por un aumento en el tamaño de las fibras musculares, dado por un crecimiento de las miofibrillas (paquetes celulares que contienen al aparato contráctil), ocurriendo en el periodo post-natal debido a la síntesis proteica continua, mientras que la hiperplasia es un incremento de la masa muscular por proliferación celular, esto es debido al aumento en el número de fibras musculares (White et al., 2010). En condiciones normales, ambos procesos ocurren cuando hay estímulos externos como el ejercicio. Los mioblastos que no se diferenciaron y permanecieron en estado quiescente, denominados células satélite, se encuentran entre la lámina basal y la membrana de la fibra muscular, se activan para formar nuevas miofibras que se unirán a las anteriores iniciando así la miogénesis en etapa postnatal (Anderson, 2006; Cheung & Rando, 2013; Kuang & Rudnicki, 2008).

#### **B.1.1.4 REGENERACIÓN DE LA FIBRA MUSCULAR**

Las fibras musculares forman un tejido estable, sin embargo, puede presentar lesiones de diversa etiología que producen traumas físicos sin pérdida muscular significativa (Beiner & Jokl, 2001; Counsel & Breidahl, 2010). El músculo ya desarrollado de los vertebrados tiene la notable capacidad de regeneración mediada por progenitores miogénicos o células

troncales, ya que las fibras son post-mitóticas. Estos progenitores proliferan y se diferencian para eficientizar el crecimiento y la regeneración muscular. Estas células, llamadas satélite se definen por su posición y son reguladas por el nicho a su alrededor, el cual incluye una multitud de tipos celulares como células endoteliales, fibroblastos e inflamatorias, creando interacciones recíprocas (Braun & Gautel, 2011).

La regeneración muscular se divide en tres fases bien definidas: la reparación y remodelación caracterizada por la fagocitosis de las fibras necróticas y la activación de las células satélite; la remodelación caracterizada por el ingreso a la fibra muscular y la diferenciación de los mioblastos a través de diversos factores mitogénicos y la formación de una cicatriz de tejido conectivo, donde ocurre la proliferación de las células satélite así como el crecimiento muscular (Boscolo-Sesilio et al., 2019). Estos mioblastos maduros pueden, durante el proceso de regeneración, fusionarse con las fibras musculares existentes para repararse o fusionarse entre sí para formar nuevas fibras musculares (Darr & Schultz, 1987; Snow, 1978). Este proceso ocurre cuando hay micro lesiones, macro lesiones, en el crecimiento hipertrófico y la remodelación de fibras preexistentes (Braun & Gautel, 2011).

### **B.1.1.5 HISTOLOGÍA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO**

La fibra muscular se compone de células multinucleadas altamente especializadas que se organizan en paquetes de tejido en forma jerárquica de mayor a menor tamaño, dando origen así a capas diferentes de tejido conectivo colágeno, los cuales dividen y unen a las fibras musculares al mismo tiempo. (Haun et al. 2019) La fibra muscular posee una capa delgada de tejido conectivo denominada epimisio que recubre todo el músculo. Bajo el epimisio se encuentran paquetes de entre 10 y 100 fibras musculares, llamados fascículos y que a su vez están rodeados por otra capa llamada perimisio, teniendo además una última capa llamada

endomiosio la cual divide y separa cada fibra individual. La membrana celular que rodea a cada fibra muscular se conoce como sarcolema o membrana plasmática, el fluido que queda encerrado dentro de la fibra y el sarcolema se llama sarcoplasma o citoplasma. (Haun et al. 2019) En el citoplasma también se encuentran las mitocondrias o sarcosomas, el retículo endoplasmático o sarcoplásmico, el citoesqueleto y el núcleo celular que tiene la característica de ser alargado y aplanado. (Figura 2)

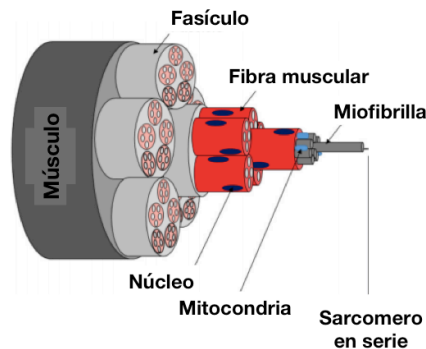


Figura 2. Organización del músculo esquelético. **Figura modificada de:** Haun CT, Vann CG, Roberts BM, Vigotsky AD, Schoenfeld BJ and Roberts MD (2019) A Critical Evaluation of the Biological Construct Skeletal Muscle Hypertrophy: Size Matters but So Does the Measurement. *Front. Physiol.* 10:247. doi: 10.3389/fphys.2019.00247

La membrana celular que rodea a cada fibra muscular se conoce como sarcolema (membrana plasmática); el fluido que queda encerrado dentro de la fibra y el sarcolema se llama sarcoplasma (citoplasma). Una fibra muscular está compuesta de miofibrillas que se disponen en paralelo y que se asemejan a cuerdas de  $1\mu\text{m}$  de diámetro, las subunidades de las miofibrillas denominadas sarcómeros, se organizan en serie y son la unidad contráctil del músculo; miden de 2 a  $2,5\mu\text{m}$  de largo, y se componen de un arreglo específico de filamentos de dos proteínas principales, que son actina (filamentos delgados) y miosina (filamentos gruesos). Los paquetes de 100 a 400 miofilamentos forman miofibrillas y aproximadamente 2000 miofibrillas forman una fibra muscular adulta. El costámero es un



componente estructural y funcional de las células del músculo estriado el cual conecta el sarcómero del músculo a la membrana celular.

La fibra muscular está rodeada por una membrana plasmática, que presenta invaginaciones tubulares conocidas como túbulos transversos o túbulos T, y que se distribuyen a lo largo de la fibra muscular. En el citoplasma también se encuentran las mitocondrias o sarcosomas, el citoesqueleto, el retículo sarcoplásmico, las reservas de glucógeno y la mioglobina.

El sarcómero es la unidad funcional de la contracción muscular y se observa como un bloque colocado al lado de otro bloque o sarcómero; cada uno de los bloques forma un segmento muscular que se delimitan entre sí por una estría o línea Z. Un sarcómero está compuesto de miofilamentos gruesos de miosina que se encuentran principalmente ubicados hacia el centro del bloque en el área conocida como banda A. Otras dos regiones llamadas banda I contienen filamentos delgados de actina  $\alpha$  o músculo-esquelética y se sitúan junto a las líneas Z rodeando a la banda A, la zona H se encuentra en el centro del sarcómero donde no hay superposición entre los diferentes filamentos de proteínas (figura 3).

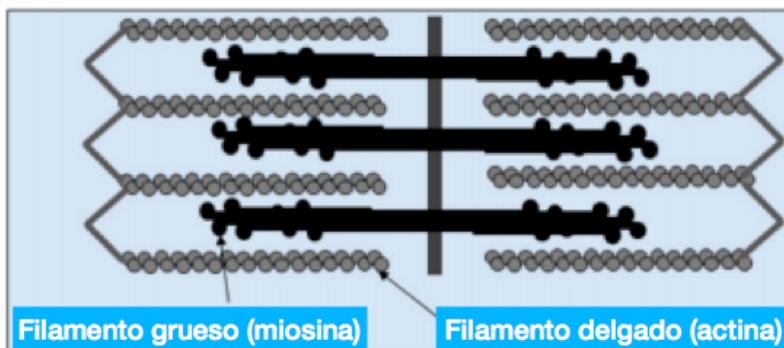


Figura 3.Sarcomero. **Figura modificada de:** Haun CT, Vann CG, Roberts BM, Vigotsky AD, Schoenfeld BJ and Roberts MD (2019) A Critical Evaluation of the Biological Construct Skeletal Muscle Hypertrophy: Size Matters but So Does the Measurement. *Front. Physiol.* 10:247. doi: 10.3389/fphys.2019.00247

## B.1.2 NÚCLEO CELULAR DE LA FIBRA MUSCULAR

La fibra muscular es multinucleada, es decir que posee varios núcleos que resultan de la fusión de células con un único núcleo en el proceso de la miogénesis, como ya se mencionó anteriormente, y que se encuentran ubicados en la periferia de la misma. Estos núcleos tienen la característica de ser alargados y aplanados. Diversos estudios indican que la posición de los núcleos de la fibra músculo-esquelética es importante para múltiples funciones celulares durante el desarrollo, la homeostasis tisular y la regeneración muscular (Roman & Gomes, 2018). Los mecanismos de posicionamiento nuclear implican la participación de redes citoesqueléticas y proteínas motoras, ya que en la mayoría de los casos, el núcleo está conectado al citoesqueleto por proteínas de envoltura nuclear, como la familia de las proteínas lamina o por el complejo del poro nuclear (Volk & Wang 2015, Windner et al. 2019, Perillo & Folker 2019 ) (figura 4).

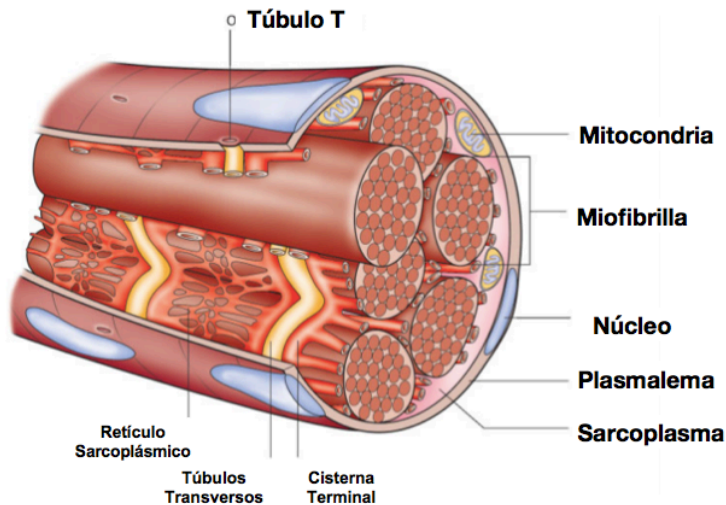


Figura 4. Citología del músculo esquelético. **Figura modificada de:** Exeter, D., & Connell, D. (2010). Skeletal Muscle: Functional Anatomy and Pathophysiology. *Seminars in Musculoskeletal Radiology*, 14(02), 097–105. doi:10.1055/s-0030-1253154

La multinucleación de las fibras musculares es una de las múltiples razones que hacen único al tejido muscular. En la fibra muscular los núcleos celulares están organizados de manera que se maximice el espacio internuclear, esto es imperativo para la función correcta del aparato contráctil (Manhart et al. 2018). Esta organización de núcleos es post-mitótica, permitiendo así la existencia de un grupo de células troncales de mioblasto, denominadas células satélite, las cuales, fusionadas en el *sincitio* participan en el crecimiento post-natal y la recuperación después de una lesión muscular (Murach et al., 2018).

### B.1.3 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

El citoesqueleto es una red integrada que consiste en microfilamentos (de actina), microtúbulos (de tubulina) y filamentos intermedios; es el regulador

principal de la forma, tamaño y función de la fibra muscular y sus organelos (Koutakis et al. 2015), ya que estos elementos que lo integran participan en el mantenimiento de la posición de los organelos celulares, el transporte de diferentes tipos de vesículas citoplasmáticas, así como en el proceso de contracción y relajación de la fibra muscular.

El andamiaje que participa en la manutención del núcleo de la fibra muscular está mediado por proteínas como nesprina-1 de un peso de 1000 kDa, una proteína multimérica nuclear que se ancla a los filamentos de actina para mantener al núcleo organizado en una posición dada, la cual es codificada por el gen SYNE 1. Dinamina, por su parte, es una proteína GTPasa involucrada en la endocitosis y el movimiento del núcleo desde el centro de la fibra hasta la periferia uniéndose a los filamentos intermedios, la cual está codificada por el gen DNM1 y pesa aproximadamente 86 kDa. Otra proteína participante en el movimiento del núcleo de la fibra muscular es la dineina, proteína que es, junto a la cinesina, una de las proteínas motoras más importantes asociadas a microtúbulos. La dineina pesa alrededor de 500 kDa y está codificada por el gen DYNC1H1, mientras que la cinesina, que media el transporte intracelular anterógrado, se codifica por los genes Kif5b (cadena pesada) y Klc1 (cadena ligera) y pesa aproximadamente 248 kDa.

#### B.1.4 TIPOS DE FIBRAS MORFOFUNCIONALES DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

Las fibras que componen al músculo esquelético se clasifican en Tipo I, Tipo IIA, Tipo IIX y Tipo IIB de acuerdo a la composición de filamentos gruesos de miosina y de enzimas oxidativas representadas en el incremento o disminución del número de mitocondrias en la misma. Las

miofibras, paquetes organizados jerárquicamente de proteínas que conforma el aparato contráctil, se denominan también como fibras de acción lenta o acción rápida (Schiaffino & Reggiani, 2011). Las fibras de acción lenta poseen un gasto energético bajo y su contenido mitocondrial y de enzimas oxidativas es menor, teniendo también filamentos pesados de miosina de Tipo I; mientras que aquellas que poseen filamentos pesados de miosina Tipo II pueden diferenciarse como fibras de acción intermedia (IIA y IIX) o fibras de acción rápida (IIB) en las que el costo energético es muy alto y su contenido mitocondrial mayor (Bottinelli et al., 1994). La identidad de la fibra muscular puede ser modificada en respuesta a estímulos y procesos como el envejecimiento y la conversión entre ellas es posible. Las fibras oxidativas o de acción lenta también se denominan fibras rojas, de acuerdo a su morfología; de la misma manera, las fibras glucolíticas o rápidas reciben el nombre de fibras blancas (Gómez-Zorita & Urdampilleta, 2012). Ambos tipos de fibras son encontrados en distintas proporciones en humanos y en el resto de los mamíferos, confiriéndole a los músculos su heterogeneidad y funciones características.

### B.1.5 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS EN MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético además de aportar movimiento, proporciona sostén al cuerpo y facilita la respiración. La principal función de este tipo de músculo es la de convertir la energía química, que llega a través de las señales nerviosas, a energía mecánica a través del proceso de contracción y relajación. Esta dependencia de energía constante otorga al músculo esquelético la facultad de ser un almacén de aminoácidos y carbohidratos (Lambert et al., 2018). Una característica importante de las fibras musculares radica en su capacidad de modificar dramáticamente su estructura y actividad metabólica como resultado de un cambio en su demanda funcional después de un período prolongado de actividad o inactividad.

Toda la actividad muscular es dependiente de sustratos de ATP (AdenosinTrifosfato) como fuente principal de obtención de energía, molécula que puede ser obtenida a través de reservas en circulación (glucosa en sangre o lípidos) o intracelulares (glucógeno, lípidos o fosfágenos) las cuales serán usadas dependiendo de la actividad muscular que se lleve a cabo (Bottinelli et al., 1994). El mecanismo molecular se lleva a cabo mediante la acción de la insulina, que promueve el transporte de glucosa aumentando el movimiento de los transportadores GLUT4 que se encuentran localizados en el interior de la célula muscular hacia la membrana plasmática. Concomitantemente, la insulina activa a las enzimas que participan en la síntesis de glucógeno (glucogénesis).

Los niveles de ATP dentro del músculo son finitos. No debe permitirse, fisiológicamente, que los niveles de dicha molécula sean menores al 30% de los valores iniciales debido a que la molécula energética es requerida para que las miofibrillas vuelvan a su estado inicial de reposo. Entre las formas de reconstitución energética del músculo se encuentran los procesos metabólicos de fosforilación oxidativa, glucólisis, reacción de la creatina-cinasa y reacción de adenina-cinasa. El músculo no es capaz de liberar a la glucosa que se encuentra almacenada en forma de glucógeno debido a la carencia de la enzima glucosa-6- fosfatasa; sin embargo, participa de manera importante en la gluconeogénesis liberando lactato a la circulación, el cual es tomado por el hígado para sintetizar glucosa.

Para el proceso de obtención de ATP a través de sus diferentes sustratos en la fibra muscular, glucosa y glucógeno pueden ser catabolizados aeróbicamente a través de la fosforilación oxidativa o anaeróbicamente a través del proceso conocido como fosforilación a nivel de sustrato. Los lípidos y el lactato, por su parte, únicamente pueden ser catabolizados aeróbicamente en presencia de oxígeno. Pese a que la fosforilación

oxidativa es el proceso más eficiente de producción de ATP para el músculo esquelético, es largo y se desarrolla con lentitud; es por ello que generalmente el metabolismo de sustratos energéticos, en las fibras musculares ocurre después de una alta ingesta energética por el organismo (Storey, 2013) (figura 5)

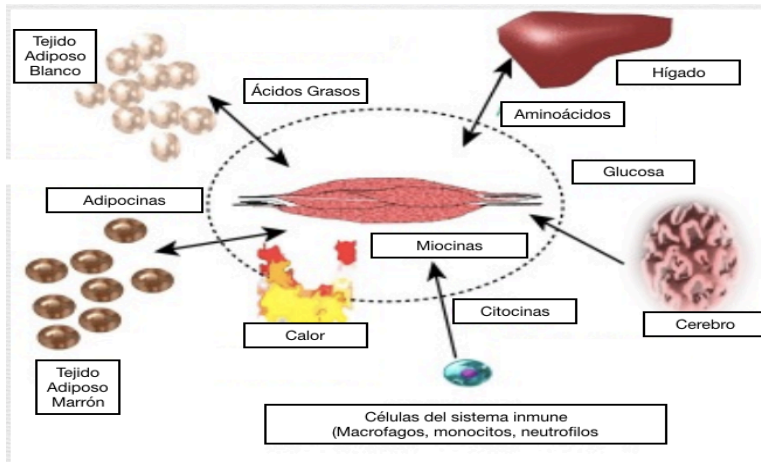


Figura 5. Metabolismo del músculo esquelético. **Figura modificada de:** Pant M., Bal NC., Periasamy M. (2016) Review Sarcolipin: A Key Thermogenic and Metabolic Regulator in Skeletal Muscle. Trends in Endocrinology & Metabolism, (27) 12. 881-892. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2016.08.006>

### B.1.6 PATOLOGÍAS EN EL DESARROLLO DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

Como se mencionó anteriormente el músculo esquelético comienza su desarrollo durante la etapa embrionaria y continúa hasta la etapa postnatal. Los sarcomeros del músculo esquelético se encuentran entre las estructuras más regulares en los vertebrados, observándose consistentemente la existencia de un programa secuencial de expresión de genes y transcripción de proteínas para su correcta formación (Laing, 2008). Durante el proceso de miogénesis un grupo de mioblastos detienen

su ciclo celular, manteniéndose en estado quiescente, organizándose entre la lámina basal y la membrana de la fibra muscular y poseen la capacidad de regenerar la fibra muscular en la etapa postnatal (Cheung & Rando, 2013). Es durante este proceso de ensamblaje proteico que pueden ocurrir una variedad de diversas mutaciones que comprometen la integridad de la fibra muscular. Durante la diferenciación de células troncales a mioblastos los genes de miogenina y MRF4, pertenecientes a la familia de los factores de transcripción reguladores de músculo, (poseen un rol crucial, así como la expresión de Pax3/Pax7, MyoD y Myf5 (Kablar & Rudnicki, 2000). Las mutaciones en estos genes pueden ser deletéreas ocasionando la muerte durante el desarrollo embrionario o derivar en patologías relacionadas a citoesqueleto.

Los miocitos maduros pueden estar sometidos a dos procesos naturales: regeneración, la cual es dependiente de las células satélite y la hipertrofia, consistente en un incremento de la cantidad proteica (Sartorelli & Fulco, 2004; White et al., 2010). Existen patologías circundantes alrededor de la etapa postnatal entre las que se encuentran aquellas que comprometen la síntesis proteica y aquellas que involucran la capacidad de regeneración, arriesgando la integridad de las células satélite. La masa muscular es regulada por la vía de señalización IGF1-AKT-mTOR al regular la síntesis proteica y sus distintas modificaciones post-traduccionales, además de la señalización mediada por calcio para la expresión diferenciada de genes que inducen la hipertrofia (Eguchi et al., 2006; Hudson & Price, 2013). Si la tasa de degradación proteica supera a la de síntesis en el músculo esquelético da comienzo a un proceso conocido como atrofia. Los procesos que llevan a la atrofia muscular, mediados por problemas genéticos o incluso la participación del estrés oxidante se encuentran las vías ubiquitina-proteosoma, autofagia lisosomal y apoptosis mediadas por caspas y calpainas, además del exceso de miostatina que es un regulador positivo del crecimiento muscular (Wing et al., 2011). Una de las patologías mayormente estudiada es la distrofia muscular de Duchenne, la cual es la



distrofia muscular más común en la infancia, causada por mutaciones en el gen DMD el cual codifica para la proteína distrofina, provocando mayormente la debilidad muscular (Tabolt & Maves, 2016)

Entre los disturbios a los que se puede ver comprometida la fibra muscular se encuentran aquellos que involucran directamente la citología muscular como patologías nucleares, mitocondriales, vacuolares y de proteínas citoesqueléticas. Entre las miopatías nucleares se destacan las miotubulares que consisten en una posición anormal del núcleo en la fibra muscular, usualmente en el centro de la misma (Mazzotti, A & Coletti, 2016). Con respecto a las miopatías mitocondriales y vacuolares, se consideran entre ellas las denominadas “metabólicas” tales como las alteraciones en el metabolismo de glucógeno, lipídico o en la cadena respiratoria mitocondrial. Considerando también como disturbios estructurales los ocurridos en las proteínas que dan soporte a la fibra muscular y a su núcleo, desmina y lamina. Las desminopatías ocurren principalmente por mutaciones en el gen DES, en su mayoría pleiotropicas, las cuales derivan en patologías de amplio espectro (Azzimato V et al., 2016), por su parte las laminopatías se derivan de mutaciones del gen LMNA, las cuales no se consideran comunes y se caracterizan por una involución del tejido muscular.

Un momento crítico durante la vida adulta del músculo esquelético es el envejecimiento. La pérdida de masa y fuerza contráctil de la fibra muscular relacionada con la edad es llamada sarcopenia. Esta miopatía está asociada a la reducción del calcio disponible para la respuesta rápida del músculo esquelético ante un estímulo. La sarcopenia se caracteriza por la reducción de la miofibrilla así como la disminución de su tamaño, sufriendo especial afectación en las fibras de tipo II. En conjunto con el daño muscular, aumenta la permeabilidad de la fibra muscular, liberando las proteínas intracelulares al ambiente extracelular, tales como la creatin-

cinasa, provocando debilidad muscular y compromete la movilidad del individuo.

## B.2 BIOTINA

### B.2.1 ESTRUCTURA QUÍMICA

La biotina, también conocida como vitamina B7 o H, es una vitamina hidrosoluble perteneciente al complejo B. Su estructura química consiste de un compuesto bi-cíclico con un anillo que contiene un grupo ureído (-N-CO-N) junto a otro que posee un azufre del cual se ramifica una cadena lateral de ácido valérico (figura 6). Existen 8 estero isómeros de esta molécula en la naturaleza, siendo únicamente la D-biotina enzimáticamente activa.

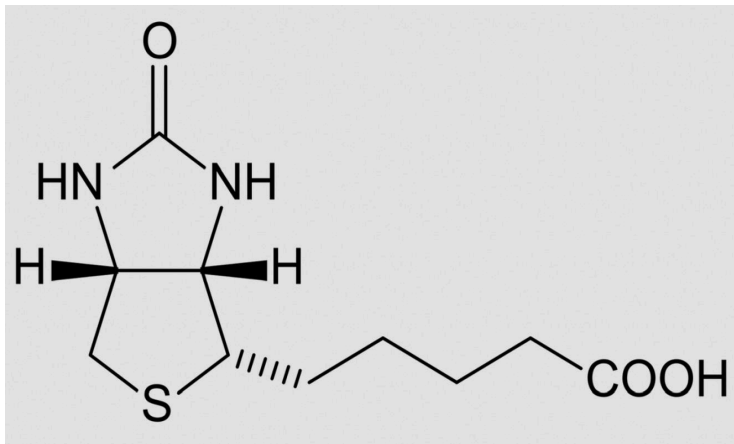


Figura 6. Estructura de la biotina. **Obtenida de:** : Henke SK, Cronan JE (2014) Successful Conversion of the Bacillus subtilis BirA Group II Biotin Protein Ligase into a Group I Ligase. PLoS ONE 9(5): e96757. doi:10.1371/journal.pone.0096757

### B.2.2 FUNCIÓN Y REQUERIMIENTOS DE LA BIOTINA

En concentraciones fisiológicas, la biotina actúa como grupo prostético de carboxilasas tales como acetil-CoA carboxilasa 1 y 2, piruvatocarboxilasa, propionil-CoA carboxilasa y  $\beta$ -metilcrotonil-CoA carboxilasa. Estas moléculas se sintetizan como apocarboxilasas, las cuales carecen de actividad enzimática y se transforman en holocarboxilasas al unirse covalentemente a biotina, mediante el proceso conocido como biotinilación (Vilches-Flores, A. & Fernandez-Mejia, 2005). Estas cinco carboxilasas, encontradas en mamíferos, juegan un papel crítico en la síntesis y oxidación de los ácidos grasos, en la gluconeogénesis y en el metabolismo de aminoácidos (Tabla 1)

A pesar de la importante función que posee esta vitamina, los mamíferos no son capaces de sintetizarla, por lo cual debe ser obtenida a través de la dieta. Ricas fuentes de biotina proceden de alimentos como la yema de huevo, algunos vegetales, la leche de origen bovino, y vísceras como el riñón o el hígado. Se conoce, además, que la microbiota del intestino tiene la capacidad de producir esta vitamina, volviéndose una segunda fuente cuya contribución relativa no se ha definido aún (Said, 2012). La ingesta diaria promedio recomendada de esta vitamina se ha estimado en los 30  $\mu$ g para adultos (Fernandez-Mejia & Lazo-de-la-Vega-Monroy, 2011).

<b>Tabla 1: Función fisiológica de la biotina como cofactor de carboxilasas.</b>	
<b>Carboxilasa</b>	<b>Vía Metabólica</b>
<b>ACC1:</b> Acetil CoA Carboxilasa	Biosíntesis de ácidos grasos
<b>ACC2:</b> Acetil CoA Carboxilasa 2	$\beta$ - Oxidación de ácidos grasos

<b>PC:</b> Piruvato Carboxilasa	Gluconeogénesis
<b>MCC:</b> Metilcrotonil CoA Carboxilasa	Catabolismo de aminoácidos
<b>PCC:</b> Propionil CoA Carboxilasa	Catabolismo de aminoácidos
Fuente; Riveron-Negrete L, Fernandez-Mejia C. (2017). <u>Pharmacological Effects of Biotin in Animals</u> . Mini Rev Med Chem. 17(6):529-540.	

### B.2.3 EFECTOS DE LA BIOTINA EN DOSIS FARMACOLÓGICAS

De manera independiente a su función clásica, se ha reportado que, en dosis farmacológicas, la biotina modifica procesos biológicos como: el metabolismo de triglicéridos y carbohidratos, la diferenciación celular, la hipertensión y el desarrollo, reproducción así como las funciones del sistema inmune (Fernandez-Mejia & Lazo-de-la-Vega-Monroy, 2011). Estos efectos están asociados a mecanismos como la sobre-expresión de genes, tanto al nivel transcripcional y post-transcripcional (Dakshinamurti, 2005, Rodriguez-Melendez et al. 2005, Wiedmann et al. 2004); así como modificar la organización tisular provocando cambios morfológicos (Riverón-Negrete et al., 2016.) Las acciones moleculares por medio de las cuales concentraciones farmacológicas de biotina ejercen sus efectos sobre la expresión de genes son poco conocidos. Hasta el momento las investigaciones existentes sustentan dos mecanismos (Zempleni 2005, Riverón-Negrete & Fernández-Mejía, 2017). El más aceptado está relacionado con la vía de señalización de la guanilatociclasa soluble/proteína cinasa G (GC/PKG) y el otro a la biotinilación de histonas.

Diversas investigaciones han encontrado que la biotina a concentraciones farmacológicas disminuye la hipertrigliceridemia y la intolerancia a la glucosa tanto en humanos como en animales de laboratorio, lo que confiere gran importancia al estudio de los mecanismos de acción de la biotina por su uso potencial en la prevención y/o tratamiento de la diabetes tipo-2 y el síndrome metabólico. La administración de 5 mg de biotina durante 4 semanas en pacientes con hipercolesterolemia decrementó las concentraciones de colesterol total (Dokusova & Krivoruchenko, 1972). En el grupo de trabajo (Báez-Saldaña et al., 2004; Revilla-Monsalve et al., 2006) se encontró que el tratamiento con 5mg de biotina tres veces al día en pacientes diabéticos y no diabéticos, disminuyó las concentraciones de triglicéridos plasmáticos.

En animales de experimentación se encontró que la biotina modifica la hiperlipidemia. En la cepa de ratas BHE con predisposición genética para desarrollar elevadas concentraciones sanguíneas de glucosa y lípidos (Marshall et al., 1972), el tratamiento con biotina disminuyó las concentraciones de lípidos séricos (Marshall et al., 1976). En estudios realizados (UGN) en el grupo de trabajo de la doctora Fernández Mejía, en ratones sanos, se encontró que la suplementación con biotina produjo una disminución en los niveles séricos de triglicéridos (Larrieta et al. 2012) y de ácidos grasos (Boon-Villa et al. 2015). Este efecto está asociado a cambios en la expresión de transcritos y proteínas lipogénicos en el hígado y en el tejido adiposo (Larrieta et al. 2012, Aguilera-Mendez & Fernández-Mejía 2012).

La suplementación con biotina modula también la expresión de genes críticos en la homeostasis de la glucosa. Genes como la glucocinasa hepática (Chauban et al. 1991) y pancreática (Romero Navarro 1999, Vilches-Flores et al. 2009) y el receptor de insulina (De la Vega et al 2000)

aumentan su expresión en respuesta a la suplementación con biotina, así como genes gluconeogénicos como la PEPCK (Dakshinamurti et al. 1994)

Un estudio en el laboratorio analizó el efecto de la suplementación con esta vitamina, a partir del destete, durante 8 semanas sobre la función y la masa de células beta pancreáticas (Lazo de la Vega et al 2013). Los resultados demostraron que la suplementación con biotina incrementó la secreción de insulina, así como la expresión del RNAm de factores transcripcionales que regulan la expresión y secreción de insulina. En concordancia con estos efectos, los ratones suplementados con biotina mostraron una mejora en la tolerancia a la glucosa.

## C. ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PROYECTO

Estudios analizando la morfología del islote pancreático en ratones de la cepa Balb/C los cuales recibieron una dieta suplementada con biotina en una concentración de 97.7 mg/kg de dieta por ocho semanas después del destete encontraron un aumento en el tamaño del islote. La arquitectura de los islotes se encontró modificada en los ratones suplementados con biotina, observándose un porcentaje más elevado de islotes con células alfa localizadas hacia el centro del islote con respecto a los controles, a través del aumento en su cantidad de células beta y alfa (aproximadamente al doble de células beta en relación a una proporción 1:2 de células alfa/beta) (Lazo-de-la-Vega-Monroy et al., 2013). Así mismo en otro trabajo realizado por el grupo de investigación (Tixi-Verdugo, 2017) se encontró que la administración de una dieta suplementada con biotina durante la maduración del islote pancreático (primera semana después del destete) produce un crecimiento del mismo en un 40%. De igual manera se han realizado estudios en el efecto de la biotina en la morfología del hígado (Riverón-Negrete et al., 2016). Este trabajo se realizó en ratones que recibieron el tratamiento de concentración de 97.7 mg/kg de dieta,

encontrando que, a pesar de no existir un efecto en los marcadores de toxicidad del hígado, la suplementación con biotina altera la estructura hepática. Observándose cambios en: la triada portal, dilatación de los sinusoides, aumento de la vascularidad y un aumento de 39% más de hepatocitos binucleados, así como un incremento en la nucleomegalia. Se realizó de manera independiente un estudio dentro del laboratorio, suplementando con biotina a un grupo de células de tipo fibroblasto 3T3 -L1 que tienden a diferenciarse en adipocitos (Moreno-Méndez et al. 2018); en este trabajo se observó la modificación del tamaño de las gotas de grasa, disminuyendo en su tamaño y aumentando en su proporción al ser suplementadas, así como modificaciones en los genes correspondientes a las vías metabólicas del tejido adiposo. Estos estudios muestran que en el efecto pleiotropico de la suplementación con biotina produce re-arreglo celular y cambios en la estructura nuclear del adiposito, el islote páncreatico y el hepatocito

#### D. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos estudios han encontrado que concentraciones farmacológicas de biotina modifican el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. En la homeostasis de estos metabolitos participan de manera central: el islote pancreático, el hígado, el tejido adiposo y el músculo. Estudios en la UGN han identificado los cambios que producen las concentraciones farmacológicas de biotina en la expresión de genes al nivel transcripcional y post-transcripcional en el islote pancreático, el hígado, el tejido adiposo; también, encontramos que la biotina produce cambios en la histología del tejido adiposo, el tejido hepático y el islote pancreático. Hasta el momento desconocemos cuáles son los efectos de la suplementación con biotina sobre el músculo. Dada la importancia de este tejido en el metabolismo de la glucosa y los triglicéridos, en este trabajo planteamos el estudio de los

cambios que produce la suplementación con biotina en el tejido muscular, en particular nos enfocaremos en el efecto sobre la histología del tejido.

## E. HIPÓTESIS

Dado que se ha encontrado que las concentraciones farmacológicas de biotina producen cambios histológicos en tejidos reguladores de la glucemia, ya que el músculo es un participante en la homeostasis de la glucosa es posible que también ocasionen cambios en el músculo esquelético.

## F. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de concentraciones farmacológicas de biotina en el ratón sobre la histología del músculo cuádriceps femoral, comparando entre un grupo control y otro suplementado con biotina.

## G. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar el efecto de concentraciones farmacológicas de biotina en el músculo esquelético sobre:

- I. La organización de la fibra muscular considerando las diferencias entre el grupo control y el grupo suplementado con biotina.
- II. El número de núcleos totales en la fibra muscular del grupo control y el grupo suplementado con biotina.
- III. La organización celular y la morfología de los núcleos del grupo control y el grupo suplementado con biotina.



## H. DISEÑO EXPERIMENTAL

### Esquema Metodológico:

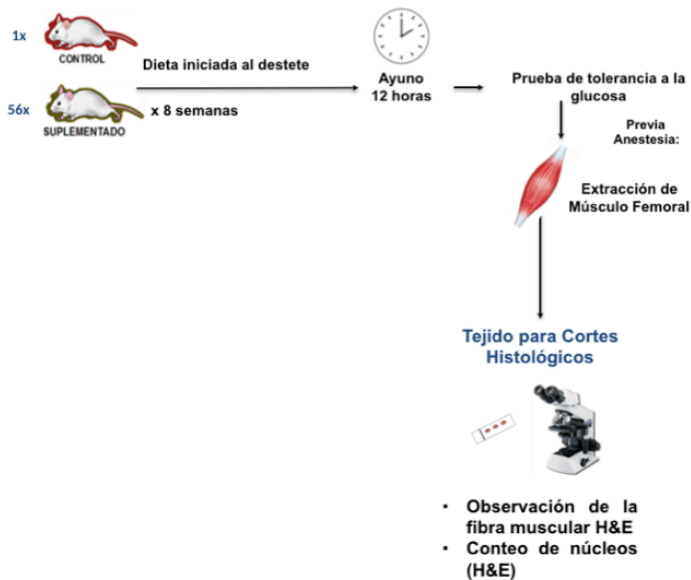


Figura 7. Diseño metodológico

## I. MATERIALES Y MÉTODOS

### I.1 MODELO ANIMAL Y ADMINISTRACIÓN DE DIETAS

El modelo experimental utilizado para este proyecto fueron 40 ratones macho de la cepa Balbc/cAnN bajo los lineamientos del Comité de Ética y

Experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, de tres semanas de edad, los cuales se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Pediatría bajo ciclos luz-oscuridad de 12 horas. Los animales recibieron una dieta denominada control (1.76 mg de biotina/kg) (TD-01362); o suplementada con 97.7 mg de biotina/kg de dieta (TD-0136), la cual contiene 56 veces más biotina que la denominada control, siendo así una proporción comparable a la encontrada en los suplementos vitamínicos contra aquella requerida de manera fisiológica, no hubo dieta suministrada sin biotina. Se llevó a cabo el seguimiento del peso corporal y el consumo alimenticio para ambos grupos semanalmente. Al cabo de las ocho semanas de administración de la dieta, los ratones fueron sometidos a un ayuno de 12 horas, se anestesiaron con sevoflurano (Sevorane, Sedalparma) y después de la eutanasia mediante dislocación cervical, se extrajo el tejido del músculo esquelético correspondiente al cuádriceps femoral (figura 7), se trabajó con grupos de 20 animales control y 20 suplementados, 5 ratones de cada grupo se escogieron para cada punto de la curva de glucosa.

## I.2 PRUEBA INTRAPERITONEAL DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA

Las pruebas de tolerancia a la glucosa fueron realizadas entre las 7:00 y las 11:00 A.M. Los ratones fueron previamente ayunados por un período de 12 horas, dejando agua *ad libitum*, se seleccionaron aleatoriamente 5 ratones de cada grupo para cada punto que se midió de la curva de tolerancia. La glucosa fue inyectada de forma intraperitoneal, con una concentración de 6 gramos de glucosa por kilogramo de peso del animal. Las concentraciones de glucosa sanguínea fueron registradas previamente a la inyección (considerado como tiempo 0 horas), y después pasados 60 (1 hora), 120 (2 horas) y 240 (4 horas) minutos después, obteniendo muestra sanguínea de la cola utilizando un glucómetro portátil (Freestyle optium, Abbott Diabetes Care, México) (Figura 7).

### I.3 ANÁLISIS DE MORFOLOGÍA

Con el fin de obtener cortes histológicos para el análisis morfométrico, los ratones, después de haber sido sometidos a la misma metodología experimental, fueron anestesiados con pentobarbital sódico (PiSA agropecuaria) inyectado de manera intraperitoneal posteriormente al ayuno de 12 horas para ser sometidos a un proceso de perfusión con solución salina y posteriormente con para formaldehído al 4%, utilizado para fijar los tejidos, a través de una máquina de bombeo mediante la punción cardiaca con una micro-cánula en el ventrículo izquierdo del corazón.

Las muestras obtenidas se deshidrataron en una serie de concentraciones crecientes de etanol comenzando en etanol 50% hasta llegar a etanol absoluto y xilol para después ser incluidas en parafina. A continuación se procedió a la obtención de cortes histológicos de 3  $\mu\text{m}$  que se colocaron en portaobjetos previamente tratados con Polyisina-L (Sigma-Aldrich, San Louis Missouri, EUA). Una vez en el portaobjetos, se desparafinaron con xilol y se rehidrataron partiendo de etanol absoluto y concentraciones decrecientes hasta agua destilada, manteniéndose hidratados en agua destilada hasta el momento de procesar las muestras para teñir con la tinción de Hematoxilina-Eosina. Con el fin de describir núcleos y citoplasma del tejido muscular se utilizó la tinción de hematoxilina y eosina, además de valorar el estado general del tejido; una vez teñidas las muestras se deshidrataron usando una secuencia inversa de etanol y xilol utilizada para desparafinar y rehidratar las muestras; fueron montados en medio de montaje Entellan (Merck Millipore) y se dejaron secar por una noche. Se obtuvieron 5 laminillas por ratón, en las cuales se adherieron cortes de 5 micrómetros, en planos tanto longitudinales como transversales. De estas laminillas obtenidas, se tomaron fotografías de 10 campos, cada uno de 60 aumentos (aumento total 600x) por cada animal objeto de estudio. Las

muestras fueron observadas en un microscopio OlympusCX31 acoplado a una cámara Canon EOS Rebel T3i, fotografiándose diferentes campos y diferentes aumentos de las mismas.

### I.3.1 CRITERIOS PARA EL CONTEO DE NÚCLEOS

Después de obtener las fotomicrografías de los cortes histológicos, se seleccionaron 10 campos de microscopio en ampliación 600x de manera aleatoria tomados a 60 aumentos, de los cuales se cuantificaron los núcleos dentro de las fibras musculares mediante el uso del programa ImageJ (Java, National Institutes of Health, Maryland). A continuación se realizó otra cuantificación con el mismo programa de núcleos que poseían las siguientes características: forma redondeada, cromatina fragmentada y ubicación en el centro de la fibra muscular. Adicionalmente se midió el diámetro mayor y el diámetro menor de los núcleos fotografiados en las muestras control y suplementadas.

### I.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se trabajó con el programa Graphpad Prims v. 7 (Graphpad Software, San Diego, California, USA). Los datos se representan con media  $\pm$  error estándar de la media. Se utilizaron pruebas estadísticas de t de Student, Mann-Whitney y ANOVA de una vía para el análisis entre dos o más grupos, respectivamente. El símbolo \* representa la diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control en el tratamiento de la dieta.

## J. RESULTADOS

### J.1 EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN EL PESO DEL ANIMAL.

Durante las ocho semanas de experimentación el peso de los ratones fue monitoreado. Con esto se obtiene el primer resultado del trabajo que muestra que la suplementación con biotina no modificó el peso de los ratones con respecto al grupo control (tabla 2 y figura 8).

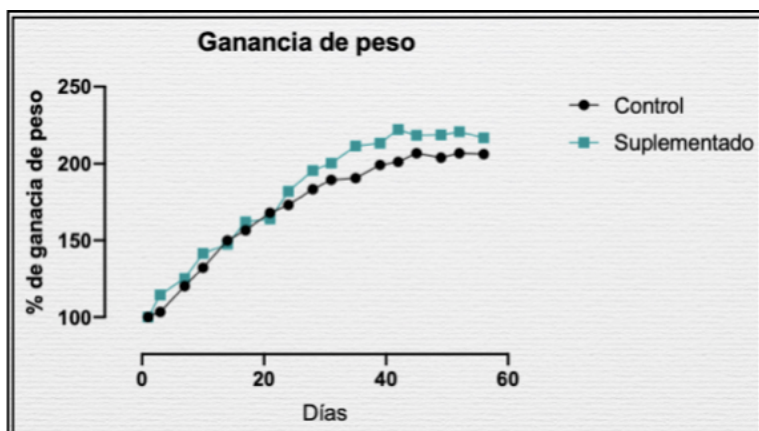


Figura 8. Curva de crecimiento de los animales de ambos grupos durante los 60 días (8 semanas) de duración del experimento, medido en porcentaje.

### J.2 EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO.

En cuanto al consumo de alimento, no existió una diferencia significativa en el consumo de alimento denominado control y el suplementado 56 veces con biotina (tabla 2) Es importante mencionar que los animales no presentaban cambios físicos apreciables en ninguno de los grupos y tampoco se veía afectada su motilidad.

**Tabla 2. Promedios de peso y consumo de alimentos de ambos grupos de animales estudiados**

	Peso promedio al final del experimento (gramos):	Consumo promedio de alimento (gramos):
Grupo control	20.0 ± 1.00	2.81 ± 0.11
Grupo suplementado:	18.3 ± 0.97	2.45 ± 0.11

### J.3 EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA.

Después de 8 semanas de administración de la dieta los ratones fueron puestos en ayuno de 12 horas para ser sometidos a la administración de glucosa (6 mg/kg de peso) y se realizó una curva de tolerancia a la glucosa. De acuerdo a una curva de tolerancia de glucosa se observó que una hora después de haber inyectado una dosis alta de glucosa se obtuvo una diferencia significativa en la respuesta sistémica, representada en la glucosa sanguínea (figura 9), mientras que en los demás tiempos la glucosa se procesó sin diferencias significativas

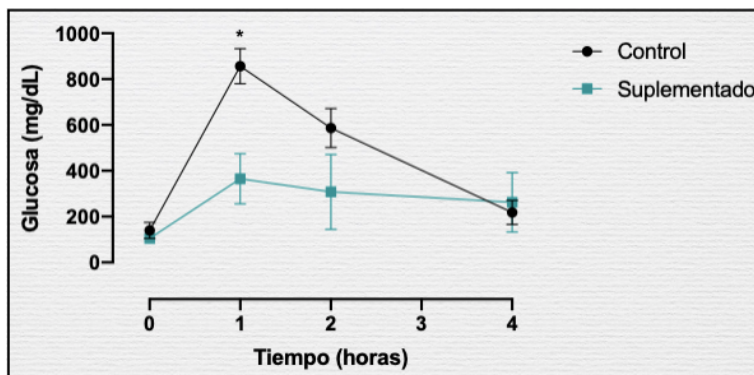
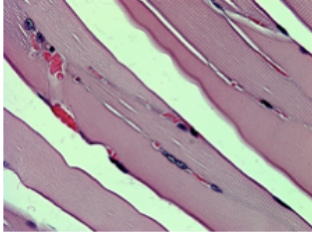


Figura 9. Curva de tolerancia a la glucosa después de la inducción de 6 mg de glucosa por kilogramo de peso. Cada punto de glucosa es un promedio de 5 ratones del grupo control y 4 del grupo suplementado. Se encuentra una diferencia significativa (\*) en la recuperación después de 1 hora de aplicación de glucosa por vía intraperitoneal

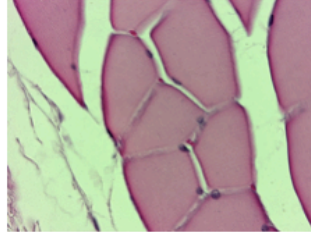
#### J.4 EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN LA HISTOLOGÍA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

Con la tinción de hematoxilina-eosina se pudo observar la organización microscópica del músculo esquelético (figura 10), observando la posición de la fibra muscular, así como la organización de sus núcleos, los cuales tuvieron variaciones relevantes entre los grupos control y suplementado. Como se muestra en el panel A de la figura 10, en el corte longitudinal del músculo de los ratones control se observan los paquetes fibrilares en forma de líneas paralelas cerradas, con espacio intersticial entre ellas libre, y los núcleos organizados en la periferia de la fibra, con su forma canónica aplanada. En el corte transversal (Figura 10-B) se observan los paquetes tubulares de las fibras musculares, con una textura y forma homogénea formando a su vez paquetes mayores, con sus núcleos a la periferia (teñidos en morado). En contraste el grupo que recibió la dieta suplementada con biotina donde también se encuentran las miofibras organizadas de forma paralela (Figura 10-C), es observable la pérdida de esta organización en distintos puntos, apreciándose la formación de una sola fibra gruesa, así como la aparición de espacios y ondulaciones entre ellas. Son observables también, los núcleos alejados de la posición canónica a la periferia de la fibra. En el corte transversal (Figura 10-D) se observan los espacios dentro de los paquetes fibrilares, los cuales pierden su organización uniéndose entre ellos, así mismo se encontraron núcleos alejados considerablemente de la periferia de la fibra muscular (Figura 10-D), estos núcleos presentaban una forma más redondeada y el número de nucleolos canónico (1-2) no era observable (figura 11)

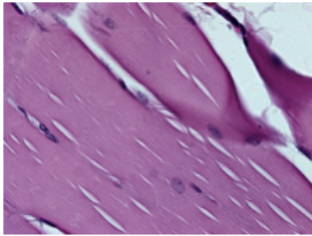
**A)** Corte longitudinal de músculo cuádriceps femoral de ratón alimentado con dieta control. Imagen ampliada 60 veces



**B)** Corte transversal de músculo cuádriceps femoral de ratón alimentado con dieta control. Imagen ampliada 60 veces



**C)** Corte longitudinal de músculo cuádriceps femoral de ratón alimentado con dieta suplementada Imagen ampliada 60 veces



**D)** Corte transversal de músculo cuádriceps femoral de ratón alimentado con dieta suplementada. Imagen ampliada 60 veces

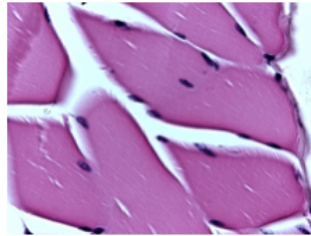
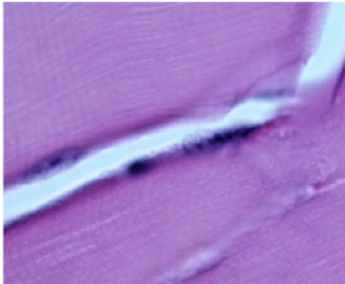


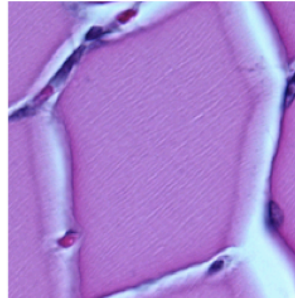
Figura 10. Imagen microscópica del músculo esquelético con la tinción de Hematoxilina-eosina del grupo control en corte longitudinal (A) y transversal (B). Y del grupo suplementado en corte longitudinal (C) y transversal (D). Amplificación 60X



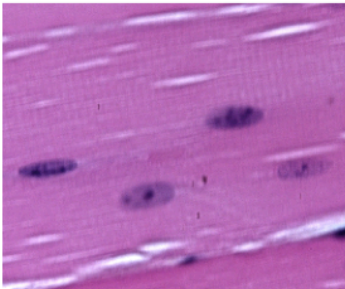
A) Ampliación de los núcleos en un corte longitudinal de músculo esquelético de ratón alimentado con dieta control. Ampliación 60X



B) Ampliación de los núcleos en un corte transversal de músculo esquelético de ratón alimentado con dieta control. Ampliación 60X



C) Ampliación de los núcleos en un corte longitudinal de músculo esquelético de ratón alimentado con dieta suplementada. Ampliación 60X



D) Ampliación de los núcleos en un corte transversal de músculo esquelético de ratón alimentado con dieta suplementada. Ampliación 60X

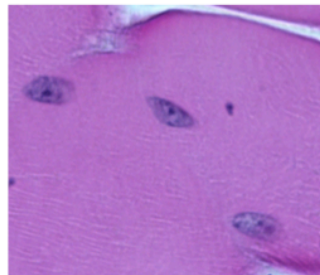


Figura 11. Imagen microscópica de los núcleos de músculo esquelético con la tinción de Hematoxilina-eosina del grupo control en corte longitudinal (A) y transversal (B). Y del grupo suplementado en corte longitudinal (C) y transversal (D). Amplificación 60X

## J.5 EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN EL NÚMERO TOTAL DE NÚCLEOS.

Se contó el número de núcleos presentes en las muestras de 20 ratones control y 20 suplementados con biotina, se seleccionaron 5 laminillas de las cuales se escogieron 10 campos microscopios ampliados a 60 aumentos.. Se realizaron los conteos tanto en ratones en ayuno como en los ratones a los que se les administró la glucosa (6 mg/kg de peso) y se sacrificaron una, dos y cuatro horas después de la inyección ya que los estudios en

nuestro laboratorio (no publicados) encontraron cambios en las proteínas nucleares en respuesta a este tratamiento.

Al finalizar la suplementación con biotina por 8 semanas, no se observaron cambios significativos en el total de núcleos (Figura 12).

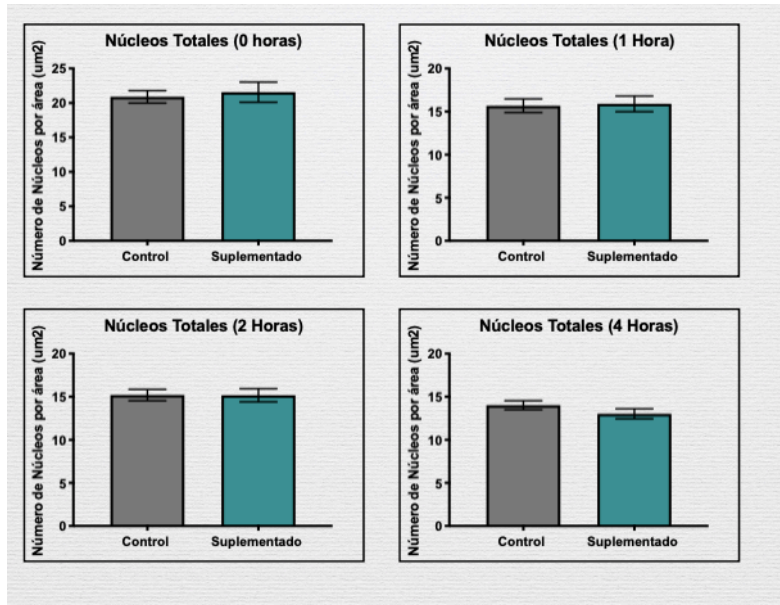


Figura 12. Conteo de núcleos totales. Se representa como el número de núcleos por área ( $\mu\text{m}^2$ ) que existen en el grupo control con respecto al grupo suplementado en un campo de observación. Los datos se presentan con media  $\pm$  error estándar. Se consideraron 40 campos de observación por grupo.

## J.6 EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN EL NÚMERO DE NÚCLEOS REACTIVOS

Con base en la observación del desplazamiento de los núcleos hacia la periferia, además de la modificación de la forma, se analizó la cantidad de núcleos denominados “reactivos” (aquellos núcleos que se encontraban más alejados de la periferia de la fibra, alrededor de 10% de separación de ella; mayor número de nucléolos considerando que el núcleo usualmente

posee 1 o 2 y que su forma sea redondeada diferente a la morfología regular del núcleo de la fibra muscular (la cual es alargada y aplanada) dentro de la fibra muscular, de acuerdo a los criterios presentados anteriormente. Los resultados revelaron que el porcentaje de núcleos reactivos es significativamente mayor en el grupo suplementado que en el grupo control (Figura 13) y que este efecto se observa tanto en ayuno como después de la administración de glucosa.

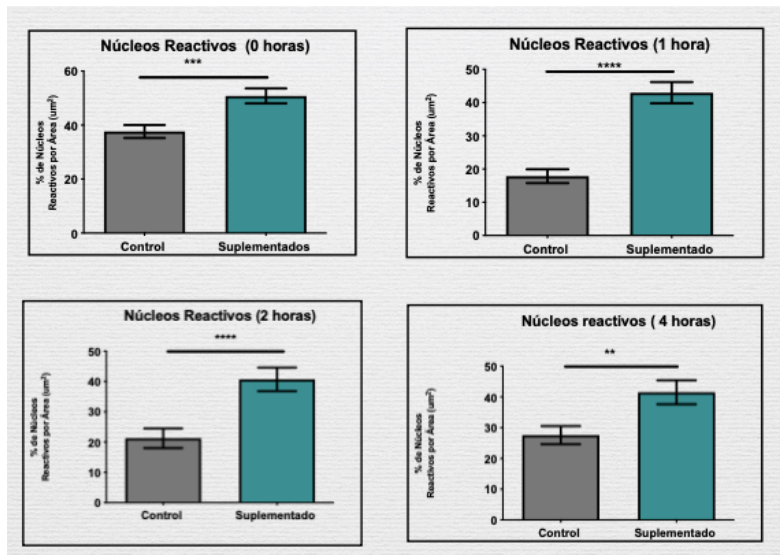


Figura 13. Porcentaje de núcleos reactivos. Se presenta el porcentaje de núcleos reactivos por área ( $\mu\text{m}^2$ ), en un campo de observación. Los datos se presentan con media  $\pm$  error estándar. Se consideraron 40 campos de observación por grupo. \*\*  $P \leq 0.05$ ; \*\*\*  $P \leq 0.005$ ; \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$

## J.7 EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN EL DIAMETRO MAYOR DE LOS NÚCLEOS

Mediante la herramienta computacional Image J, fueron seleccionadas las áreas y los ejes de cada núcleo dentro de un campo de observación. La suplementación con biotina en animales que fueron sometidos a una dosis exacerbada de la misma produjo una diferencia en el diámetro mayor del

núcleo de la fibra muscular después de 1 y 4 horas, mientras que en ayuno y 2 horas después de la inyección no hubo diferencia estadística frente al grupo control (Figura 14).

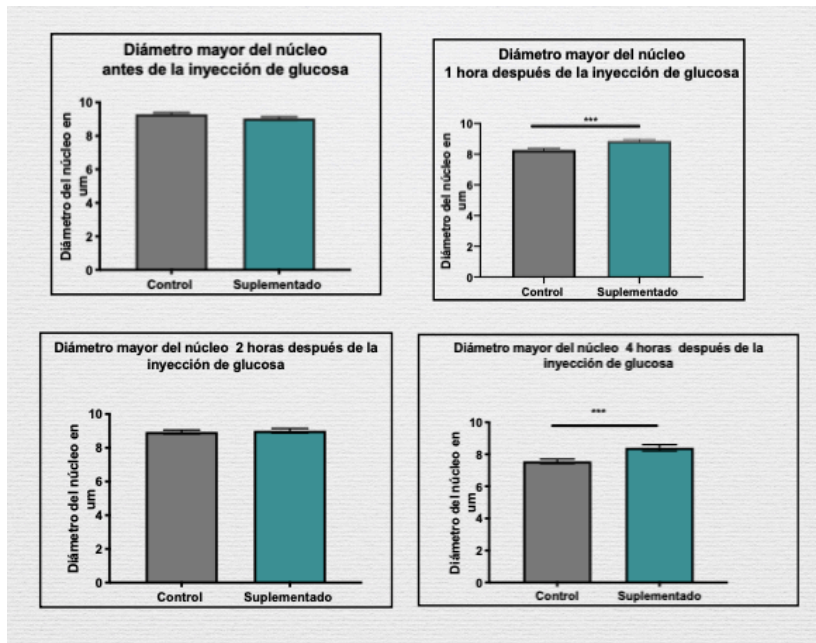


Figura 14. Tamaño del diámetro mayor del núcleo. Se representa como el tamaño del núcleo en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) que existen en el grupo control con respecto al grupo suplementado. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar. Se consideró la observación de 647 núcleos en el grupo control y 547 núcleos en el grupo suplementado. \*\*  $P \leq 0.05$ ; \*\*\*  $P \leq 0.005$ ; \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$

## J.8 EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN EL DIAMETRO MENOR DE LOS NÚCLEOS.

Así mismo, fueron seleccionados con el programa Image J los diámetros menores de los núcleos dentro de cada campo de observación, considerando 10 campos por cada individuo de estudio. El diámetro menor de los núcleos de la fibra muscular no mostró una diferencia estadísticamente significativa en las muestras suplementadas (Figura 15) lo

que indica que el núcleo adquiere una forma elíptica incrementando el largo del organelo.

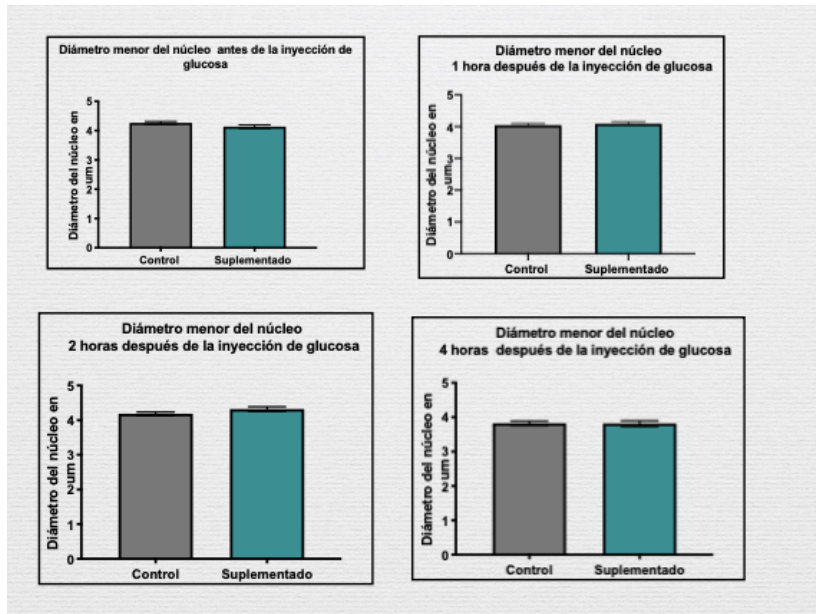
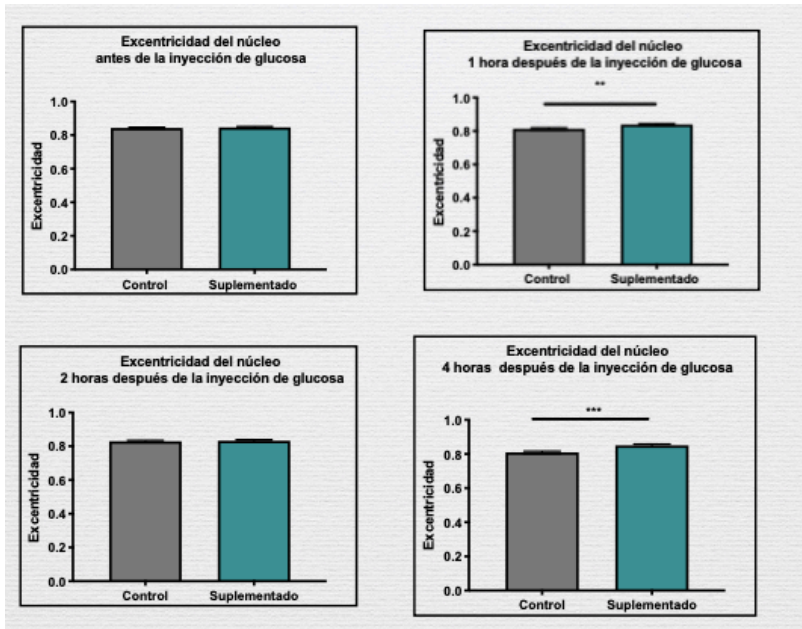


Figura 15. Tamaño del diámetro menor del núcleo. Se representa como el tamaño del núcleo en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) que existen en el grupo control con respecto al grupo suplementado. Los datos se presentan con promedio  $\pm$  error estándar. Se consideró la observación de 647 núcleos en el grupo control y 547 núcleos en el grupo suplementado. \*\*  $P \leq 0.05$ ; \*\*\*  $P \leq 0.005$ ; \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$

### J.9 EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN LA FORMA ELÍPTICA DEL NÚCLEO.

Se tomaron las consideraciones matemáticas de la medición de la forma elíptica del núcleo. Para tomar estas mediciones se consideró la excentricidad de la elipse. En geometría se considera a la excentricidad como un parámetro que determina la desviación de una sección cónica con respecto a una circunferencia, es decir el grado de “aplanamiento” de un círculo. La excentricidad de una elipse es mayor que cero y menor que 1 ( $0 < \epsilon < 1$ ). Se observó que existen diferencias significativas entre las

muestras suplementadas con biotina y que después de una dosis exacerbada de glucosa, fueron extraídas (1 y 4 horas después de la inyección intraperitoneal) (Figura 16)



**Figura 16.** Medición de la excentricidad del núcleo. Se explica como la relación entre los ejes, mientras más cercano a 1 el núcleo será más elíptico. Los datos se presentan con promedio  $\pm$  error estándar. Se consideró la observación de 647 núcleos en el grupo control y 547 núcleos en el grupo suplementado. \*\*  $P \leq 0.05$ ; \*\*\*  $P \leq 0.005$ ; \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$

## K. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo apoyan investigaciones previas que señalan que la concentración farmacológica de la vitamina biotina, modifica la

morfología tisular (Lazo-de-la Vega 2013, Riverón-Negrete 2016, Aldamash 2016, Aldamash 2015). En el músculo existen diferencias sustanciales entre el cuádriceps femoral de los ratones control y los ratones suplementados. Se aprecian fibras modificadas (Figura 10) en el grupo suplementado (Figura 10-C) se observa como las fibras musculares van perdiendo su uniformidad en comparación con las fibras control (Figura 10-A). El músculo esquelético se caracteriza por poseer fibras elongadas de diámetro largo y forma uniforme (Bocca Vieira de Rezende Pinto et al. 2015), estas características pueden ser vistas tanto en el corte longitudinal (Figura 10-A) como en el corte histológico transversal (Figura 10-B) en donde se puede apreciar como las fibras tienen un diámetro similar y coloración uniforme, lo que indica una conservación de las propiedades del tejido, así mismo se pueden distinguir las separaciones, sin coloración, definidas entre cada fibra muscular.

Esta organización responde a la jerarquía de fascículos de músculo esquelético los cuales están unidos por tejido conectivo delgado (perimisio) y forman de esta manera el volumen homogéneo del músculo el cual, por su parte, está rodeado del episimio, un tejido conectivo rico en colágeno. En el grupo suplementado con biotina (Figura 10-C y 10-D) podemos observar la pérdida de esta homogeneidad muscular pues se presentan daños tipo "rasgadura" en la fibra muscular. Además, en el grupo suplementado en corte longitudinal (Figura 10-C) se puede apreciar la pérdida de la separación entre cada fibra, ya no es apreciable el espacio dejado por el tejido conectivo, el cual se observa perfectamente en el grupo control (Figura 10-A).

Es importante mencionar que esta observación se hizo en todos los ratones pertenecientes al grupo suplementado (n=20) y el daño apareció de manera independiente a la inducción con glucosa y no se encontró en el grupo control. Dado que ambos grupos fueron tratados al mismo tiempo y en forma igual durante el procedimiento de corte histológico y tinción con

hematoxilina-eosina, se descartó que las “rasgaduras” fueran un producto de la técnica. También es necesario señalar que de manera macroscópica no hubo cambios en la motilidad de los animales. De igual manera es importante mencionar que se seleccionó el músculo cuádriceps femoral debido a que para los estudios histológicos es necesario obtener un tejido que sea abundante en el modelo trabajado (ratón común: *mus musculus*) y posea ambos tipos de fibras, características que cumple este músculo en específico.

Diversos estudios reflejan cambios similares en las fibras relacionados con atrofas de tipo miopáticas, en sus estados iniciales (Shin et al. 2017, Shin et al. 2014). Las miopatías reflejan a las patologías musculares adquiridas o genéticas que se manifiestan en un espectro clínico muy amplio dependiendo de la edad del individuo, el cuadro clínico, las bases moleculares y genéticas del padecimiento y el tipo de fibra muscular que se asocia a la disfunción. Las miopatías pueden presentarse de manera espontánea debido a alguna mutación genética, generalmente congénita, como mialgias inducidas por el ejercicio o en forma de debilidad muscular, la cual también puede ser aislada o inducida por factores específicos (medicamentosos o ambientales), fatiga e incluso como atrofia muscular (Bocca Vieira de Rezende Pinto et al. 2015) como primeros síntomas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, de manera macroscópica no se observó ningún síntoma correspondiente a una miopatía en los ratos, que además eran aparentemente sanos y presentaban la misma tasa tanto de crecimiento como de consumo de alimento entre los grupos control y suplementado.

Una de las modificaciones más importantes observadas fue el cambio en la localización de los núcleos además, se encontró una diferencia significativa en la presencia de núcleos reactivos, es decir aquellos que presentaban los tres criterios de exclusión que se definieron al inicio del experimento:



posición alejada más del 10% del límite de la fibra muscular, forma redondeada y un mayor número de nucléolos (entre tres y cuatro); lo que se podía definir como aquellos núcleos diferentes a la posición y forma canónica. Esto puede ser observado en las ampliaciones de los núcleos (Figura 11), en donde se aprecia la organización de los núcleos en la fibra del grupo control tanto en un corte longitudinal (Figura 11-A) como en un corte transversal (Figura 11-B) estos núcleos que se denominaron como canónicos o “no reactivos” poseen la forma histológica común del núcleo la cual es la de una célula elíptica en posición subsarcolémica (Bocca Vieira de Rezende Pinto et al. 2015), además de uno o dos nucléolos y la posición sobre la periferia de la fibra. Por su parte, en el grupo suplementado se encontró que los núcleos no cumplían con estas características (Figura 11-C y Figura 11-D). El porcentaje de estos núcleos fue cuantificado (Figura 13), obteniendo un aumento significativo de los mismos en el grupo suplementado, sin cambios en el número total de núcleos (Figura 12) lo que sugiere que no hubo un daño que orillar al núcleo a apoptosis, pero si modificaciones que produjeron un cambio en su localización. Esto indica un cambio en las proteínas estructurales que participan en el desplazamiento de los núcleos. Se sabe que este mecanismo es mediado por proteínas de citoesqueleto tales como actina, tubulina, desmina, dinamina y miosina, (Fongy et al. 2018) por lo que en estudios futuros se analizará la síntesis de las mismas y la capacidad de polimerización. Es importante señalar que se ha estudiado ampliamente la posición central del núcleo en mutaciones causantes de miopatías y en eventos atróficos y regenerativos, dados por sobrecarga, degeneración o neuropatías (Bouché et al. 2018, Fongy et al. 2018, Swery & Pettersson, 2016. Schiaffino et al. 2013.) Sin embargo, nunca se ha reportado la posición central del núcleo debido a una sustancia y en particular a una vitamina.

También se observaron cambios en la arquitectura nuclear viendo una elongación, la cual ocurre a lo largo y no a lo ancho del núcleo. (Figura 14 y

Figura 16). La elongación de los núcleos esta dado por la familia de las laminas nucleares, así como los polipéptidos asociados a ella (Khajda S, et al. 2014, Shin et al. 2014). En estudios no publicados del laboratorio se encontró que la administración de la misma dosis exacerbada de glucosa modifica la abundancia de la proteína Lamina B en el núcleo del hepatocito. La lámina tiene una participación importante en la modificación de la arquitectura nuclear y este trabajo reveló que la elongación de los núcleos es significativamente relevante después de la administración de glucosa y no en el estado basal. Se ha estudiado que existen modificaciones en el músculo esquelético, acorde a su participación con la homeostasis de la glucosa, después de ingestas de dosis altas en glucosa o de dietas altas en carbohidratos y ácidos grasos, pero no se ha reportado que estas modificaciones puedan ocurrir en el núcleo de la fibra muscular. Es interesante agregar que las modificaciones en tamaño y forma del núcleo al ser inducida la dosis alta de glucosa, solo fueron vistas en individuos que pertenecían al grupo control. Se realizó una prueba estadística de ANOVA de dos vías para comparar tanto entre horas como entre grupos control y suplementado y solo se encontraron cambios significativos en los grupos llamados 1 hora suplementado y 4 horas suplementado. Es decir que la modificación de la forma y tamaño de los núcleos estuvo mediada no solo por la inducción de glucosa, sino también por la suplementación con biotina durante 8 semanas.

La homeostasis del músculo esquelético es un equilibrio muy delicado entre la síntesis y la degradación de proteínas, se han estudiado diversos blancos y vías que se encargan de su regulación y se encuentran modificados en patologías relacionadas con la aparición de los núcleos centrales. Esto es, sin embargo, caracterizado por la pérdida de la masa muscular y el desarreglo de la fibra canónica (Carraro et al. 2015, Judson et al. 2013, Liang et al. 2009, Zhao et al. 2006) Debido a que no hemos encontrado aún pérdida de la masa muscular, se podría inferir que se trata de una etapa

temprana de degeneración no asociada a mutaciones. Sin embargo, sería interesante analizar las vías moleculares de la homeostasis de la fibra muscular en la suplementación con biotina.

Es importante señalar que la biotina es una vitamina que se vende libremente en sus dosis farmacológicas. Es fácil encontrarla en tiendas especializadas de suplementos alimenticios, supermercados y farmacias. La administración de esta vitamina se considera inocua para humanos y roedores. Los animales que fueron estudiados para esta serie de experimentos no presentaban cambios físicos aparentes, es decir: su pelaje, peso, comportamiento y motilidad eran las mismas que en el grupo no suplementado, (Figura 9 y Tabla 2) además de que en las pruebas clásicas de toxicidad muscular (artículo en proceso) no se muestra algún daño por la presencia de la vitamina, correspondiente con los datos publicados en hígado (Riverón-Negrete et al 2016). Sin embargo, nuestros resultados histológicos son comparativos con las patologías publicadas de miopatías centro nucleares. Por lo que este trabajo levanta señales de alerta sobre la suplementación sin control con biotina.

En diversos estudios realizados sobre la morfología de tejidos en respuesta a una suplementación de dosis farmacológica de biotina del orden de miligramos se han encontrado modificaciones histológicas de relevancia. Correspondiente con nuestros resultados mostrados en núcleo del músculo esquelético, estudios previos en hepatocitos reportaron un aumento en el porcentaje de núcleos con nucleomegalia (33%) y de células binucleadas (66%), mientras que en ese tejido son resultado de la poliploidia propia del tejido, en el tejido muscular no ocurre este proceso. En el músculo esquelético en los procesos de multinucleación intervienen las células satélite, mioblastos maduros en estado quiescente que se encuentran en la periferia de la célula y se introducen a la misma después de un daño reparable para regenerar la fibra muscular (Braun & Gautel, 2011) por ello

se podría considerar también que después de la suplementación con biotina el cambio histológico de la fibra muscular esté dado por la acción de las células satélite sobre la misma. En estudios realizados recientemente sobre el efecto de la suplementación con biotina en un tejido altamente proliferativo como lo es el testículo y el espermatozoide se encontraron cambios morfológicos en el número de túbulos seminíferos con lumen no-invisible, espacios intratubulares y aumento de células de Leydig. Se encontró también modificación en el epitelio y la aparición de túbulos seminíferos elongados (Pastén-Hidalgo et al. 2019) , esto es importante de señalar pues se trata al igual del músculo de un tejido que es altamente sensible y cuyos cambios histológicos repercuten directamente en la función, lo cual indica que es apremiante realizar más estudios sobre el efecto de la vitamina en el músculo esquelético.

En conclusión los estudios presentados en el presente proyecto muestran la necesidad de ampliar los estudios morfológicos y toxicológicos sobre esta vitamina, haciendo estudios diversos como enfrentar a los ratones suplementados con biotina a un reto de ejercicio o observar el desarrollo muscular en el envejecimiento.

## L. CONCLUSIONES

La suplementación con biotina durante 8 semanas posteriores al destete modificó la estructura general del músculo esquelético, provocando una desorganización en la forma canónica de la fibra muscular que no condiciona la motilidad del animal.

La suplementación con biotina durante 8 semanas posteriores al destete modifica la localización de sus núcleos pero no el número total de los mismos, así como la arquitectura nuclear (dentro de la curva de glucosa en tiempos posteriores al ayuno).

Se corroboró que la suplementación con biotina durante 8 semanas modifica la tolerancia a la glucosa a través de la prueba de tolerancia a la glucosa.

En resumen, esta suplementación produjo modificaciones histológicas en el músculo esquelético, el cual es participante activo de la homeostasis de la glucosa, además de ser un tejido vital para la motilidad y el metabolismo de los animales. Estos resultados ponen en alerta el uso descontrolado de esta vitamina como suplemento alimenticio. Por lo anterior se confirma la hipótesis propuesta al inicio de este proyecto.

## M. PERSPECTIVAS

Se necesitarán más estudios enfocados en conocer los mecanismos por los cuales la suplementación con biotina durante 8 semanas posteriores al destete ocasiona el cambio en la posición de los núcleos de la fibra muscular, para ello se debería considerar el estudio de las proteínas estructurales que contribuyen a su movimiento y al mantenimiento de su posición, así como de las proteínas nucleares que son vitales para este proceso.

Además, sería interesante la realización de estudios de proteínas nucleares después del ayuno para conocer los mecanismos por los cuales ocurre la elongación nuclear del músculo esquelético, ya que tanto su forma como posición son importantes para su correcta función y coordinación con el sistema nervioso.

## N. REFERENCIAS

Aguilera-Méndez A, Fernández-Mejía C. (2012). The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. Biofactors. Sep-Oct;38(5):387-94.

Aldamash, B.A., El-Nagar D.N., Ibrahim K.E., Metwaly M, 2015. Biotin amelioration of nephrotoxicity in streptozotocin-induced diabetic mice. Saudi Journal of Biological Sciences (2015) 22, 564–569

Aldamash, B.A., El-Nagar, D.M., Ibrahim, K.E., 2016. Attenuation of Hepatotoxicity and Oxidative Stress in Diabetes STZ-induced Type 1 by Biotin Swiss Albino Mice. Saudi J Biol Sci. 23:311-7

Anderson, J. E. (2006). The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. J ExpBiol 209: 2276-92.

Azzimato V, Gennebäck N, Tabish A.M, Buyandelger B, Knöll R. (2016) Desmin, desminopathy and the complexity of genetics. J Mol Cell Cardiol. 92:93-5.

Báez-Saldaña A, Zendejas-Ruiz I, Revilla-Monsalve C, Islas-Andrade S, Cárdenas A, Rojas-Ochoa A, Vilches A, Fernandez-Mejia C. (2004) Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. Am J Clin Nutr. 79(2):238-43.

Braun T, Gautel M. (2011) Reviews. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. NATURE REVIEWS. Molecular cell biology. Vol 12. 349-361

Beiner JM, Jokl P. (2001). Muscle contusion injuries: current treatment options. J Am Acad Orthop Surg. 9(4):227-37.

Bocca Vieira de Rezende Pinto, W., Sgobbi de Souza P.V., Souza Bulle Oliveira A. 2015. Normal muscle structure, growth, development, and regeneration. Curr Rev Musculoskelet Med 8:176–181 DOI 10.1007/s12178-015-9267-x

Boon-Villa D, Aguilera A, Miranda-Cervantes A, Fernandez-Mejia, C. (2015). Effects of Biotin Supplementation in the Diet on Adipose Tissue cGMP Concentrations, AMPK Activation, Lipolysis, and Serum-Free Fatty Acid Levels. Journal of medicinal food 18(10).

Bottinelli R, Canepari M, Reggiani C, Stienen G.J. (1994). Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. J Physiol. 481 ( Pt 3):663-75.

Bouchè M, Lozanoska-Ochser B, Proietti D, Madaro L. (2018) Do neurogenic and cancer-induced muscle atrophy follow common or divergent paths?. Eur J Transl Myol 28 (4): 393-400.

Boscolo Sesillo F, Fox D, Sacco A. (2019). Muscle Stem Cells Give Rise to Rhabdomyosarcomas in a Severe Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. Cell Rep. 26(3):689-701

Braun T, Gautel M. (2011). Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 12(6):349-61.

Capetanaki Y, Bloch R.J, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S. (2007) Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. Exp Cell Res. 313(10):2063-76.



Carraro U, Boncompagni S, Gobbo V, Rossini K, Zampieri S, Mosole S, Ravara B, Nori A, Stramare R, Ambrosio F, Piccione F, Masiero S, Vindigni V, Gargiulo P, Protasi F, Kern H, Pond A, Marcante A. (2015). Persistent muscle fiber regeneration in long term denervation. Past, present, future. Eur J Transl Myol - Basic Appl Myol 25 (2): 77-92.

Chal J, Pourquié O. (2017). REVIEW Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. Development. 144: 2104-2122; doi: 10.1242/dev.151035

Chauban, J. & Dakshinamurti, K.(1991) Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. J BiolChem 266, 10035-8.

Cheung TH, Rando TA. (2013). Molecular regulation of stem cell quiescence. Nat Rev Mol Cell Biol. Jun;14(6):329-40.

Counsel P, Bredahl W. (2010) Muscle injuries of the lower leg. Semin Musculoskelet Radiol. 14(2):162-75.

Dakshinamurti, K. Li, W. (1994) Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvatecarboxykinase by biotin in diabetic rats. Mol CellBiochem 132, 127-32.

Dakshinamurti, K. J. (2005). Biotin--a regulator of gene expression. NutrBiochem. 16. 419-23.

Darr KC, Schultz E. (1987). Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. J Appl Physiol (1985). 63(5).

De La Vega, L.A. & Stockert, R.J. (2000) Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. Am J PhysiolCellPhysiol 279, C 2037-42.

Dokusova O.K, Krivoruchenko I.V. (1972). The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia. *Kardiologija.* (12):113.

Eguchi, S., Tokunaga, C., Hidayat, S., Oshiro, N., Yoshino, K., Kikkawa, U., and Yonezawa, K. (2006). Different roles for the TOS and RAIP motifs of the translational regulator protein 4E-BP1 in the association with raptor and phosphorylation by mTOR in the regulation of cell size. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 11, 757-766.

Exeter, D., & Connell, D. (2010). Skeletal Muscle: Functional Anatomy and Pathophysiology. *Seminars in Musculoskeletal Radiology.* 14(02), 097–105. doi:10.1055/s-0030-1253154

Fernandez-Mejia, C. & Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L., 2011. Biological Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine.* 16(1). Pp. 40-48.

Fongy A, Falcone S., Lainé J, Prudhon B, Martins-Bach A, Bitoun M. (2018). Nuclear defects in skeletal muscle from a Dynamin 2-linked centronuclear myopathy mouse model. *Scientific Reports.* 9:1580.

Gómez-Zorita S, Urdampilleta A. (2012). El GLUT4: efectos de la actividad física y aspectos nutricionales en los mecanismos de captación de glucosa y sus aplicaciones en la diabetes tipo 2. *Avances en Diabetología* 2012;28(1): 19-26.

Haun CT, Vann CG, Roberts BM, Vigotsky AD, Schoenfeld BJ and Roberts MD (2019) A Critical Evaluation of the Biological Construct Skeletal Muscle Hypertrophy: Size Matters but So Does the Measurement. *Front. Physiol.* 10:247. doi: 10.3389/fphys.2019.00247

Henke SK, Cronan JE (2014) Successful Conversion of the Bacillus subtilis BirA Group II Biotin Protein Ligase into a Group I Ligase. PLoS ONE 9(5): e96757. doi:10.1371/journal.pone.0096757

Huard J, Li Y, Fu FH. (2002). Muscle injuries and repair: current trends in research. J Bone Joint Surg Am. May;84-A(5):822-32.

Hudson M.B, Pierce S.R. (2013) Calcineurin: A poorly understood regulator of muscle mass. Int J Biochem Cell Bio. 45:2173-2178.

Judson RN, Gray SR, Walker C, Carroll AM, Itzstein C, et al. (2013) Constitutive Expression of Yes-Associated Protein (Yap) in Adult Skeletal Muscle Fibres Induces Muscle Atrophy and Myopathy. PLoS ONE 8(3): e59622.

Kablar B, Rudnicki M.A. (2000). Skeletal muscle development in the mouse embryo. Histol Histopathol (2000) 15: 649-656.

Keren, A., Tamir, Y., and Bengal, E. (2006). The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. Molecular and cellular endocrinology 252, 22423.

Khadija S, Veluthakal R, Sidarala V, Kowluru A (2014) Glucotoxic and Diabetic conditions induce caspase 6-mediated degradation on nuclear lamin A in human islets, rodent islets and INS-1 832/13 cells. Apoptosis (2014) December; 19(2): 1691-1701.

Koutakis P, Miserlis D, Myers S.A, Kim J.K, Zhu Z, Papoutsis E, Swanson S.A, Haynatzki G, Ha D.M, Carpenter L.A, McComb R.D, Johanning J.M, Casale G.P, Pipinos I.I. (2015) Abnormal accumulation of desmin in gastrocnemius myofibers of patients with peripheral artery disease: associations with altered myofiber morphology and density, mitochondrial

dysfunction and impaired limb function. J Histochem Cytochem. 63(4):256-69.

Kuang S, Rudnicki MA. (2008). The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. Trends Mol Med. Feb;14(2):82-91.

Lambert M, Bastide B, Cieniewski-Bernard C. (2018) Involvement of O-GlcNAcylation in the Skeletal Muscle Physiology and Physiopathology: Focus on Muscle Metabolism. Front Endocrinol (Lausanne). 16;9:578.

Larrieta E, Vega-Monroy ML, Vital P, German MS, Hafidi ME, Fernandez-Mejia C. (2012) Effects of biotin deficiency on pancreatic islet morphology, insulin sensitivity and glucose homeostasis. Journal of Nutritional Biochemistry 23(4) 392-9.

Lazarides E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. Nature. 17;283(5744):249-256.

Lazo-de-la-Vega-Monroy ML, Larrieta E, German, MS, Baez-Saldana A, Fernandez-Mejia C (2013) Effects of Biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. Journal of Nutritional Biochemistry 24 169–177.

Laing N.G (Editor) (2008). The Sarcomere and Skeletal Muscle Disease. Advances in Experimental Medicine and Biology Vol. 642.

Liang J, Parchaliuk D, Medina S, Sorensen G, Landry L, Huang S, Wang M, Kong Q, Booth S.A. (2009). Activation of p53-regulated pro-apoptotic signaling pathways in PrP-mediated myopathy. BMC Genomics 10:201.

Mahnart A, Windner S, Baylies, M, Mogliner A. (2018). Mechanical positioning of multiple nuclei in muscle cells. PLoSComputBiol 14(6). 1-25.

Marshall M.W, Knox V.A, Trout D.L, Durand AMA, Benton DA. (1972) Biotin status and lipid metabolism in young inbred rats. Nutr Rep Inter 1972; 5(3): 201–12.

Marshall M.W, Haubrich M, Washington V.A, Chang M.W, Young C.W, Wheeler M.A. (1976) Biotin status and lipid metabolism in adult obese hypercholesterolemic inbred rats. Nutr Metab (1): 41–61.

Mazzotti A.L, Coletti D. (2016). The Need for a Consensus on the Locution "Central Nuclei" in Striated Muscle Myopathies. Front Physiol. 7:577.

Moreno-Méndez E, Hernández-Vázquez A, Fernández-Mejía C. (2019) Effect of biotin supplementation on fatty acid metabolic pathways in 3T3-L1 adipocytes. Biofactors. 45(2):259-270.

Murach K.A, Englund D.A, Dupont-Versteegden E.E, McCarthy J.J and Peterson C.A. (2018) Myonuclear Domain Flexibility Challenges Rigid Assumptions on Satellite Cell Contribution to Skeletal Muscle Fiber Hypertrophy. Front. Physiol.

Pastén-Hidalgo K, Riverón-Negrete L, Sicilia-Argumedo G, Canul-Medina G, Salazar-Anzures T, Tapia-Rodríguez M, Hernández-Gonzales EO, Roa-Espitia AL, Cedillo-Peláez, C, Fernández-Mejía, C. 2019. Dietary Biotin Supplementation Impairs Testis Morphology and Sperm Quality. J Med Food 00 (0) 2019, 1–10

Perillo M, Folker E.S. (2019) Specialized Positioning of Myonuclei Near Cell-Cell Junctions. Front Physiol. 2018 9:1531

Revilla-Monsalve C, Zendejas-Ruiz I, Islas-Andrade S, Báez-Saldaña A, Palomino-Garibay M.A, Hernández-Quiróz P.M, Fernandez-Mejia C. (2006). Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. Biomed Pharmacother. 60(4):182-5.

Riveron-Negrete L, Fernandez-Mejia C. (2017). Pharmacological Effects of Biotin in Animals. *Mini Rev Med Chem*. 17(6):529-540.

Riverón-Negrete L, Sicilia-Argumedo G, Álvarez-Delgado C, Coballase-Urrutia E, Alcántar-Fernández J, Fernandez-Mejia C. (2016). Dietary Biotin Supplementation Modifies Hepatic Morphology without Changes in Liver Toxicity Markers. *Biomed Res Int*. 7276463.

Roman W, Martins JP, Carvalho FA, Voituriez R, Abella JVG, Santos NC, Cadot B, Way M, Gomes ER. (2017). Myofibril contraction and crosslinking drive nuclear movement to the periphery of skeletal muscle. *Nat Cell Biol*. Oct;19(10):1189-1201.

Roman W, Gomes E.R. (2018). Nuclear positioning in skeletal muscle. *Semin Cell Dev Biol*. 82:51-56

Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, S. German M, M. Matschinsky F, Velázquez-Arellano A, Wang J, Fernandez-Mejia C. (1999). Biotin Regulation of Pancreatic Glucokinase and Insulin in Primary Cultured Rat Islets and in Biotin- Deficient Rats 1. *Endocrinology*. 140. 4595-600.

Rodriguez-Melendez, R., Griffin, J. B., Sarath, G. Zemleni, J. (2005). High-throughput immunoblotting identifies biotin-dependent signaling proteins in HepG2 hepatocarcinoma cells. *J Nutr*. 135. 1659-66.

Said H.M. (2012). Biotin: biochemical, physiological and clinical aspects. *Subcell Biochem*. 56:1-19.

Sandri, M., Lin, J., Handschin, C., Yang, W., Arany, Z.P., Lecker, S.H., Goldberg, A.L., and Spiegelman, B.M. (2006). PGC1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 16260-16265.

Sartorelli V, Fulco M. (2004). Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. Sci STKE. (244):re11.

Schiaffino S, Reggiani C. (2011) . Fiber types in mammalian skeletal muscles. Physiol Rev. 91(4):1447-531.

Schiaffino S, Dyar K.A, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. FEBS Journal 280: 4294–4314

Sewry C.A. and Wallgren-Pettersson C. (2016). Myopathology in Congenital Myopathies. Neuropathol Appl Neurobiol. 43(1):5-23.

Shin J, Dauer W.T, Worman H.J. (2014). Lamina-associated Polypeptide 1: Protein Interactions and Tissue-selective Functions. Semin Cell Dev Biol. May ; 0: 164–168.

Shin J, Méndez-Lopez I, Hong M, Wang Y, Tanji K, Wu W, Shugol L, Krauss R.S, Dauer W.T, Worman H.J. (2017) Lamina-associated polypeptide 1 is dispensable for embryonic myogenesis but required for postnatal skeletal muscle growth. Human Molecular Genetics. (26)1 65–78.

Snow MH. (1978). An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. Cell Tissue Res. 186(3):535-40.

Storey N.M, Stratton R.C, Rainbow R.D, Standen N.B, Lodwick D. (2013). Kir6.2 limits Ca(2+) overload and mitochondrial oscillations of ventricular myocytes in response to metabolic stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 305(10):H1508-18.

Tabolt J and Maves L (2016) Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2016 July ; 5(4): 518–534. doi:10.1002/wdev.230.

Tajbakhsh, S. and Buckingham, M. (2000). The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. Current topics in developmental biology 48, 225-268.

Tajbakhsh, S. (2003). Stem cells to tissue: molecular, cellular and anatomical heterogeneity in skeletal muscle. Current opinion in genetics & development 13, 413-422.

Tixi-Verdugo W, Contreras-Ramos J, Sicilia-Argumedo G, German MS, Fernandez-Mejia C. (2017) Effects of Biotin Supplementation During the First Week Postweaning Increases Pancreatic Islet Area, Beta-Cell Proportion, Islets Number, and Beta-Cell Proliferation. J Med Food 21 (3) 2018, 274–281

Vilches-Flores, A. & Fernandez-Mejia. (2005). Effect of biotin upon gene expression and metabolism. *RevInvestClin.* 57. 716-24.

Vilches-Flores A1, Tovar AR, Marin-Hernandez A, Rojas-Ochoa A, Fernandez-Mejia C. (2009). Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. J Nutr Biochem.21(7):606-12.

Volk T, Wang S. (2015). Protection of muscle nuclei. Oncotarget. 6(27):23046-7.



Wiedmann, S., Rodriguez-Melendez, R., Ortega-Cuellar, D. Zempleni, J. (2004). Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J NutrBiochem.* 15. 433-9.

Williamson, D., Gallagher, P., Harber, M., Hollon, C., and Trappe, S. (2003). Mitogenactivated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. *The Journal of physiology* 547, 977-987.

Windner S.E, Manhart A, Brown A, Mogilner A, Baylies M.K. (2019) Nuclear Scaling Is Coordinated among Individual Nuclei in Multinucleated Muscle Fibers. *Dev Cell.* 49(1):48-62.

Wing S.S, Lecker S.H, Jagoe R.T. (2011) Proteolysis in illness-associated skeletal muscle atrophy: from pathways to networks. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 48(2):49-70.

White, R.B., Bierinx, A.S., Gnocchi, V.F., and Zammit, P.S. (2010). Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC developmental biology* 10, 21.

Zempleni J. (2005). Uptake, localization, and noncarboxylase roles of biotin. *Annu Rev Nutr.* 2005; 25: 175-96. DOI: 10.1146/annurev.nutr.25.121304.131724

Zhao P, Caretti G, Mitchell S, McKeehan W.L, Boskey A.L, Pachman L.M, Sartorelli V, Hoffman E.P. (2006). Fgfr4 is required for effective muscle regeneration in vivo: Delineation of a MyoD-Tead2-Fgfr4 transcriptional pathway. *J Biol Chem.* 6; 281(1): 429–438.

