



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON
BIOTINA EN LA MORFOLOGÍA DE LA FIBRAS
MUSCULARES Y EL CONTENIDO DE COLÁGENO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ITZANI JIMÉNEZ RAMOS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARIA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA



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.

Este trabajo de tesis fue realizado en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM / Instituto Nacional de Pediatría

Se agradece el apoyo técnico brindado por todos los y las trabajadoras, investigadoras y estudiantes que integran la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas

Agradecimientos

A la Dra. Cristina Fernandez Mejía, por darme la oportunidad de demostrar que puedo hacerlo, por brindarme el conocimiento, la orientación y el apoyo necesario para la realización de este trabajo, pero sobre todo por su paciencia y comprensión en los momentos más difíciles.

A mi comité tutorial por sus observaciones y comentarios que me ayudaron a mejorar este trabajo.

A mis compañeras de laboratorio por enseñarme las técnicas, guiarme y brindarme un espacio siempre ameno durante la realización de este trabajo.

A mi madre, que aunque no me creía, me apoyó a su extraña manera.

A mis hermanas, con quienes he aprendido tantas cosas que me han convertido en mejor persona.

A mis amigos de toda la vida, por estar ahí cuando hacía falta una reunión para algo más que despejarse.

A Valeria, quien me apoyó en las peores situaciones y en ningún momento dudó de mi capacidad para lograrlo.

Y desde luego, a mí, por no abandonarme.

Dedicatoria

A mí... Por lograrlo.

“Este trabajo es testimonio de tu capacidad. Cuando vuelvas a dudar, solo recuerda que ya no estás solo, porque yo estoy contigo”

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biotina

1.1.1. Estructura

1.1.2. Funciones

1.1.3. Requerimientos

1.1.4. Digestión y absorción

1.1.5. Efectos de la suplementación con biotina

1.1.6. Toxicidad de la biotina

1.2. Músculo esquelético

1.2.1. Estructura

1.2.2. Función

1.2.3. Daño

1.2.4. Colágeno

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3. HIPÓTESIS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos particulares

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Modelo animal

6.2. Morfología de las fibras

6.3. Proporción de colágeno

6.4. Expresión relativa de *Col1a1*

6.5. Análisis estadístico

7. RESULTADOS

7.1. Efecto de la suplementación con biotina sobre la morfología de las miofibras

7.2. Efecto de la suplementación con biotina sobre el porcentaje de colágeno

7.3. Efecto de la suplementación con biotina sobre la expresión de *Col1a1*

- 8. DISCUSIÓN**
- 9. CONCLUSIONES**
- 10. PERSPECTIVAS**
- 11. REFERENCIAS**
- 12. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**
- 13. ÍNDICE DE FIGURAS**

RESUMEN

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B que actúa como cofactor de carboxilasas. En concentraciones farmacológicas produce modificaciones importantes en la morfología de diferentes tejidos. Estudios previos en el laboratorio revelaron que una dieta suplementada con biotina durante 8 semanas produce modificaciones importantes en la posición de los núcleos dentro de las células musculares y desorganización en la ultraestructura del músculo.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar algunos parámetros morfológicos de las fibras musculares, así como el espacio intersticial y el contenido de colágeno como indicadores de daño.

Ratones Balb/C de tres semanas de edad recién destetados recibieron dieta control o suplementada con biotina durante ocho semanas. Posteriormente, se obtuvieron cortes de músculo femoral para teñir con tricrómica de Masson y se extrajo el RNA para el análisis de PCR.

El análisis de morfología no mostró diferencias significativas en el área de la miofibra y del tejido intersticial entre el grupo control y suplementado. Sin embargo, contrario a lo que se esperaba, al cuantificar el contenido de colágeno en los cortes de músculo, el grupo suplementado presentó un menor porcentaje de colágeno con respecto al control. De igual manera, al evaluar la expresión del gen *Col1a1*, el grupo suplementado mostró una disminución significativa en la expresión respecto al control.

En conclusión, la suplementación con biotina en la dieta durante ocho semanas no produce modificaciones en el área de la fibra muscular ni en el área del espacio intersticial. No obstante, sí produce una disminución significativa tanto en el contenido de colágeno como en la expresión del gen *Col1a1*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biotina

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B, también conocida como vitamina H, B7 o coenzima R (National Center for Biotechnology Information. Database PubChem). Actúa como grupo prostético de carboxilasas que participan en el metabolismo intermediario de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos, por lo cual es esencial para el metabolismo (Mock, 2017; Parra, et al., 2013). Margaret Boas demostró por primera vez su requerimiento en mamíferos (Boas, 1927).

1.1.1. Estructura

La molécula de biotina está formada por un anillo imidazolidico y otro tetrahidrotiofeno, con un residuo de ácido valérico como cadena lateral. Puede existir en 8 estereoisómeros, no obstante, el isómero D-biotina es el único biológicamente activo (Said, 2012).

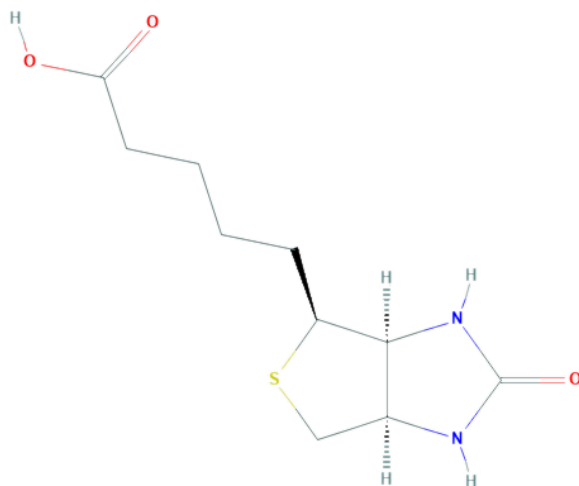


Figura 1. Estructura química de la biotina.

1.1.2. Funciones

En mamíferos, la biotina actúa como cofactor de cinco carboxilasas; acetil-CoA Carboxilasa (ACC), tanto de la isoforma citosólica (ACC1) como de la mitocondrial (ACC2); piruvato carboxilasa (PC); propionil-CoA carboxilasa (PCC); y metilcrotonil-

CoA carboxilasa (MCC). Éstas se sintetizan como apocarboxilasas que carecen de actividad enzimática. Cuando la biotina se une covalentemente al grupo amino de un específico residuo de lisina en el sitio activo de la apocarboxilasa, pasan a su forma activa denominada holocarboxilasa. Este proceso, dependiente de ATP, se conoce como biotinilación y es catalizado por la holocarboxilasa sintetasa (Zempleni, et al. 2009; Said, 2012).

Las carboxilasas dependientes de biotina catalizan diferentes vías asociadas a la biosíntesis de ácidos grasos, gluconeogénesis, ciclo de los ácidos tricarbónicos, anaplerosis y regulación pleiotrópica de genes (Zempleni, et al. 2008). La **ACC1** reside en el citoplasma de la célula y se expresa principalmente en tejidos lipogénicos (hígado, adiposo, glándula mamaria, etc.), cataliza la unión de bicarbonato a acetil-CoA, generando malonil-CoA, necesario para la síntesis de ácidos grasos. Por otra parte, ACC2, PCC, MCC y PC se localizan en la matriz mitocondrial: **ACC2** se expresa principalmente en corazón y músculo esquelético, donde el malonil-CoA sirve como un potente inhibidor de la carnitina palmitoiltransferasa I, regulando la oxidación de ácidos grasos (Brownsey, 2006); **PCC**, además de catalizar pasos esenciales en el metabolismo de aminoácidos, colesterol y ácidos grasos, cataliza la carboxilación de propionil-CoA para producir metilmalonil-CoA, que, además de participar en la beta-oxidación de ácidos grasos de cadena impar, se puede convertir en succinil-CoA, un intermediario en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Wongkittichote, et al. 2017); **MCC** cataliza la reacción de carboxilación de 3-metilcrotonil-CoA para formar 3-metilglutaconil-CoA, un intermediario en el metabolismo de la leucina, aminoácido importante para incrementar la síntesis de proteínas a través de la activación de la vía de señalización mTOR en el músculo esquelético, adiposo y células placentarias (Duan, et al. 2016); **PC** es la enzima responsable de catalizar la reacción de piruvato a oxalacetato, el cual sirve como primer sustrato de reacción para la gluconeogénesis. También cumple un papel importante en la anaplerosis del ciclo de los ácidos tricarbónicos, adicionalmente de manera tejida específica participa en la lipogénesis y en la liberación de insulina inducida por glucosa (Jitrapakdee, et al. 2008).

Además de su función como cofactor, se ha demostrado que la biotina en concentraciones farmacológicas regula la expresión génica. Se han identificado más de 2000 genes cuya expresión es modificada por la biotina (Zempleni, et al., 2009). Estimula el nivel de expresión proteica del receptor de insulina, la glucocinasa (una

enzima clave en la glucólisis) y la del transportador-2 de tiamina, mientras que suprime el nivel de expresión del mensajero de la fosfoenolpiruvato carboxinasa hepática (una enzima clave en gluconeogénesis). Por otra parte, la expresión de los genes que participan en su acción: la holocarboxilasa sintetasa y de las carboxilasas dependientes de biotina se ven afectadas por la biotina (Said, 2012).

El mecanismo a través del cual la biotina modifica la expresión génica no se encuentra totalmente descrito. Sin embargo, se han propuesto diferentes vías, no necesariamente excluyentes, que involucran la activación de la guanilato ciclasa soluble (por biotinil-AMP), translocación de NF- κ B y biotinilación de histonas (Cobs, 2012; Zempleni, et al. 2009).

1.1.3. Requerimientos

Debido a que los mamíferos no pueden sintetizar la biotina, es necesario obtenerla a través de la dieta diaria. La ingesta recomendada de biotina en humanos es de 30 μ g/d para adultos y de 35 μ g/d para niños y mujeres en lactancia (Food and Nutrition Board, National Academy Press, Institute of Medicine, Washington, DC. 1998; Zempleni & Kuroishi, 2012; Said, 2012).

La biotina se encuentra ampliamente en los alimentos, sus principales fuentes incluyen el hígado y riñones, la yema de huevo, la levadura, algunas verduras y la leche de vaca; en menor medida la encontramos en la carne magra, cereales y frutas. La biodisponibilidad de la biotina en la dieta varía de un alimento a otro; es cercano al 100% en el caso del maíz, y tan bajo como el 5% en el caso del trigo (National Center for Biotechnology Information, 2019; Said, 2012). La mayoría de los alimentos contienen la vitamina como biotina libre y como biocitina, es decir, biotina covalentemente unida a residuos de lisina.

1.1.4. Digestión y absorción

La homeostasis de biotina es crucial para mantener las funciones corporales normales. Esta homeostasis se logra mediante diferentes procesos muy bien coordinados de absorción intestinal, transporte celular y mecanismos de reciclaje eficientes que minimizan la excreción urinaria (Zempleni, et al. 2008).

Gran parte de la biotina que obtenemos a través de la dieta se encuentra ligada a residuos de lisina en diferentes proteínas. Proteasas y peptidasas gastrointestinales digieren estas proteínas para liberar biocitina y otros péptidos que contienen biotina (Zempleni, et al 2009). La biotinidasa es una de las enzimas claves que permiten separar la biotina de la biocitina y de otros péptidos biotinilados. Su actividad se puede encontrar en fluidos pancreáticos y otras secreciones intestinales, así como en las microvellosidades de la membrana epitelial de diferentes tejidos. De igual manera, la biotinidasa es secretada en el torrente sanguíneo y participa en el transporte de biotina hacia tejidos periféricos (Zempleni, et al. 2008).

La biotina libre se absorbe en el intestino delgado proximal por un mecanismo de transporte facilitado ubicado en las microvellosidades de la membrana epitelial de los enterocitos (Cobs, 2012). El transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT) es responsable de la absorción intestinal, renal y del transporte a través de las membranas celulares en hígado y otros tejidos periféricos. No obstante, a altas concentraciones la biotina también se absorbe mediante difusión pasiva (Zempleni, et al. 2009).

1.1.5. Efectos de la suplementación con biotina

Se ha encontrado que concentraciones farmacológicas de biotina modifican la expresión de genes críticos en la homeostasis de la glucosa. Algunos genes como la glucocinasa hepática, la insulina y el receptor de insulina aumentan su expresión en respuesta a la suplementación con esta vitamina, mientras que otros genes de proteínas de acción gluconeogénica, como PEPCK y glucosa-6-fosfatasa, disminuyen su expresión en modelos diabéticos (Dakshinamurti & Li, 1994; Sugita, et al. 2008; Lazo, et al. 2017).

En ratones se ha visto que la administración de una dieta durante 8 semanas suplementada con biotina (97.7 mg de biotina por Kg de dieta) disminuye las concentraciones de triglicéridos en suero (Larrieta, et al. 2010). Este efecto hipotrigliceridémico se asocia a un decremento en la abundancia de mRNA de enzimas lipogénicas y factores de transcripción como SREBP1c. De igual manera, la abundancia de mRNA de proteínas asociadas a este factor de transcripción, como el transportador de glucosa GLUT2, acetil-CoA carboxilasa 2, ácido graso sintasa y

piruvato cinasa, también decrece en respuesta a la suplementación con biotina (Larrieta, et al. 2010).

En el mismo modelo experimental, también se ha encontrado que produce modificaciones importantes en la morfología de los tejidos: en el páncreas se ha visto que aumenta el tamaño de los islotes pancreáticos y modifica la distribución de células alfa; aumentando el número de éstas en el centro del islote, en vez de localizarse en la periferia (Lazo, et al. 2013). Por otra parte, en el hígado se han encontrado cambios morfológicos que refieren un aumento en el número de células binucleadas y el porcentaje de nucleomegalia, así como un aumento en los sinusoides del tejido hepático; esto sin modificar los marcadores de toxicidad (Riverón, et al. 2016). Más recientemente se han observado cambios en el testículo, donde además de afectar la motilidad de los espermatozoides, a nivel de los túbulos seminíferos destaca la desorganización celular, pérdida de la redondez y alteraciones en el epitelio germinal (Pastén, et al. 2019).

A pesar de ser un tejido de vital importancia en la regulación de diferentes vías metabólicas, los trabajos que evalúan el efecto de la suplementación con biotina sobre el músculo esquelético, son muy escasos. Parra y colaboradores (2013) analizaron el efecto de dietas con diferente contenido de biotina sobre la actividad de las carboxilasas, donde a pesar de ver un aumento en las concentraciones de proteína total, no hubo un aumento en la actividad de dichas enzimas. Por otra parte, otro estudio demostró que la suplementación con biotina ayuda a prevenir el desarrollo de la resistencia a insulina en el músculo esquelético de ratas OLETF, utilizadas como modelo de diabetes tipo 2 (Sasaki, et al. 2012).

1.1.6. Toxicidad de la biotina

Algunos estudios han demostrado que la biotina no es tóxica ni mutágena (SRI-International, 1979; Hayes, et al. 1984). No obstante, en ensayos de micronúcleos en plantas se encontró un efecto mutagénico con una dosis mínima efectiva de 0.024 mg/ml (Ma, et al. 1984).

La LD₅₀ oral e intravenosa para ratones están reportadas en 10 y 1 g/kg de peso, respectivamente (Bonjour, 1991). Mientras que, en humanos, no se han encontrado

efectos adversos en tratamientos con dosis de hasta 300 mg/día por un periodo de hasta 9 meses, administrado por vía oral (Fiume, et al. 2001; Sedel, et al. 2015).

Sin embargo, hallazgos recientes de que la suplementación con biotina en ratones provoca cambios histológicos en diferentes tejidos (Riverón, et al. 2016; Tixi, et al. 2018) así como en la motilidad de los espermatozoides (Pasten, et al. 2019), esencial para la fertilización, genera alertas por posibles efectos tóxicos sobre la función reproductiva.

1.2. Músculo esquelético

El sistema muscular comprende unos de los tejidos más dinámicos de todo el cuerpo. Los tres tipos de músculo son el esquelético, cardíaco y liso. En humanos, el músculo esquelético comprende aproximadamente el 40% del peso corporal total, contiene el 50-75% de las proteínas corporales y representa el 30-50% del recambio de proteínas de todo el cuerpo (Frontera & Ochala, 2015).

De igual manera, el músculo esquelético es parte integral del funcionamiento orgánico, participa en el movimiento físico, la postura y las acciones vitales como masticar, tragar y respirar. Sirve como regulador de la diafonía entre órganos, la cual es crítica para el control del metabolismo en todo el cuerpo. Es un sitio clave para la captación y almacenamiento de glucosa, así como también un reservorio de aminoácidos que pueden apoyar la síntesis de proteínas o la producción de energía en otras partes del cuerpo cuando se agotan otras fuentes (Stump, et al. 2009).

1.2.1. Estructura

Por lo general los músculos se encuentran fijados al hueso en cada extremo mediante tendones compuestos de tejido conjuntivo denso. Cada músculo está rodeado por una capa de tejido conectivo conocida como epimisio, compuesto principalmente de colágeno tipo I y en menor medida, colágeno tipo III. El epimisio se extiende y cubre todo el músculo y el tejido que de él deriva, lo subdivide en columnas o fascículos. Así, cada uno de estos fascículos se encuentra rodeado por su propia capa de tejido conectivo, menos denso que el epimisio, llamada perimisio, compuesta principalmente de colágeno tipo I y III (Nayak, et al. 2016; Mahdy, 2019).

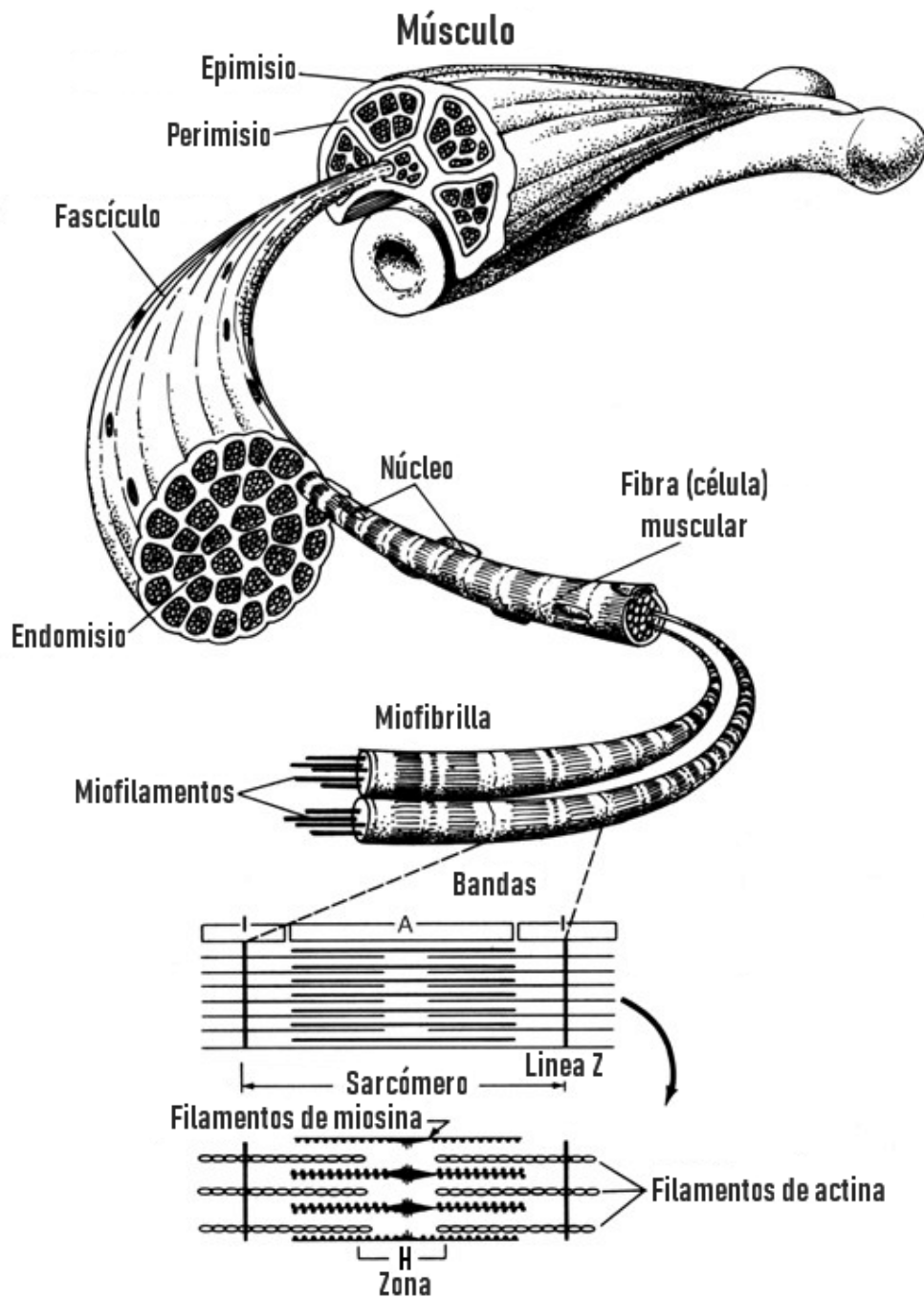


Figura 2. Organización del músculo esquelético. Modificado de Felici & Sbriccoli (2006)

Los fascículos, a su vez, están compuestos por muchas fibras musculares, o miofibras. Estas miofibras están rodeadas por una membrana plasmática o sarcolema, envuelta por una delgada capa de tejido conectivo laxo llamada endomisio, compuesta principalmente de colágeno tipo III y V (Gillies & Lieber, 2011). Dado que tanto el tejido conectivo de los tendones, el epimisio, el perimisio y el endomisio son continuos, se forma una matriz extracelular muy estable, incluso durante la contracción (Mahdy, 2019).

A diferencia de otras células del cuerpo, las fibras musculares son multinucleadas, lo cual se debe a su estructura sincicial; cada fibra se forma por la unión de varias células musculares embrionarias o mioblastos. A su vez, cada fibra muscular, está rodeada por una membrana celular o sarcolema, y contiene en el sarcoplasma (citoplasma) muchas subunidades conocidas como miofibrillas. Cada miofibrilla contiene estructuras aún más pequeñas llamadas miofilamentos (Fox, 2011; Frontera & Ochala, 2015). Los principales miofilamentos que forman los elementos contráctiles de la fibra muscular son la actina y miosina. Éstas se disponen en un patrón estriado formando la banda A y la banda I, que a su vez, conforman las unidades contráctiles llamadas sarcómeros, delimitados por las líneas o discos Z orientados transversalmente (Dave & Varacallo, 2018). Cabe mencionar que las fibras musculares se mantienen en un estado postmitótico, en caso de una lesión o muerte celular son las células satélites, ubicadas entre el sarcolema y la lámina basal, las que proliferan, se incorporan y diferencian en nuevas fibras musculares (Frontera & Ochala, 2015; Alberts, et al. 2002).

Actualmente existen múltiples criterios para clasificar las fibras musculares, tales como: (1) Color de la fibra (rojo o blanca), que se correlaciona con el contenido de mioglobina; (2) Propiedades contráctiles de las unidades motoras en respuesta a estimulación eléctrica; (3) Velocidad de compresión durante una contracción (rápida o lenta); (4) Grado de fatiga durante una contracción sostenida (fatigable o resistente a fatiga); (5) Predominancia de vías metabólicas (oxidativa o glucolítica); (6) Regulación de calcio por el retículo sarcoplásmico; y (7) Expresión diferencial de proteínas, entre otros (Lamboley, et al. 2014; Galpin, et al. 2012). La velocidad de contracción se correlaciona con el grado de desarrollo del retículo sarcoplásmico, mientras que la tolerancia a la fatiga y la capacidad oxidativa se correlacionan con el contenido mitocondrial (Frontera & Ochala, 2015). La clasificación más frecuentemente usada en músculo esquelético divide a las fibras musculares en tres tipos: Tipo I (lentas, oxidativas, resistente a fatiga), Tipo IIA (rápidas, oxidativas, propiedades metabólicas intermedias) y Tipo IIx (más rápidas, glucolíticas, fatigables) (Nayak, et al. 2016).

1.2.2. Función

El músculo esquelético cumple múltiples funciones. Desde una perspectiva metabólica contribuye al metabolismo basal, ayuda a generar calor para mantener la temperatura

corporal y sirve como fuente de almacenamiento de diferentes aminoácidos que pueden ser usados por diferentes órganos para sintetizar proteínas específicas. De igual manera, los aminoácidos liberados por el músculo, contribuyen a mantener los niveles de glucosa en condiciones de inanición; donde los aminoácidos sanguíneos sirven no solo como precursores para la síntesis de proteínas sino también como precursores de la gluconeogénesis hepática (Wolfe, 2006; Frontera & Ochala, 2015).

No obstante, la principal función del músculo esquelético toma lugar mediante un proceso acoplado de excitación-contracción, donde la energía química se convierte en energía mecánica para generar fuerza, dar soporte estructural, mantener la postura y generar movimientos específicos (Dave & Varacallo, 2018).

En la excitación-contracción del músculo se encuentran acoplados dos procesos: la transmisión del estímulo nervioso en forma de potenciales de acción a través del sistema tubular transversal o túbulos T, luego de la liberación de calcio desde las cisternas del retículo sarcoplásmico; y el deslizamiento entre los filamentos de actina y miosina por la acción de puentes que se extienden desde la miosina hasta la actina (Fox, 2011). Brevemente, el potencial de acción que llega a la membrana de la fibra muscular se conduce al interior de la célula muscular a través del sistema tubular transversal (túbulos T), que de igual manera se encuentra próximo a las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico que almacenan calcio. Un receptor de dihidropiridina sensible a voltaje en el túbulo T se abre y permite una corriente de calcio hacia el interior (Rebbeck, et al. 2014). Esta corriente de calcio desencadena la apertura de los receptores de rianodina en las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico y libera grandes cantidades de calcio en el sarcoplasma. El calcio liberado en el sarcoplasma se une a la proteína reguladora troponina C en el filamento de actina. Esto inicia una serie de eventos moleculares que desplazan a la tropomiosina que se encontraba bloqueando el sitio activo del filamento de actina. La exposición de este sitio activo permite la unión de la miosina con la actina. La orientación de estos puentes de miosina permite tirar de los filamentos delgados de actina desde cada lado hacia el centro (zona H) acortando la distancia entre discos Z. La ATPasa localizada en la cabeza de la miosina facilita la separación de los puentes formados durante la contracción (Frontera & Ochala, 2015; Nayak, et al. 2016).

1.2.3. Daño

Cuando ocurre una lesión en el músculo esquelético, como resultado de traumatismo, enfermedades congénitas, distrofias y/o miopatías musculares, toma lugar una serie de eventos altamente coordinados con el fin de reparar el tejido dañado (Mahdy, 2019).

Inmediatamente luego de la lesión, se liberan factores de crecimiento y citocinas desde los vasos sanguíneos afectados y las células inflamatorias infiltradas. Pronto las citocinas promueven la migración y proliferación de diferentes tipos celulares en el área afectada, mientras que las células inflamatorias como los macrófagos y neutrófilos, son responsables de fagocitar los restos celulares (Serrano & Muñoz, 2010).

Los macrófagos tienen un papel determinante regulando la reparación a través de la secreción de citocinas. Se presentan en poblaciones heterogéneas que exhiben un efecto opuesto. Se pueden dividir en macrófagos proinflamatorios y antiinflamatorios o macrófagos M1 y M2, respectivamente. Los macrófagos M1 los encontramos en etapas tempranas de daño, mientras que los M2 se presentarán en etapas avanzadas cuando el daño es prolongado (Kharraz, et al. 2013; Mann, et al. 2011).

De manera paralela, la reparación del tejido muscular requiere la migración y proliferación de fibroblastos. Éstos, en respuesta a citocinas profibroticas como TGF- β 1, producen un incremento en los componentes de la matriz extracelular (CME), los cuales serán degradados conforme avance la regeneración y creación de nuevas fibras (Mahdy, 2019; Mann, et al. 2011).

La formación de nuevas fibras musculares comienza con la activación de células satélite quiescentes que se ubican entre el sarcolema y la lámina basal. La activación de estas células precede a su proliferación y diferenciación en mioblastos en el área afectada. Finalmente los mioblastos se fusionan, ya sea unos con otros o con las miofibras dañadas, para formar nuevas fibras (Kasper, et al. 2002; Serrano & Muñoz, 2010).

La matriz extracelular (ECM) que rodea al músculo tiene un papel fundamental manteniendo la estructura del músculo y las condiciones necesarias para llevar a cabo la contracción. Cuando ocurre una lesión en el tejido muscular, la fibrina y fibronectina

se unen con colágeno tipo I, tipo II y proteoglucanos liberados por los fibroblastos, con el fin de formar una nueva y temporal matriz extracelular. Esta matriz temporal proporciona un ambiente adecuado para la diferenciación de mioblastos y actúa como medio para la regeneración de miofibras (Chen & Li, 2009; Mahdy, 2019).

Conforme avanza la reparación del tejido se requiere tanto la degradación de los componentes de la matriz extracelular, como factores que negativamente regulen esta degradación proteolítica. Estas moléculas asociadas se conocen como metaloproteasas (MMP) e Inhibidores de metaloproteasas (TIMP). La cantidad neta de colágeno está regulada por su síntesis y catabolismo, que en principio está regulado por el balance entre MMP y TIMP (Wang & Tang, 2016; Chen & Li, 2009).

La perturbación de cualquiera de estos pasos resulta en una mala reparación, caracterizada por degeneración persistente de la miofibra, inflamación y fibrosis, que se debe en esencia a una mala acumulación de componentes de la matriz extracelular, principalmente colágeno (Mahdy, 2019). Ésta anormal acumulación de componentes se da principalmente en el endomisio y perimisio del músculo esquelético (Wang & Tang, 2016).

1.2.4. Colágeno

El colágeno es una de las proteínas estructurales más abundante en todos los animales. En humanos, comprende un tercio de las proteínas totales, además de ser el principal componente de la matriz extracelular y el tejido conectivo. Se han identificado veintiocho tipos diferentes de colágeno compuestos de al menos 46 cadenas polipeptídicas distintas en vertebrados. No obstante, el 80-90% por ciento del colágeno en mamíferos corresponde a los tipos I, II y III (Lodish, et al. 2000).

Las cadenas de colágeno se sintetizan como precursores más largos llamados procolágeno, las cuales se transportan cotraduccionalmente hacia el lumen del retículo endoplásmico rugoso (RER) del fibroblasto. Al igual que con otras proteínas secretadas, la glucosilación del procolágeno ocurre en el RER y el aparato de Golgi; Residuos de galactosa y glucosa se agregan a los residuos de hidroxilisina, así como oligosacáridos largos se añaden a ciertos residuos de asparagina en el propéptido C-terminal (Hulmes, 2002). Los residuos específicos de prolina y lisina en medio de las cadenas se hidroxilan mediante hidroxilasas unidas a la membrana. Finalmente, los

enlaces disulfuro intracadena entre las secuencias de propéptidos N y C-terminales alinean las tres cadenas antes de que se forme la triple hélice. Las porciones centrales de las cadenas se cierran desde el extremo C al extremo N para formar una triple hélice (Gelse, et al. 2003).

La matriz extracelular del músculo esquelético es un complejo entramado de diferentes tipos de colágeno, glucoproteínas, proteoglicanos y elastina; siendo el colágeno tipo I el que encontramos en mayor proporción. Éste representa aproximadamente el 7-8 % de la masa corporal del músculo esquelético (Bendall, 1967; Listrat, et al. 2016; McKee, et al. 2019). Su estructura está formada por una triple hélice compuesta por tres subunidades; dos cadenas polipeptídicas $\alpha 1$ y una tercera cadena $\alpha 2$. Cada cadena contiene 1050 aminoácidos enrollados entre sí y son codificadas por los genes *Col1a1* y *Col1a2*, respectivamente (Fratzi, 2008).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evidencia de que la biotina tiene efectos favorables sobre el metabolismo de la glucosa, la secreción de insulina y el metabolismo de lípidos, tanto en pacientes como en modelos diabéticos (Koutsikos, et al 1996; Zhang, et al. 1996; Revilla, et al. 2006), ha llevado a desarrollar productos con alto contenido de biotina, comercializados para la prevención y el tratamiento de la diabetes (Singer & Geohas, 2006). Estos productos suelen tener un rango de 40 a 166 veces más que la dosis de biotina recomendada (Food and Nutrition Board, National Academy Press, Institute of Medicine, Washington, DC. 1998).

Estudios sobre la toxicidad de la biotina (SRI-International, 1979; Hayes, et al. 1984; Fiume, et al. 2001; Sedel, et al. 2015) han considerado que esta vitamina no presenta toxicidad, sin embargo, la evidencia de que concentraciones farmacológicas de biotina modifican la estructura de los tejidos despierta inquietud sobre las repercusiones fisiológicas de los cambios estructurales.

Existen pocos estudios acerca del efecto de la biotina sobre el músculo esquelético. Estudios no publicados (Tesis de Licenciatura de Sofía Enciso Pinto, México 2020; Tesis Doctoral de Esmeralda Enriquez Calderon, en proceso) realizados en el laboratorio, mostraron indicios de daño en cortes de músculo femoral teñidos con hematoxilina y eosina. A diferencia del grupo control, el grupo suplementado con

biotina mostró mayor desorganización celular, modificaciones en la posición del núcleo dentro de la miofibra y alteraciones en la ultraestructura del músculo, por lo que resulta necesario ahondar en los potenciales efectos que pueda tener la biotina sobre dicho tejido.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar los efectos *in vivo* de la suplementación con biotina en la dieta sobre algunos parámetros morfológicos del tejido muscular, así como en el contenido y expresión de colágeno en el músculo como indicativo de daño.

3. HIPÓTESIS

Si una dieta suplementada con biotina modifica la ubicación de los núcleos dentro de las miofibras y altera la ultraestructura del músculo, es posible que modifique el área y distribución de las fibras musculares y produzca degeneración del tejido aumentando la cantidad de colágeno y el área del tejido intersticial.

4. OBJETIVO

Evaluar algunos parámetros morfológicos de la fibra y el contenido de colágeno en músculo femoral de ratón después de recibir dieta suplementada con biotina durante 8 semanas.

4.1. Objetivos Particulares

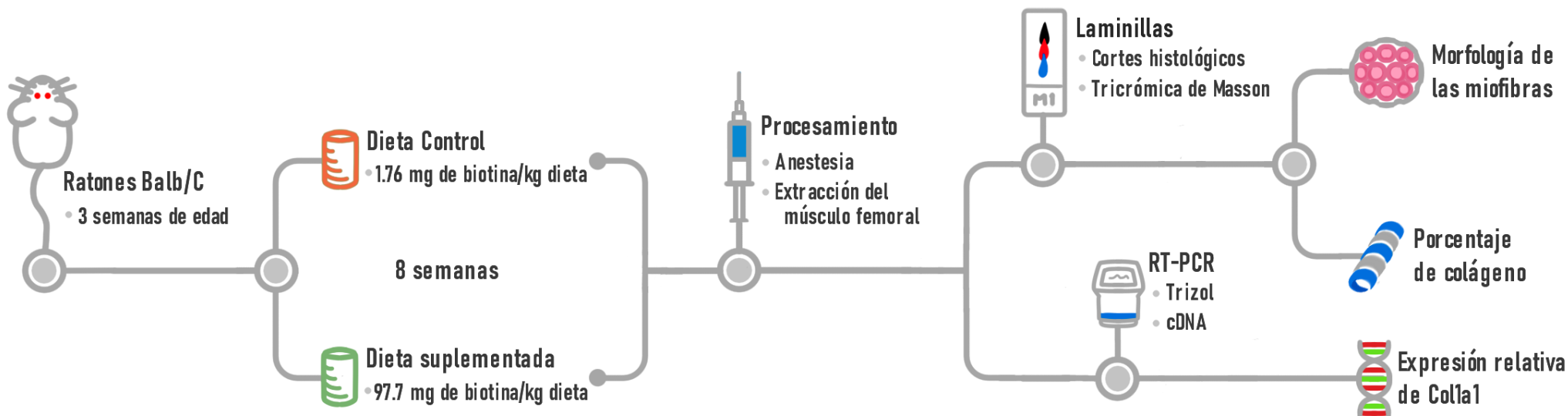
Determinar los cambios que produce una dieta suplementada con biotina durante ocho semanas sobre algunos parámetros morfológicos de las fibras musculares evaluando:

- Área transversal de la fibra muscular
- Área del tejido intersticial

Determinar el efecto de la suplementación con biotina sobre el contenido de colágeno en el músculo, evaluando:

- Porcentaje de colágeno en cortes de músculo
- Expresión relativa de *Col1a*

5. DISEÑO EXPERIMENTAL



6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. Modelo animal

Ratones de la cepa BALBc/AnN de tres semanas de nacidos recién destetados se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM bajo ciclos de luz-oscuridad de 12 h, con libre acceso a agua y alimento durante todo el periodo experimental. Los ratones recibieron una dieta control o suplementada por ocho semanas. El grupo control recibió una dieta con 1.76 mg de biotina/kg de alimento (TD-01363, Envigo, Indianapolis. IN, EUA) que proporciona la suficiente cantidad de biotina para cubrir las necesidades metabólicas de los ratones; el grupo suplementado recibió una dieta 97.7 mg de biotina/kg de alimento (TD-01363, Envigo, Indianapolis. IN, EUA). Esta proporción de la vitamina es comparable a la que aportan los suplementos vitamínicos disponibles para su libre consumo. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética y Experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Posterior a las ocho semanas de alimentación, los ratones se hicieron ayunar por 12 h, se anestesiaron con Sevoflurane (Sevorane, Abbot) y se les extrajo el músculo femoral.

6.2. Morfología de las fibras

Los ratones se anestesiaron con Sevoflurane para ser sometidos a un proceso de perfusión con solución salina y posteriormente formaldehído al 4% para fijar los tejidos. La perfusión se realizó con una máquina de bombeo y punción cardíaca con una micro-cánula en el ventrículo izquierdo del corazón. Posterior a esto, el músculo femoral fijado se deshidrató en una serie de concentraciones crecientes de etanol, se transparentó con xilol y se incluyó en parafina en *cassettes* de histología para obtener cortes transversales de 3 μm de la porción media del músculo y colocarlos en laminillas previamente tratadas con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, EUA).

Los cortes de músculo se desparafinaron con xilol y rehidrataron con una serie decreciente de etanol hasta llegar a agua destilada para finalmente teñir los cortes con tricrómica de Masson. En dicha tinción la hematoxilina férrica de Weigert tiñe los núcleos de negro (o púrpura muy oscuro); la solución de escarlata de Biebrich Fucsina ácida tiñe el citoplasma y las fibras musculares de un rojo/rosa brillante, al igual que

el colágeno; sin embargo, luego de un tratamiento con ácido fosfomolibdico se elimina esta mezcla colorante del colágeno, para que finalmente el azul de anilina tiña el tipo I y IV de azul y se diferencie del músculo. Las preparaciones se analizaron utilizando un Microscopio Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio, con el cual se obtuvieron imágenes panorámicas de todo el corte.

El análisis morfométrico se realizó con una preparación de cada ratón, en un total de 6 ratones por grupo, tomando en cuenta todas las fibras musculares del corte (alrededor de 600 fibras por cada preparación). Se cuantificó el área del corte, área de la miofibra y área del espacio intersticial, utilizando el software ImageJ 1.52n.

6.3. Proporción de colágeno

A partir de las mismas fotos panorámicas de los cortes teñidos con tricrómica de Masson, se cuantificó el porcentaje de colágeno utilizando el software ImageJ 1.52n con el complemento *Color Deconvolution*. Este complemento separa la imagen panorámica obtenida, producto de mezcla sustractiva del color, en canales separados correspondientes a 3 colores determinados (rojo, verde y azul), lo cual permite analizarlos por separado. De acuerdo con la tinción utilizada (tricrómica de Masson), el azul corresponde a la porción de colágeno en el corte.

6.4. Expresión relativa de *Col1a1*

El RNA total se extrajo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen). La cantidad y pureza del RNA se determinó por espectrofotometría y se verificó la integridad del RNA con geles de agarosa al 1%. A partir del RNA total extraído se obtuvo el DNA complementario con el cual se evaluó la expresión relativa de mRNA del gen de interés mediante un ensayo de PCR en tiempo real. Las muestras se analizaron por triplicado en un termociclador de tiempo real StepOnePlus, la expresión relativa del gen de interés se analizó por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando el gen *Hprt-1* como control interno y los resultados se normalizaron con respecto a la expresión en el grupo control (Livak & Schmittgen, 2001).

6.5. Análisis estadístico

Los datos que aquí se presentan corresponden a la media \pm error estándar (SE). El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 6. Los datos se evaluaron por medio de una prueba t de Student. Se consideran estadísticamente significativos valores de p menores a 0.05.

7. RESULTADOS

7.1. Efecto de la suplementación con biotina sobre algunos parámetros morfológicos de las miofibras

Como se señaló en un principio, en diversos estudios en el laboratorio hemos encontrado que la suplementación con biotina en la dieta tiene la capacidad de modificar la morfología de tejidos como páncreas, hígado, tejido adiposo y testículo. De acuerdo con esto, estudios previos encontraron desorganización celular en cortes de músculo femoral. Cuando el músculo presenta algún tipo de daño, podemos esperar cambios en la morfología de las miofibras, por lo cual se midió el área de las fibras musculares. No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y suplementado tanto en el área del corte, como en el área de la miofibra (Figura 3 y 4).

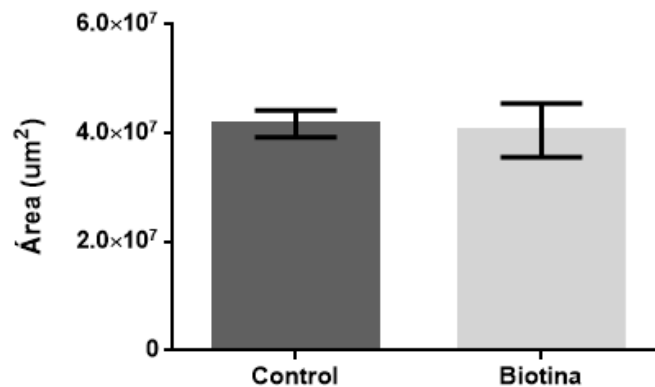


Figura 3. Área total del corte de músculo femoral. Los datos representan la media \pm ES. n = 6 ratones por grupo experimental. P>0.05

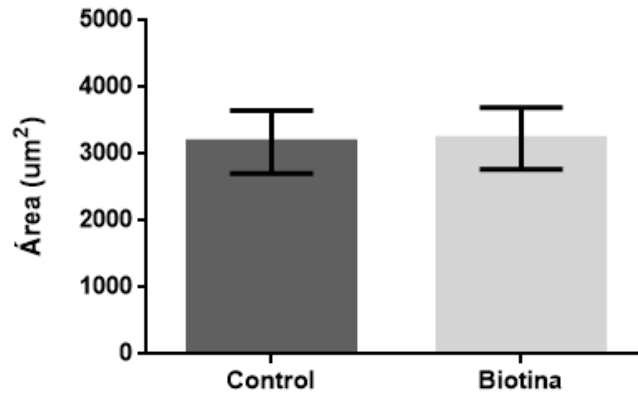


Figura 4. Área de la fibra. Los datos representan la media \pm ES. n = 6 ratones por grupo experimental. $P > 0.05$

También se midió el espacio intersticial con el fin de tener un parámetro que provea una medida cuantitativa del reemplazo de músculo por tejido conectivo que puede estar teniendo lugar como resultado de alguna lesión en el tejido. No obstante no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y suplementado (Figura 5).

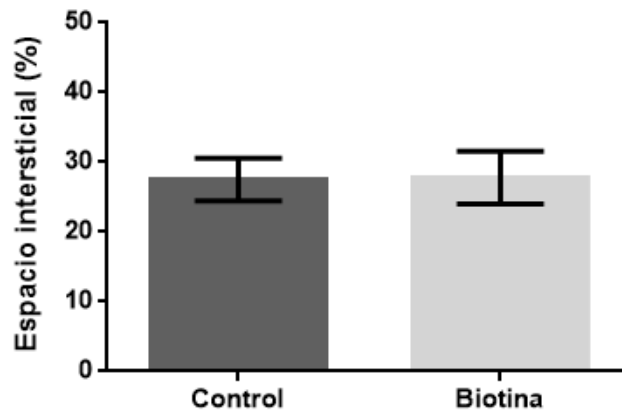


Figura 5. Porcentaje de espacio intersticial entre las fibras del músculo. Los datos representan la media \pm ES. n = 6 ratones por grupo experimental. $P > 0.05$

7.2. Efecto de la suplementación con biotina sobre el porcentaje de colágeno

Dado que el contenido de colágeno es un parámetro usado como marcador de daño en el músculo, se cuantificó su proporción en los cortes teñidos con tricrómica de Masson. Sin embargo, como se muestra en la figura 6 el grupo suplementado (4.25 ± 0.2 %) presentó un menor porcentaje de colágeno con respecto al control (8.01 ± 0.37 %), contrario a lo que se esperaba ($P < 0.0001$).

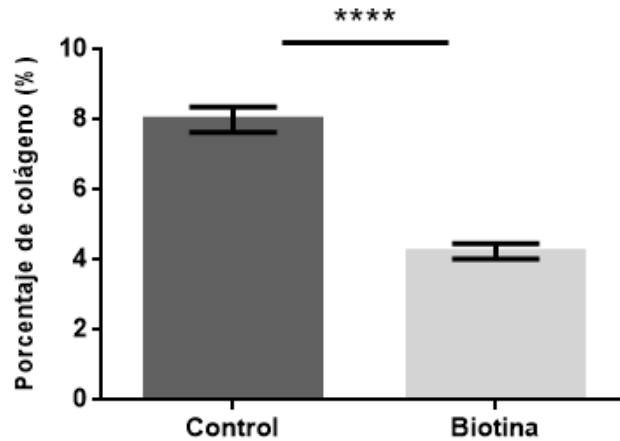


Figura 6. Porcentaje de colágeno en el músculo. La suplementación con biotina disminuye la cantidad de colágeno. Los datos representan la media \pm ES. n = 6 ratones por grupo experimental. $P < 0.0001$

7.3. Efecto de la suplementación con biotina sobre la expresión de *Col1a1*

Se ha propuesto que muchos de los efectos que ejerce la biotina a nivel sistémico, se debe a su capacidad para modificar la expresión de genes. De acuerdo a la diferencia observada en el porcentaje de colágeno entre el grupo control y suplementado en los cortes teñidos con tricrómica de Masson, profundizamos los estudios investigando el efecto de la biotina sobre el colágeno, evaluando la expresión del gen *Col1a1*, el cual codifica para las cadenas polipeptídicas $\alpha 1$ que componen el colágeno tipo I.

La suplementación con biotina produjo una disminución significativa ($P < 0.05$) en la expresión relativa de *Col1a1* (Figura 7).

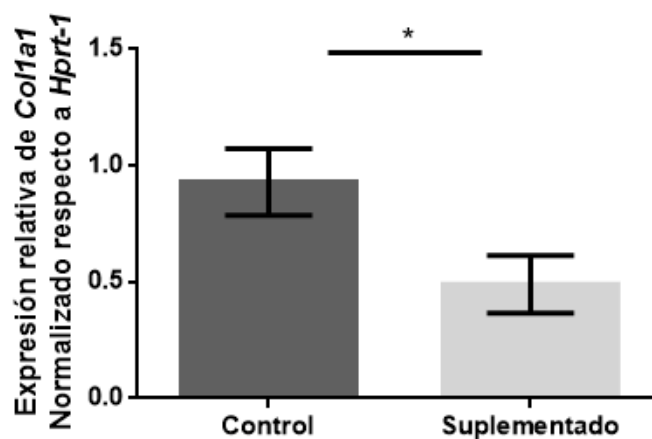


Figura 7. Expresión relativa de *Col1a1*. La suplementación con biotina disminuye la expresión del gen *Col1a1* que codifica para colágeno tipo I. Los datos representan la media \pm ES. n = 6 ratones por grupo experimental. $P < 0.05$

8. DISCUSIÓN

En estudios anteriores se observó que la suplementación con biotina puede modificar la ubicación de los núcleos dentro de la fibra y producir alteraciones en la ultraestructura del músculo esquelético (Tesis de Licenciatura de Sofía Enciso Pinto; Tesis Doctoral de Esmeralda Enríquez Calderón, en proceso). Cuando el tejido muscular sufre algún tipo de lesión y/o degeneración, ocurre una serie de eventos coordinados con el fin de reparar el tejido dañado. Entre éstos, está la migración y proliferación de fibroblastos que producen un aumento en los componentes de la matriz extracelular, principalmente colágeno, los cuales serán degradados conforme vaya avanzando la reparación y crecimiento de nuevas fibras (Serrano & Muñoz, 2010). La perturbación de cualquiera de estos pasos resulta en una mala reparación, caracterizada por degeneración persistente de la miofibra, inflamación y fibrosis, que se debe en esencia a una mala acumulación de componentes de la matriz extracelular. Como resultado se puede esperar un incremento en el contenido de colágeno acompañado por un aumento en el área del espacio intersticial, así como un cambio en el área y densidad de las fibras musculares (Serrano & Muñoz, 2010; Cluff, et al. 2013; Mahdy, 2019).

No se encontraron cambios en la morfología de las fibras que permitan afirmar que existe algún daño y/o lesión en el músculo. Tanto el área de la fibra como el área del espacio intersticial se mantienen constantes entre el grupo control y suplementado, lo cual sugiere que no están aumentando los componentes de la matriz extracelular ni existe algún reemplazo de masa muscular por tejido conectivo en respuesta a la suplementación con biotina. Cabe mencionar que los cambios morfológicos resultado de la suplementación con biotina en otros tejidos, como hígado o testículo, tampoco han estado acompañados por cambios en marcadores de daño (Riverón, et al. 2016; Pastén, et al. 2019).

El colágeno normalmente debe ocupar alrededor del 7-8 % de la masa muscular (Bendall, 1967; Listrat, et al. 2016; McKee, et al. 2019). En concordancia, el colágeno en el grupo control se encuentra cercano a estos valores. No obstante, encontramos que el grupo suplementado presentó un menor porcentaje de colágeno. A pesar de que esto último no apoya la hipótesis inicial proponiendo un aumento, demuestra que el colágeno del músculo en el grupo suplementado se encuentra por debajo del

contenido considerado normal. En consonancia con estos efectos, en el grupo suplementado se observó una disminución en la expresión del gen *Col1a1*, el cual codifica para las cadenas polipeptídicas $\alpha 1$ que componen el colágeno tipo I, principal componente de la ECM; lo cual, en conjunto, indica que el mecanismo molecular del cambio observado en el porcentaje de colágeno en el corte se debe a un efecto de la biotina a nivel transcripcional.

Existe una amplia literatura que describe diversas patologías asociadas a alteraciones en la síntesis del colágeno (Glorieux, 2005; Malfait, et al. 2010; van Dijk, et al. 2011). La osteogénesis imperfecta es una de los desórdenes más comunes que comprende un amplio espectro de enfermedades, causadas por mutaciones en los genes *Col1a1/2* (van Dijk, et al. 2011). Estas mutaciones se reflejan en una disminución en la producción de la cadena pro-colágeno $\alpha 1$, lo cual eventualmente resulta en una disminución en la síntesis de colágeno tipo I; un efecto similar al que vimos en este trabajo como resultado de la suplementación con biotina. La deficiencia de colágeno en patologías de este tipo conlleva a un característico ablandamiento y/o debilitamiento de diversos tejidos, los cuales son propensos a sufrir lesiones (Veilleux, et al. 2017). Sin embargo, es importante señalar que no se observaron cambios motrices en los ratones que recibieron la dieta suplementada con biotina. Sería interesante, por lo tanto, efectuar estudios dirigidos a evaluar parámetros fisiológicos de tono muscular en respuesta a las concentraciones farmacológicas de biotina.

El Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) es una citocina que promueve la síntesis de colágeno a través de los fibroblastos y regula directamente la expresión del gen *Col1a1* (Hillege, et al. 2020). La sobreexpresión de este factor en músculo esquelético se asocia con una anormal acumulación de colágeno y el desarrollo de fibrosis (Mahdy, 2019), mientras que estudios con ratones *knockout* han demostrado que su inactividad resulta en una menor expresión de colágeno tipo I (Tsubone, et al. 2006). De igual manera se ha reportado que TGF- β tiene características estructurales, como el alto contenido de lisina, que la vuelven susceptible a biotinilación (Newman, et al. 1989). La biotina podría estar interactuando directamente sobre esta citocina o bien a través de una regulación a la baja sobre los receptores de TGF- β , explicando así el bajo contenido de colágeno.

Por otra parte, se sabe que concentraciones farmacológicas de biotina afectan la expresión de diversos factores transcripcionales (Sugita, et al. 2008; Zempleni, et al. 2009; Cobs, 2012; Sahin, et al. 2013). RUNX2 es un factor de transcripción que, en condiciones normales, forma un complejo con el supresor tumoral RB1 y se une a elementos de respuesta en el promotor del gen *Col1a1*, favoreciendo su transcripción. Estudios de ratones transgénicos con deficiencia de RUNX2, muestran una marcada disminución en la expresión de colágeno tipo I (Kern, et al. 2001). Si la biotina se encuentra afectando factores de transcripción como RUNX2, disminuyendo su expresión, podrían verse afectados otros genes importantes en la migración celular (Li, et al. 2016), la maduración de los condrocitos (Takeda, et al. 2001), y la diferenciación de osteoblastos (Ducy, et al. 1999), cuya expresión se encuentra regulada por este mismo factor RUNX2.

Otra posible explicación sería que la biotina se encontrara afectando genes y/o proteínas de la familia DLX, las cuales regulan la transcripción del gen *Col1a1*. Por ejemplo, el gen *MSX2*, que codifica para la proteína MSX2, además de regular el crecimiento, la división celular (proliferación), la maduración, diferenciación y supervivencia celular, se ha visto que reprime la expresión de *Col1a1* (Dodig, et al. 1996).

9. CONCLUSIONES

La suplementación con biotina en la dieta durante ocho semanas:

1. No produce modificaciones en el área de la fibra muscular ni aumenta el área del espacio intersticial.
2. Disminuye el contenido del colágeno tipo I en el músculo femoral de ratón. De igual manera, disminuye la expresión del gen *Col1a1* que codifica para las cadenas polipeptídicas $\alpha 1$, las cuales conforman el colágeno tipo I; principal componente de la matriz extracelular.
3. La disminución observada en el contenido de colágeno tipo I en el músculo esquelético está relacionada con un efecto molecular de la biotina a nivel transcripcional.

10. PERSPECTIVAS

Efectuar estudios dirigidos a evaluar parámetros fisiológicos de tono muscular en respuesta a las concentraciones farmacológicas de biotina.

Realizar estudios para conocer el efecto de la suplementación con biotina sobre factores como TGF- β que regulan la síntesis de colágeno en el músculo esquelético.

11. REFERENCIAS

1. Alberts, B., Johnson, A. & Lewis, J. *Molecular Biology of the Cell* (4th Eds.). New York: Garland Science; 2002. *An Overview of the Cell Cycle*.
2. Bendall, J. (1967), The elastin content of various muscles of beef animals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18: 553-558.
3. Berria, R., Wang, L., Richardson, D. K., Finlayson, J., Belfort, R., Pratipanawatr, T., De Filippis, E. A., Kashyap, S., & Mandarino, L. J. (2006). Increased collagen content in insulin-resistant skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 290(3), E560–E565.
4. Boas, M. (1927). The effect of desiccation upon the nutritive properties of egg-white. *Biochemical Journal*. 21, 712-724.
5. Bonjour, J. (1991). Biotin. In *Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker. 393–427.
6. Brownsey, R., Boone, A., Elliott, J., Kulpa, J. & Lee, W. (2006). Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions*. 34 (2) 223-227.
7. Chen, X., & Li, Y. (2009). Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell adhesion & migration*, 3(4), 337–341.
8. Cluff, K. et al. (2013). Morphometric analysis of gastrocnemius muscle biopsies from patients with peripheral arterial disease: objective grading of muscle degeneration. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 305(3), R291–R299.
9. Cobs, G. (2012). Chapter 14. Biotin in *The Vitamins* (4th Eds.). (pp. 325-338). Academic Press.
10. Dakshinamurti, K. & Li, W. (1994). Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 132, 127-23.

11. Dave, H. & Varacallo, M. (2018). Anatomy, Skeletal Muscle. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537236/>
12. Dodig, M., Kronenberg, M., Bedalov, A., Kream, B., Gronowicz, G., Clark, S. H., Mack, K., Liu, Y., Maxon, R., Pan, Z., Upholt, W., Rowe, D. & Lichtler, A. (1996). Identification of a TAAT-containing motif required for high level expression of the COL1A1 promoter in differentiated osteoblasts of transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 271(27), 16422-16429.
13. Duan, Y., Li, F., Li, Y., Tang, Y., Kong, X., Feng, Z., Anthony, T., Watford, M., Hou, Y., Wu, G. & Yin, Y. (2016). The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism in Amino Acids. *The Forum for Amino Acid, Peptide and Protein Research*. Springer Vienna. 48: 41.
14. Ducky, P., Starbuck, M., Priemel, M., Shen, J., Pinero, G., Geoffroy, V., Amling, M. & Karsenty, G. (1999). A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes & development*, 13(8), 1025-1036.
15. Felici, F. & Sbriccoli, P. (2006). Muscle, Skeletal. *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*.
16. Fiume, M. Z., & Cosmetic Ingredient Review Expert Panel (2001). Final report on the safety assessment of biotin. *International Journal of Toxicology*, 20 Suppl 4, 1–12.
17. Fox, S. *Fisiología humana* (12a. Eds.). (2011). McGraw Hill México. Cap, 12, 355-399.
18. Fratzl, P. (2008) *Collagen : structure and mechanics*. Springer.
19. Frontera, W., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international*, 96 (3): 183-195.
20. Galpin, A., Raue, U., Jemiolo, B., Trappe, T., Harber, M., Minchev, K. & Trappe, S. (2012). Human skeletal muscle fiber type specific protein content. *Analytical biochemistry*, 425(2), 175–182.

21. Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55(12), 1531–1546.
22. Gillies, A., & Lieber, R. (2011). Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle & nerve*, 44(3), 318–331.
23. Glorieux, F. (2005). Caffey disease: an unlikely collagenopathy. *The Journal of clinical investigation*, 115(5), 1142–1144.
24. Hayes, S., Gordon, A., Sadowski, I., & Hayes, C. (1984). RK bacterial test for independently measuring chemical toxicity and mutagenicity: short-term forward selection assay. *Mutation research*, 130(2), 97–106.
25. Hillege, M., Galli Caro, R. A., Offringa, C., de Wit, G., Jaspers, R. T., & Hoogaars, W. (2020). TGF- β Regulates Collagen Type I Expression in Myoblasts and Myotubes via Transient Ctgf and Fgf-2 Expression. *Cells*, 9(2), 375.
26. Hulmes D. (2002). Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *Journal of structural biology*, 137(1-2), 2–10.
27. Jitrapakdee, S., St Maurice, M., Rayment, I., Cleland, W., Wallace, J. & Attwood, P. (2008). Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *The Biochemical Journal*, 413(3), 369–387.
28. Kasper, C., Talbot, L., & Gaines, J. (2002). Skeletal muscle damage and recovery. *AACN clinical issues*, 13(2), 237–247.
29. Kern, B., Shen, J., Starbuck, M., & Karsenty, G. (2001). Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7101-7107.
30. Koutsikos, D., Fourtounas, C., Kapetanaki, A., Agroyannis, B., Tzanatos, H., Rammos, G., Kopelias, I., Bosiolis, B., Bovoleti, O., Darema, M. & Sallum, G. (1996). Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Renal Failure*. 18 (1): 137-7.
31. Lamboley, C., Murphy, R., McKenna, M., & Lamb, G. (2014). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and leak properties, and SERCA isoform expression,

in type I and type II fibres of human skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 592(6), 1381–1395.

32. Larrieta, E., Velasco, F., Vital, P., López, T., Lazo, M., Rojas, A. & Fernández, C. (2010). Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *European Journal of Pharmacology*. 644 (1-3): 263-8.
33. Lazo, M., Larrieta, E., German, M., Baez, A. & Fernández, C. (2013). Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion, *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 24 (1), 169-177.
34. Li, X., Lu, J., Tan, C., Wang, Q., & Feng, Y. (2016). RUNX2 promotes breast cancer bone metastasis by increasing integrin $\alpha 5$ -mediated colonization. *Cancer letters*, 380 (1), 78-86.
35. Listrat, A., Lebret, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., Lefaucheur, L., Picard, B., & Bugeon, J. (2016). How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. *TheScientificWorldJournal*, 2016, 3182746.
36. Lodish, H., Berk, A. & Zipursky, S. (2000). Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix in *Molecular Cell Biology* (4th Eds.). New York: W. H. Freeman.
37. Ma, T., Harris, M., Anderson, V., Ahmed, I., Mohammad, K., Bare, J. L., & Lin, G. (1984). Tradescantia-Micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. *Mutation research*, 138 (2-3), 157–167.
38. Mahdy, M. (2019). Skeletal muscle fibrosis: an overview. *Cell and Tissue Research*. 375, 575-588.
39. Malfait, F., Wenstrup, R. J., & De Paepe, A. (2010). Clinical and genetic aspects of Ehlers-Danlos syndrome, classic type. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 12(10), 597–605.

40. Mann, C., Perdiguero, E., Kharraz, Y., Aguilar, S., Pessina, P., Serrano, A., & Muñoz-Cánoves, P. (2011). Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal muscle*, 1(1), 21.
41. McKee, T., Perlman, G., Morris, M., & Komarova, S. (2019). Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, 9(1), 10542.
42. Mock, D. M. (2017). Biotin: from nutrition to therapeutics. *The Journal of Nutrition*. 147(8), 1487-1492.
43. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Biotin, CID=171548, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Biotin> (accessed on Aug. 12, 2019).
44. Nayak, N., Khedkar, G., Khedkar, C. & Khedkar, C. (2016). Skeletal Muscle in *Encyclopedia of Foods & Health*. (pp. 795-801). Elsevier Publishers, London, UK.
45. Newman, W., Beall, L. D., Bertolini, D. R., & Cone, J. L. (1989). Modulation of TGF-beta type 1 receptor: flow cytometric detection with biotinylated TGF-beta. *Journal of cellular physiology*, 141(1), 170–180.
46. Parra, M., Gutiérrez, G., Hofmann, P., Fuentes, A., Meléndez, E., Gómez, M. & Báez, A. (2013). Differential effect of biotin on carboxylase activity and mice skeletal muscle metabolism. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 4, 43-50.
47. Pastén, K., Riverón, L., Sicilia, G., Canul, G., Salazar, T., Tapia, M., Hernández, E., Roa, A., Cedillo, C. & Fernandez, C. (2019). Dietary Biotin Supplementation Impairs Testis Morphology and Sperm Quality. *Journal of Medicinal Food*. 23(5):535-544.
48. Rebbeck R., Karunasekara Y., Board P., Beard N., Casarotto M. & Dulhunty A. (2014) Skeletal muscle excitation–contraction coupling: who are the dancing partners? *Int J Biochem Cell Biol*. 48:28–38.

49. Revilla, C., Zendejas, I., Islas, S., Báez, A., Palomino, M., Hernández P. & Fernández, C. (2006). Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 60(4):182-5.
50. Riverón, L., Sicilia, G., Álvarez, C., Coballase, E., Alcántar, J., & Fernández, C. (2016). Dietary Biotin Supplementation Modifies Hepatic Morphology without Changes in Liver Toxicity Markers. *BioMed research international*, 7276463.
51. Said, H. (2012). Biotin: Biochemical, Physiological and Clinical Aspects in Water Soluble Vitamins. *Clinical Research and Future Application*. (pp. 1-19) Springer London U.K.
52. Sahin, K., Tuzcu, M., Orhan, C., Sahin, N., Kucuk, O., Ozercan, I., & Komorowski, J. (2013). Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *British Journal of Nutrition*, 110 (2): 197-205.
53. Sasaki Y, Sone H, Kamiyama S, Shimizu M, Shirakawa H, Kagawa Y, Komai M, Furukawa Y. (2012) Administration of biotin prevents the development of insulin resistance in the skeletal muscles of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Food Funct*. 3(4):414-9.
54. Serrano, A. & Muñoz, P. (2010). Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. *Experimental Cell Research*. 316, 3050-3058.
55. SRI-International. (1979) Microbial mutagenesis testing of substances compound report:F76-041, D-Biotin. NTIS Report No. PB89-169072.
56. Stump, C., Henriksen, E., Wie, Y, & Sowers, J. (2009). The metabolic syndrome: Role of skeletal muscle metabolism. *Annals of Medicine*, 38:6, 389-402.
57. Sugita, Y., Shirakawa, H., Sugimoto, R., Furukawa, Y., & Komai, M. (2008). Effect of biotin treatment on hepatic gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72 (5): 1290-8.

58. Takeda, S., Bonnamy, J. P., Owen, M. J., Ducy, P., & Karsenty, G. (2004). Continuous expression of Cbfa1 in non hypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. In *The Skeleton* (pp. 55-75). Humana Press, Totowa, NJ.
59. Tsubone, T., Moran, S. L., Subramaniam, M., Amadio, P. C., Spelsberg, T. C., & An, K. N. (2006). Effect of TGF-beta inducible early gene deficiency on flexor tendon healing. *Journal of Orthopaedic Research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 24(3), 569–575.
60. van Dijk, F. S., Cobben, J. M., Kariminejad, A., Maugeri, A., Nikkels, P. G., van Rijn, R. R., & Pals, G. (2011). Osteogenesis Imperfecta: A Review with Clinical Examples. *Molecular Syndromology*, 2(1), 1–20.
61. Veilleux, L. N., Trejo, P., & Rauch, F. (2017). Muscle abnormalities in osteogenesis imperfecta. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 17(2), 1–7.
62. Wang, Z. & Tang, Z. (2016). Composition and function of extracellular matrix in development of skeletal muscle. In: Travascio F (ed) *Composition and function of the extracellular matrix in the human body*. (pp 25–43). InTech, Rijeka.
63. Wolfe R. (2006). The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 84(3): 475-82.
64. Wongkittichote, P., Ah Mew, N. & Chapman, K. (2017). Propionyl-CoA carboxylase, A review. *Molecular genetics and metabolism*. 122(4), 145–152.
65. Zempleni, J., Hassan, Y. & Wijeratne, S. (2008). Biotin and biotinidase deficiency. *Expert review of endocrinology & metabolism*. 3(6), 715–724.
66. Zempleni, J., & Kuroishi, T. (2012). Biotin. *Advances in Nutrition*, 3(2), 213-214.
67. Zempleni, J., Wijeratne, S., & Hassan, Y. (2009). Biotin. *BioFactors*. 35(1), 36–46.

68. Zhang, H., Osada, K., Maebashi, M., Ito, M., Komai, M. & Furukawa, Y. (1996). A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal Nutritional Science and Vitaminology*. 42 (6): 517-26.

12. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ATP	Trifosfato de adenosina
ECM	Matriz extracelular
GLUT2	Transportador de glucosa 2
MCC	Metilcrotonil-Coa carboxilasa
MMP	Metaloproteasas
MSX2	msh homebox 2
NF-κB	Factor nuclear kappa B
OLETF	Otsuka Long Evans Tokushima Fatty
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa
PC	Piruvato-CoA carboxilasa
PCC	Propionil-CoA carboxilasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RUNX2	Factor de transcripción asociado a runt-2
SE	Error estándar
SMVT	Transportador múltiple de vitaminas dependientes de sodio
SREBP1c	Proteína 1c de unión al elemento regulador de colesterol
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TIMP	Inhibidores de metaloproteasas

13. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la biotina

Figura 2. Organización del músculo esquelético

Figura 3. Área total del corte de músculo femoral

Figura 4. Área de la fibra

Figura 5. Porcentaje de espacio intersticial entre las fibras del músculo

Figura 6. Porcentaje de colágeno en el músculo

Figura 7. Expresión relativa de *Col1a1*