



## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

### Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BIOTINA EN LA ORGANIZACIÓN  
CELULAR DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
BIOL. SOFIA ENCISO PINTO.

TUTOR PRINCIPAL

[Cristina Fernández Mejía.](#)

[Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de  
México.](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

[Lorena Aguilar Arnal.](#)

[Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de  
México.](#)

[Alicia Ortega Aguilar.](#)

[Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.](#)

Ciudad de México. Marzo, 2023.



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.

**Intenta, lucha, logra.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el apoyo esencial de la Doctora Cristina Fernández Mejía en la realización de este proyecto de Maestría. Gracias por el apoyo prestado durante la duración de este proyecto, a nivel personal y profesional durante una época tan difícil como la que vivimos en los últimos años. A la Licenciada en Nutrición Esmeralda Enríquez Calderón por el apoyo y la guía durante la construcción de este proyecto. Gracias también a mis compañeros de laboratorio: Dra. Karina Pasten Hidalgo; Dra. Leticia Riverón Negrete, M en C. Alain de Jesús Hernández Vázquez, Paulina Moreno, Mitzi Aguilar por el apoyo en la parte técnica del proyecto de Maestría, así como a todo el personal del Laboratorio número tres de la Unidad de Genética de la Nutrición y el resto de los laboratorios que pertenecen a ella por todo el soporte para el trabajo realizado.

Agradezco el apoyo a este trabajo de maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT con la beca otorgada durante los cuatro semestre de duración, CVU número 1005448. Así mismo, agradezco las prestaciones otorgadas Instituto Nacional de Pediatría y mi alma mater, la Universidad Nacional Autónoma de México para mi realización tanto personal como científica durante los últimos años de mi vida.

## DEDICATORIA

A mis padres, Samuel y Carmen, por ser las alas que siempre he necesitado para volar hasta lo más alto del cielo, por ser mi sostén en los momentos que creía caer y demostrarme que el único límite soy yo misma.

A mi hermanita, Andrea, gracias por darme el mejor papel que pude haber pedido en la vida, el de hermana mayor. Gracias por enseñarme a ver el lado más lindo de mi misma, por apoyarme en todo lo que me propongo, aunque no estés de acuerdo y por cada uno de los abrazos que siempre he necesitado. Gracias por tu presencia constante en cada uno de mis días, por nunca dejarme caer.

A mi abuela, Esther Sáenz Pérez. Que tu presencia imponente siga siendo una constante en mi vida, que tu sonrisa me acompañe en cada caminar y tu luz siga siendo un farolillo para encontrar mi destino. Gracias por seguir siendo mi ejemplo, por cada recuerdo que yo mantengo por ambas.

A mi nana Angélica Cruz Perez, gracias por ser una constante en mi vida, por todo el amor que nos has dado y cuidarnos como tus hijas desde el primer momento en que nos conociste.

A mis amigos: Adileily, Fernando, Fernanda, Ximena, Meshu, Aline, Victoria, Linett, Ilse, Daniela, Gabriela, Patricia, Nathalia, Lua, Juliana, Angie y Paula gracias por ser los mejores porristas, mi equipo en cada uno de los momentos difíciles; por ser siempre los que me alegran y me levantan cuando más lo necesito. Nunca podré pagarles lo que han hecho por mi.

A mi familia, todos y cada uno de ellos, por haber sido siempre el pilar fundamental de mis pasos; por la alegría en cada momento, por ser la mejor red de apoyo que alguien podría necesitar. La palabra más hermosa siempre se quedará corta con ustedes: gracias.

A Maximiliano por enseñarme que el mundo se puede ver con otros ojos, que la curiosidad nunca muere y que todo se soluciona con un abrazo.

A Mariana y Sara por su compañía en los momentos de soledad, en los experimentos y en cada uno de los espacios que necesite llenar con una voz amiga.

A mis compañeras del posgrado: Carolina, Elenka, Silvia, Perla y Andrea. Gracias por la compañía en cada uno de los momentos duros de la maestría, por el apoyo en cada tutorial y por las risas que compartimos en las madrugadas austeras. Son una parte muy importante de mi vida y mi formación científica.

A mis estrellas que iluminan el firmamento: Carmen, Enrique y Ernesto. Gracias por todo lo que sembraron en mí.

A Pollyanna por enseñarme a ver el lado bueno de la vida.

A mi tío Alberto Pinto Vera, que tu ímpetu por la vida siga vigente en cada uno de los que te conocimos y amamos, gracias por las enseñanzas.

A mi maestra Edalí Cruz Jimenez, que me acompañó durante toda la infancia y la vida adulta. Gracias por alegrarte de cada uno de los momentos buenos que viví; por no dudar nunca en decirme lo mucho que yo valía y lo inteligente que era. Sé que desde donde estés te seguiré haciendo sentir igual de orgullosa que cuando salí de sexto año.

A Zaira Cruz Ramos, mi amiga querida, juntas empezamos la maestría y aunque la vida detuvo tu camino, juntos lo terminaremos. Estás en mi corazón y cada uno de mis logros en la ciencia.

Que en paz descansen.

Crecer es ser los dueños de nuestros propios sueños.

## RESUMEN

La biotina, también conocida como vitamina B7 o H, es una vitamina hidrosoluble perteneciente al complejo B cuya ingesta diaria recomendada para adultos es de 30 µg. En concentraciones fisiológicas, la biotina actúa como grupo prostético de enzimas carboxilasas, las cuales juegan un papel importante en la síntesis y oxidación de los ácidos grasos, la gluconeogénesis y el metabolismo de aminoácidos. De manera independiente a su función clásica, se ha reportado que, en dosis en un rango de 30 a 650 veces sus requerimientos diarios, la biotina modifica la expresión de genes participantes en procesos biológicos como el metabolismo de triglicéridos y carbohidratos.

Estudios recientes del grupo de trabajo demuestran que una dieta suplementada con biotina 56 veces el contenido de la dieta control modifican la organización celular de diferentes tejidos, estos efectos se han observado en el islote pancreático, el hígado y en la línea celular adipocítica 3T3-L1 (Lazo de la Vega-Monroy et al., 2013; Moreno-Méndez et al., 2019). Adicionalmente, estudios de morfología en modelo de ratón de la cepa Balb/C muestran la modificación en la organización celular específica del músculo esquelético en respuesta a la suplementación con biotina, particularmente en la posición del núcleo de la fibra muscular y en el disco Z, por lo que resulta interesante estudiar los genes participantes en la manutención de la posición, estructura y forma del núcleo dentro de la fibra muscular así como la expresión de transcritos de proteínas componentes de la banda Z .

En este proyecto se propuso analizar, en el modelo experimental de ratón previamente mencionado, los efectos de la biotina sobre la expresión de genes participantes en el sistema de andamiaje que regulan la posición, estructura y forma del núcleo dentro de la fibra muscular, encontrando una desregulación de los genes relacionados a este sistema. Obteniendo que la suplementación con biotina por ocho semanas modifica algunos de los mensajeros más importantes para la organización jerárquica del músculo esquelético, lo cual puede ocasionar



las alteraciones morfológicas que fueron vistas en otros estudios del laboratorio del mismo tejido.

## INDICE

Introducción	_____	12
Sistema muscular	_____	12
Músculo esquelético	_____	12
Anatomía del músculo esquelético	_____	13
Núcleo celular de la fibra muscular	_____	16
Proteínas estructurales	_____	19
Regeneración de la fibra muscular	_____	26
Metabolismo del músculo esquelético	_____	28
Patologías del músculo esquelético	_____	30
Biotina	_____	31
Estructura química de la biotina	_____	31
Funciones y requerimientos de la biotina	_____	32
Metabolismo de la biotina	_____	33
Biotinilación de otras proteínas	_____	34
Autoensamblaje de la biotina	_____	35

Efectos de la biotina en dosis farmacológicas	36
Efectos de la biotina en dosis farmacológicas sobre la estructura tisular	37
Antecedentes directos del proyecto	38
Justificación	43
Hipótesis	44
Objetivo general	44
Objetivos específicos	44
Métodos	45
Modelo experimental	45
Abundancia de mensajeros de RT-PCR	46
Análisis estadístico	47
Resultados	48
La abundancia de mensajeros de los genes que codifican para las proteínas asociadas a desmina en el mecanismo de andamiaje.	48
La abundancia de mensajeros de los genes que codifican para las proteínas asociadas al disco-Z y a las costameras	51
La abundancia de mensajeros de las proteínas asociadas a núcleo.	57

Discusión	_____	65
Conclusiones	_____	71
Perspectivas	_____	72
Referencias	_____	73

## INTRODUCCIÓN

### B.1 SISTEMA MUSCULAR.

El conjunto de estructuras que incluyen los miocitos, neuronas y otros componentes de tejido nervioso; vasos sanguíneos, matriz extracelular y el tejido conectivo, unido en redes organizadas de forma jerárquica, en los animales, se denomina como sistema muscular (Frontera & Ochala, 2015). Este sistema provee al cuerpo la capacidad de locomoción; participa en la homeostasis de la glucosa y de los lípidos, así como en muchas otras funciones del organismo. Este tejido tiene capacidad de regeneración después de una lesión o un periodo de trabajo intenso; además de producir los movimientos involuntarios que llevan a cabo los procesos de respiración y oxigenación sanguínea.

El sistema muscular comprende tres tipos de tejido: músculo cardíaco, presente en el miocardio; músculo liso, el cual que se encuentra en órganos internos y músculo esquelético o estriado que da sostén al cuerpo, innervado totalmente por el sistema nervioso somático. En los seres humanos el músculo esquelético está compuesto de aproximadamente 600 músculos y representa entre 40 y 50% del peso corporal (Huard et al., 2002).

#### B.1.1 Músculo esquelético.

El músculo esquelético tiene un origen común en todos los vertebrados. En los mamíferos, el músculo esquelético está compuesto por fibras de alta variabilidad de fenotipos morfológicos, bioquímicos, mecánicos y metabólicos (Mathes et al, 2019). Las células musculares son peculiares al ser las más largas del cuerpo. En roedores, tienen un volumen promedio de 5 nanolitros (Gundersen, 2016). Estas células también tienen múltiples núcleos constituyendo así uno de los pocos sincicios en el cuerpo de los mamíferos. Este tejido contiene entre 50-75% de las proteínas totales del cuerpo y el balance entre la síntesis de proteínas y su

degradación determina la masa muscular (Hinkle et al, 2018). El procesamiento del RNA de las proteínas del músculo esquelético contribuye al desarrollo del tejido por lo que su disfunción puede llevar a distrofias musculares.

### B.1.2 Anatomía del músculo esquelético.

La fibra muscular se compone de células multinucleadas que se organizan en paquetes de tejido en forma jerárquica de mayor a menor tamaño, dando origen así a capas diferentes de tejido conectivo colagenoso, los cuales dividen y unen a las fibras musculares al mismo tiempo (Haun et al. 2019). La fibra muscular comienza a definirse con una capa delgada de tejido conectivo denominada epimisio que recubre todo el tejido. Bajo el epimisio se encuentran paquetes compuestos de entre 10 y 100 fibras musculares llamados fascículos y que a su vez están rodeados por otra capa de tejido conectivo llamada perimisio, cada fibra individual es, adicionalmente, dividida y separada por una capa del mismo tejido llamada endomisio (Figura 1). La membrana plasmática que rodea a cada fibra muscular se conoce como sarcolema; el fluido que queda encerrado dentro de la fibra y el sarcolema, el citoplasma, se denomina sarcoplasma. (Haun et al. 2019) En éste se encuentran también las mitocondrias o sarcosomas, el citoesqueleto y el núcleo celular que tiene la característica de ser alargado y aplanado, de alrededor de 10  $\mu\text{m}$  de largo (Figura 1). Otra parte esencial de la formación de este tejido son las triadas musculares, que están formadas por la juxtaposición del túbulo transversal (Túbulo T) con una cisterna terminal en el retículo sarcoplásmico (endoplásmico) en el otro lado (Torgan & Daniels, 2006).

El ensamblaje de la fibra muscular tiene un orden característico: los miofilamentos forman sarcómeros, la unidad contráctil básica del músculo esquelético (Frontera & Ochala 2015), los cuales están unidos mediante numerosos ensambles de citoesqueleto. Cada sarcómero está unido a otros a través del sarcolema; la membrana plásmática, que se encuentra rodeando la miofibra por otro ensamble citoesquelético llamado costámera, que une al sarcómero y el sarcolema a través estructuras denominadas como disco Z y banda M. La fuerza de la contracción

muscular ocurre cuando las cabezas proteicas de la miosina se unen a los filamentos de actina y el disco Z empuja a la banda M. Si esta armazón jerárquica se desorganiza ocasionará problemas en el funcionamiento del tejido. Una de las principales proteínas en el disco Z es la  $\alpha$ -actinina que sirve como punto de unión para los filamentos de actina, teniendo una organización antiparalela y de homodímeros dentro del disco (Frontera & Ochala, 2015). Además de la  $\alpha$ -actinina hay varias proteínas estructurales que se localizan en el disco Z como actina, titina, nebulina, oscurina y  $\gamma$ -filamina.

La banda o disco Z es una de las formaciones proteicas del músculo esquelético más importantes, pues se encarga de anclar al núcleo a su posición en la periferia celular además de ser un nodo de señalización en el sarcómero. Dos sarcómeros paralelos tienen sus discos Z alineados y están unidas por el filamento intermedio; desmina, mientras que las costámeras proveen la unión entre el disco Z periférico y el sarcolema (Blaauw et al. 2013). La posición de las proteínas del disco Z es óptima para detectar el cambio de carga aunado a numerosas proteínas de señalización, haciendo de él uno de los iniciadores cascadas de señalización para la plasticidad muscular (figura 1).

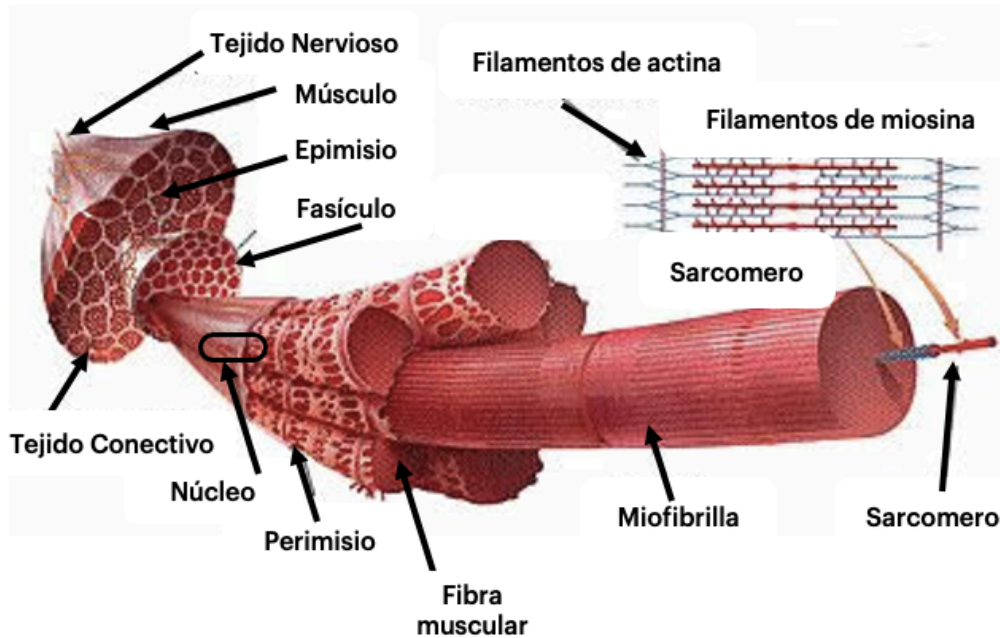


Figura 1. Estructura del músculo esquelético Modificado de: [https://www.researchgate.net/figure/Skeletal-muscle-structure-photo-created-by-C-Encyclopedia-Britannica-2015\\_fig3\\_313845971](https://www.researchgate.net/figure/Skeletal-muscle-structure-photo-created-by-C-Encyclopedia-Britannica-2015_fig3_313845971)

Las fibras musculares son heterogéneas y cada una tiene la capacidad de responder diferencialmente dependiendo a sus diversas capacidades fisiológicas, siendo las más prominentes el metabolismo y la respuesta contráctil. Con base en estos aspectos se pueden identificar tres tipos de fibras: Tipo I, son lentas y resistentes a la fatiga y un mecanismo aeróbico muy activo; Tipo IIA, las cuales son rápidas y fácilmente fatigables y un metabolismo predominantemente glucolítico; y las Tipo IIXB rápidas e intermediarias que combinan una alto índice metabólico con resistencia a la fatiga (Blaauw et al. 2013), como se muestra en la figura 2.



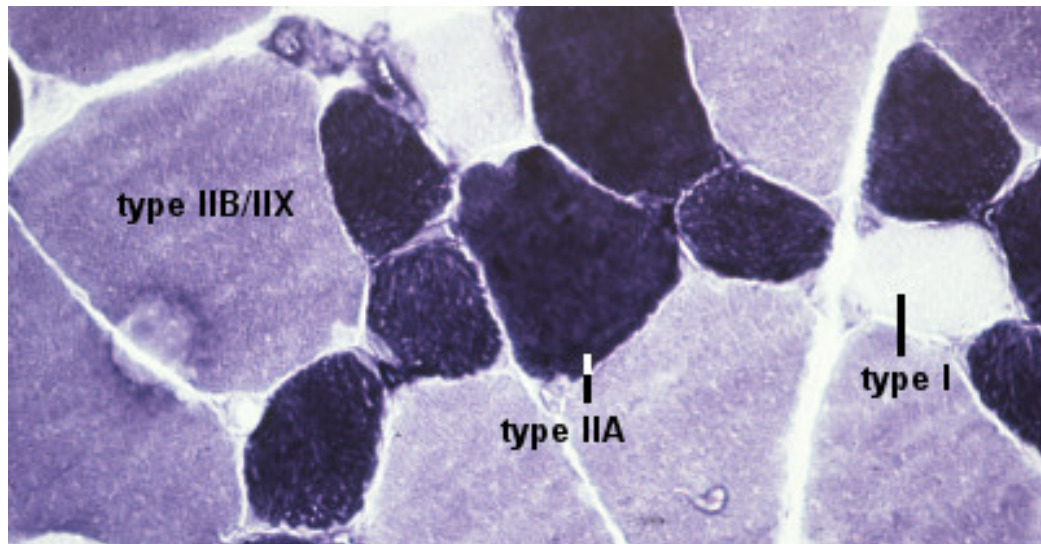


Figura 2. Tipos de fibras musculares teñidos en una misma miofibrila. Modificado de: [https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Muscle\\_fiber\\_types.jpg](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Muscle_fiber_types.jpg)

### B.1.3 Núcleo Celular de la Fibra Muscular.

La célula muscular es multinucleada debido a la fusión de células con un único núcleo en el proceso de la miogénesis. En la fibra muscular estriada, los núcleos celulares están ubicados a la periferia (Manhart et al. 2018). En su mayoría, cada núcleo de una fibra muscular controla los tipos de proteínas sintetizadas en esa región específica de la célula, conocida como dominios nucleares y tiene un tamaño altamente regulado, que puede variar de acuerdo a la ubicación y a la función del músculo (Frontera & Ochala, 2015). Se sabe que de no hallarse en esta posición deriva en patologías que afectan la función del tejido (Blaauw et al. 2013).

Dentro de una sección de 8  $\mu\text{m}$  de músculo esquelético, pueden acomodarse aproximadamente 1.7 núcleos maduros en ella, los cuales se distinguen al estar rodeados por un anillo de distrofina. El incremento del número de núcleos precede al crecimiento radial de la fibra, por lo que se puede decir que el número de

mionúcleos encontrados en una fibra es su número máximo posible y solo se agregarán nuevos a ella si aumenta de tamaño (Gundersen, 2016).

Se ha hipotetizado que la posición de los núcleos está organizada en función de minimizar la distancia del espacio de transporte de proteínas (Chapman et al. 2014) En cuanto a la organización de los núcleos celulares dentro del sincicio, se cree que cada núcleo coordina un cierto dominio (figura 3), se supone que el número de núcleos en una fibra muscular estará relacionado con el volumen del músculo (Gundersen, 2016). Los núcleos se componen de cuerpos nucleares y cromatina que se encuentra en su interior, rodeados por las envolturas nucleares. Una proteína importante para mantener una correcta posición y forma del núcleo en la fibra muscular es la lámina nuclear (Lamina A/C) la cual provee soporte estructural al núcleo, conectándolo con el citoesqueleto y haciéndola participe de la regulación transcripcional, la organización genómica y la reparación del daño al DNA (Earle et al, 2020) (Figura 4).

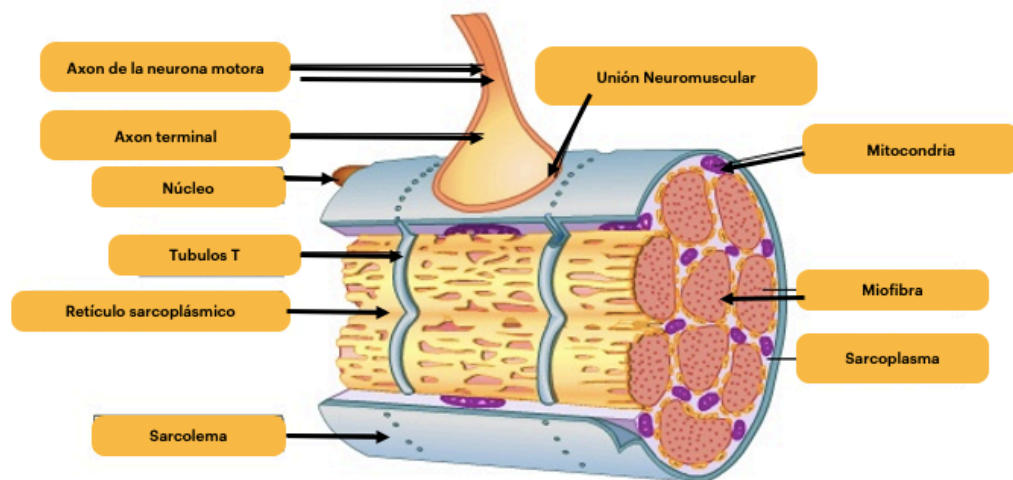


Figura 3. Coordinación del núcleo y la unión neuromuscular. Modificada de <http://biomhs.blogspot.com/2012/07/neuromuscular-junction-i.html>

La lámina nuclear contribuye a la estabilidad de esta envoltura, dando una plataforma a las proteínas participantes en el anclaje de la cromatina, la replicación del DNA y la transcripción genética (Hall et al, 2011). La envoltura nuclear divide y separa las funciones del citoplasma de las del núcleo. Se compone de la membrana nuclear externa; la membrana nuclear interna y el espacio perinuclear. La membrana nuclear interna une al nucleoplasma y se sostiene por las láminas, las cuales son filamentos intermedios asociados con la membrana nuclear a través de proteínas integrales (Puckelwartz et al., 2009).

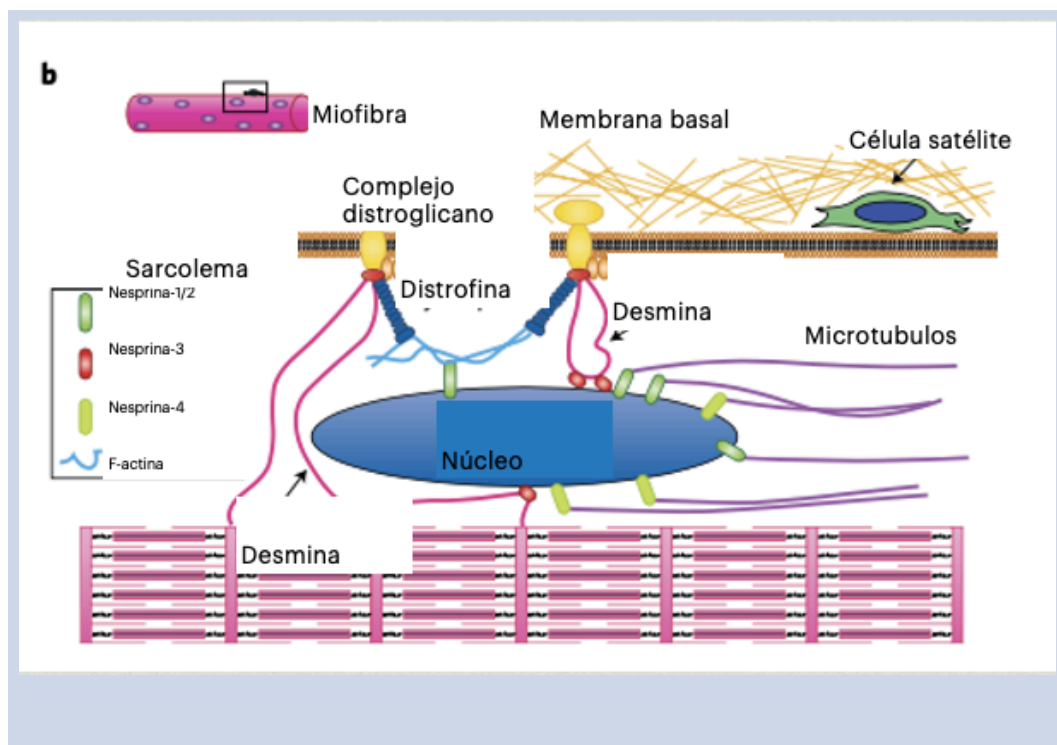


Figura 4. Proteínas que coordinan la posición del núcleo. Modificado de Kirby, T. J., & Lammerding, J. (2018). Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor. *Nature Cell Biology*, 20(4), 373–381. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0038-y>

La membrana nuclear externa es continua con el retículo endoplásmico, mientras que la membrana nuclear interna lo es con los poros nucleares. En la fibra muscular madura, los núcleos se encuentran generalmente espaciados y posicionados regularmente en la periferia justo debajo de la membrana plasmática. Sin embargo, se puede encontrar una aglomeración de núcleos reunidos debajo de la unión neuromuscular que expresan mRNA específicos y participan en la comunicación sináptica; mientras que otro se aglomeran junto a la unión tendomuscular (Cados et al, 2015).

Mediante el proceso de mecanotransducción nuclear, los núcleos actúan en conjunto en vías independientes durante los distintos eventos celulares; también funcionan como un mecanismo para distinguir entre las pequeñas fuerzas que afectan la superficie celular y aquellas fuerzas mayores que pueden deformar a gran escala la célula (Kirby & Lammerding, 2018). La transmisión de fuerza en el núcleo ocurre a través de la envoltura nuclear por medio del complejo de unión entre el nucleoesqueleto y el citoesqueleto, donde destacan las proteínas tipo KASH (nesprina-1 y nesprina-2).

#### B.1.4 Proteínas Estructurales.

El citoesqueleto es una red compleja de microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios que juegan un rol pivotal en detectar y transmitir los estímulos tanto químicos como mecánicos (Chatzifrangkesku et al. 2020). Este provee una organización estructural y funcional que influencia las propiedades mecánicas de la célula como la rigidez, la tracción y la adhesión celular (figura 5).

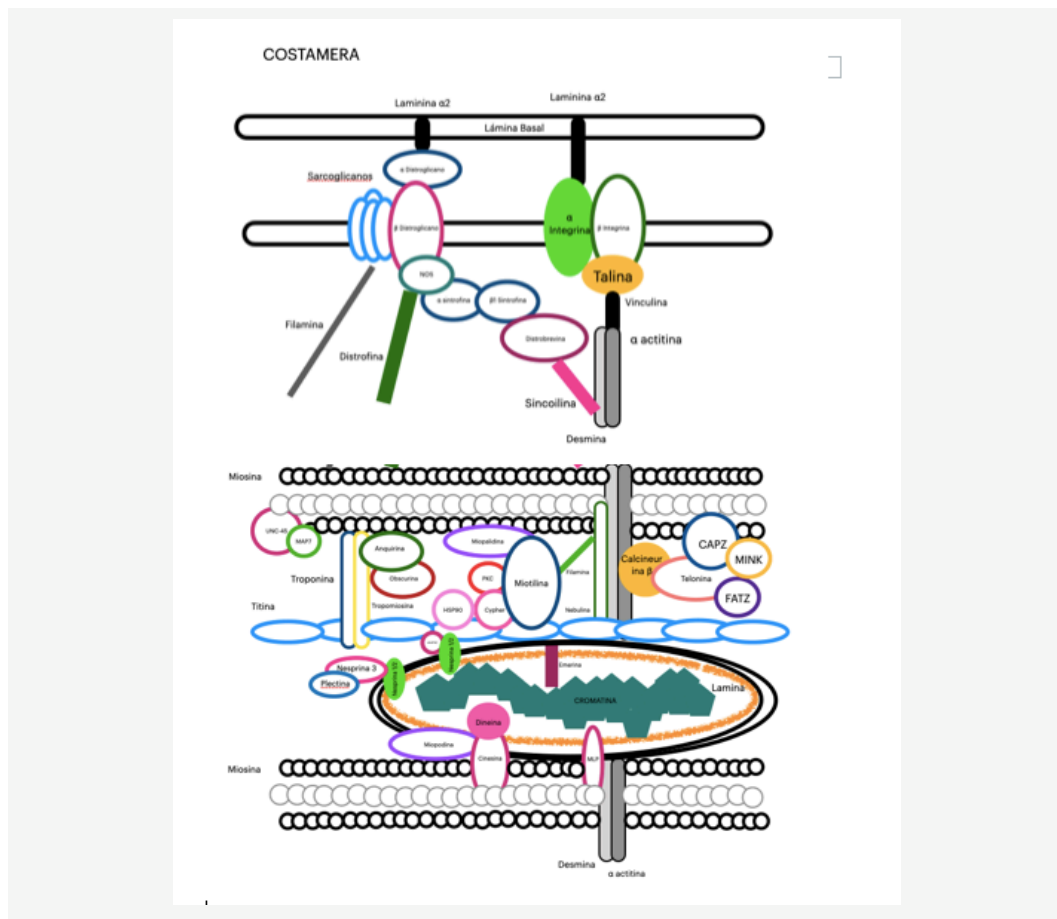


Figura 5. Proteínas estructurales que regulan la organización de la fibra muscular.

Las miofibrillas son una red de docenas de proteínas que generan la fuerza contráctil para modular e integrar la transmisión de energía mecánica en la célula del músculo esquelético. Las unidades contráctiles de la miofibrilla, los sarcómeros, se distinguen por la distribución estriada de sus proteínas, visibles en microscopía de luz en tres bandas mayores: A, I y Z. Las bandas A se componen por los filamentos gruesos de miosina y las proteínas que se unen a ella, además de su parte media denominada "línea M". La banda I es compuesta por los filamentos delgados que se unen a actina. En el medio de la banda I encontramos la banda Z llamada también línea Z o disco Z (Sanger & Sanger, 2008). En esta banda se encuentran la mayor parte de las proteínas sarcoméricas, haciendo que el disco Z funcione como un puente entre las unidades sarcoméricas, los

filamentos de actina y titina. Por esto, el disco Z es crítico para el desarrollo y la diferenciación de la miofibrilla, pero altamente sensible a ser dañado.

Los filamentos intermedios se introducen en el disco Z de la fibra muscular formando una red que conecta las miofibrillas a las proteínas de la membrana citoplasmática; también actúa como un andamio tridimensional que ancla y estructura los organelos de la célula (Capetanaki, 2007). Este mismo sistema proporciona estructura a la red mitocondrial y de núcleos en el miocito; en estos últimos se organiza la lámina nuclear. Uno de los filamentos intermedios más importantes en el músculo es la desmina, que mantiene la posición del núcleo en conjunto con otras proteínas como nesprina, dineina, dinamina, cinesina, específicamente la cadena ligera de cinesina-1; y factores de transcripción como Akap450 (proteína centrosomal 450) y Map7 (Proteína asociada a microtúbulos 7) (Ver figura 5) (Roman & Gomes, 2018).

Entre las proteínas que conforman la red que mantiene íntegra la dinámica del sarcómero con el resto de las estructuras en el músculo esquelético, se encuentran las siguientes:

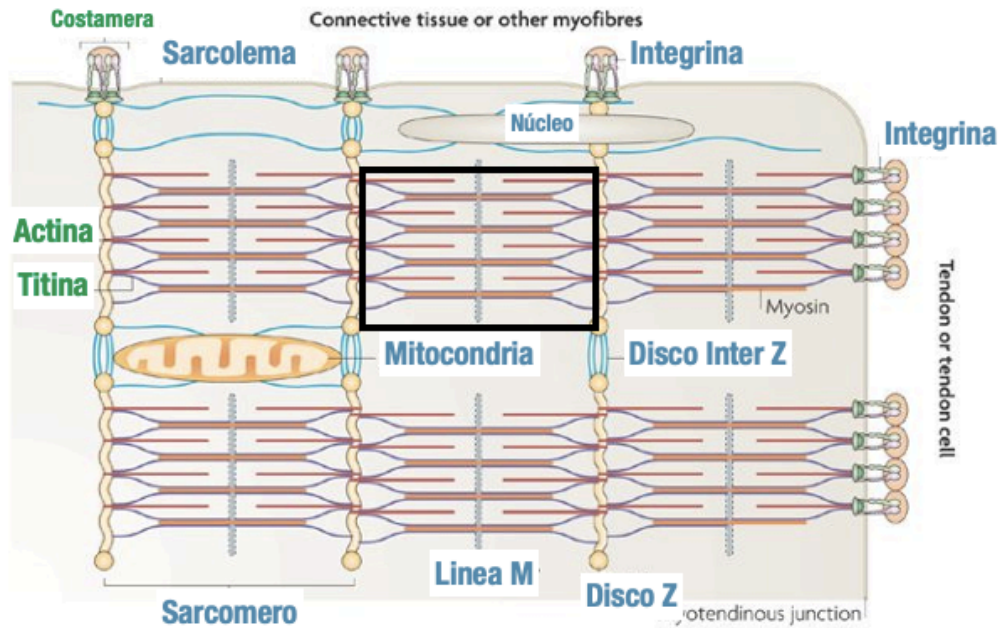


Figura 6. Definición del sarcómero. Modificada de Kritikou, E. Building muscle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 586 (2008). <https://doi.org/10.1038/nrm2463>.

**Vinculina.** La vinculina, una de las proteínas que conforman las costámeras, se expresa en todos los tipos de músculo. Su función es la de unir a la  $\alpha$ -actinina con la talina, que es una proteína dimérica de cabeza globular con dominio FERM. Este dominio es específico de proteínas citoesqueléticas que sirven de puntos de unión para otras proteínas o fosfolípidos codificada por el gen de Talina (*tnl1*), en músculo esquelético, que se une a la vínculina y a las integrinas, conectando indirectamente al sarcómero con estas.

**Integrinas.** La familia de las proteínas integrinas consiste en varias glicoproteínas transmembranales que crean una unión entre el citoesqueleto intracelular y la matriz extracelular. Las integrinas se adhieren al citoesqueleto de la célula por medio de las proteínas específicas tales como vinculina, talina y  $\alpha$ -actinina, dentro de la matriz extracelular con el propósito de participar en la estabilización,

supervivencia, migración y proliferación de la célula, además de ser el mecanosensor de primera línea del músculo (Boppart & Mahmassani, 2019).

**Distrofina-glicoproteína** El segundo mayor componente de las costámeras es el complejo distrofina-glicoproteína que conecta al citoesqueleto intracelular con la matriz extracelular del músculo estriado; es tan importante para la correcta función del órgano que la perturbación del mismo o de sus componentes pueden causar distintas enfermedades o miopatías (Henderson et al. 2018). El integrante primario de este complejo es la distrofina, que conecta al sarcolema con la matriz extracelular e interactúa con la actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios haciendo una unión entre ambos lados de la célula. El segundo componente de este complejo son los sarcoglicanos, que pertenecen a una sola familia de proteínas transmembranales (Figura 6). Existen otras proteínas sarcoméricas, las cuales integran el citoesqueleto con organelos como la mitocondria y el núcleo (Goldmann, 2018).

**Desmina.** Esta proteína se expresa desde la miogénesis temprana y está organizada como una red en el sarcómero. La red de desmina se une a los discos-Z y a las miofibrillas adyacentes; así como a las mitocondria y los núcleos; siendo indispensable para la estabilidad y la función celular. La desmina también forma una unión con una serie de proteínas entre las que se incluyen vimentina; nestina; paranemina, sincolina, sinemina y queratinas. La desmina funciona primariamente como un filamento intermedio mayor en el músculo esquelético que es responsable de unir fibras adyacentes entre sí y con el citoplasma (Chapman et al. 2014). Se ha reportado que estos filamentos son importantes contribuyentes tanto de la contractibilidad, como del estrés de la célula; estabilizar los microtúbulos y filamentos de actina; además de servir como cables de retención que facilitan la transferencia de cargas mecánicas entre la superficie celular y el núcleo (Goldmann, 2018). Por lo que, la desmina es el filamento intermedio principal en músculo, localizado predominantemente en la unión neuromuscular, el sarcolema y el disco z; es también importante para mantener las miofibrillas juntas con el fin de conectarlas al sarcolema y al núcleo (Zhang et al. 2008). Esta



proteína es reforzada y estabilizada al conectarse al sarcolema gracias a sincoilina, aunque esta no es requerida para la organización del músculo estriado o su localización correcta.

**Sincoilina.** Es un filamento intermedio con un peso de 64 KDa que se une y co-localiza con desmina creando un enlace entre la red de esta proteína y la matriz extracelular (Zhang et al. 2008). Se encuentra en el sarcolema; la unión neuromuscular; la unión mio-tendónica, el disco z sarcomérico y el espacio perinuclear. Este filamento intermedio tiene una región terminal NH<sub>2</sub> única, que no posee homólogos con otras proteínas, ni tampoco la capacidad de formar homo o heterodímeros con otros filamentos intermedios. La cola de sincoilina es inusualmente corta, lo cual puede explicar en parte, la falta de habilidad de la sincoilina para formar filamentos, ya que la cola es importante para su formación (Norwood, 2008). En el músculo esquelético, su expresión está enriquecida en las uniones neuromusculares y miotendónicas alrededor del núcleo; mientras que en el interior de la fibra, se localiza en el disco, aunque estudios de fracciones sub-celulares muestran que existe una porción de forma soluble en el citoplasma (Norwood, 2008).

**Láminas nucleares.** Las láminas nucleares son proteínas pertenecientes al grupo de filamentos intermedios tipo V, que forman la membrana nuclear interna y funcionan como anclaje de otras proteínas, formando una red esencial para la arquitectura nuclear. Estas proveen sitios de unión para proteínas intra-nucleares tales como emerina o nesprina-1 y 2; e influyen en la organización de la cromatina y el metabolismo nuclear. Las láminas se agrupan en dos tipos: tipo A (lámina A y C) codificadas por el gen *LMNA* y láminas tipo B (B1 y B2) codificadas por los genes *LMNB1* y *LMNB2* (Henderson et al. 2018). La lámina nuclear confiere estabilidad al núcleo y juega un rol fundamental en las funciones nucleares de la célula: participa en la localización y migración celular; la organización cromatínica, además de la replicación y reparación del DNA.

Las láminas de tipo A (*LMNA* y *LMNC*) participan en la modulación de la dinámica y organización del citoesqueleto de actina, lo que las hace participantes importantes en la mecanotransducción celular; la transducción nuclear; el desarrollo muscular y la plasticidad (Owens et al. 2021). A su vez, la lámina nuclear de tipo A, también se ha descrito como un promotor de la rigidez celular (Chatzifrangkesku et al. 2020).

**Nesprina.** La nesprina pertenece a la familia de proteínas transmembranales tipo II con repeticiones de espectrina expresadas extendidamente y conocidas como dominio KASH, las cuales se anclan a los filamentos de actina, filamentos intermedios y los microtúbulos del citoesqueleto. Esta familia de proteínas se encargan de unir al núcleo con diferentes elementos del citoesqueleto, siendo esta conexión su principal función dentro del gran espectro de proteínas del músculo esquelético (Zhang et al, 2007).

**Complejo troponina-tropomiosina.** El complejo troponina-tropomiosina está formado por proteínas regulatorias de filamento delgado, diferenciándose en diferentes fibras por cada subunidad (troponina C, troponina I, troponina T y tropomiosina). Estas proteínas son expresadas en isoformas específicas tanto en las fibras lentas como rápidas (Blaauw et al. 2013). La diversidad de proteínas regulatorias en el complejo troponina-tropomiosina es el mayor determinante de la respuesta del sistema miofibrilar a las variaciones citosólicas de calcio; haciendo que respondan de maneras distintas y creando los tipos de fibras musculares específicas.

**$\alpha$ -actininas.** Las  $\alpha$ -actininas son una familia de cuatro proteínas de anclaje de actina (dos isoformas musculares y dos no musculares) que comparten una enorme secuencia, además de los dominios funcionales similares (Lek & North, 2010). Las isoformas *ACTN2* y *ACTN3* de estas proteínas fueron originalmente descritas como componentes estructurales del aparato contráctil. *ACTN2* se expresa en todas las fibras musculares mientras que *ACTN3* solo se expresa en fibras rápidas glucolíticas, este segundo gen es uno de los dos únicos genes en

humano que tiene una selección positiva para una mutación nula. Las  $\alpha$ -actininas sarcoméricas (2 y 3) son notables entre las proteínas estructurales por su habilidad de interactuar con un rango diverso de proteínas estructurales, membranosas, metabólicas y de señalización (Lek & North, 2010). Estas proteínas se unen al calcio y a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2); aunque no funcionan como sensores son andamios de estos y participan activamente en la reorganización del citoesqueleto de actina.

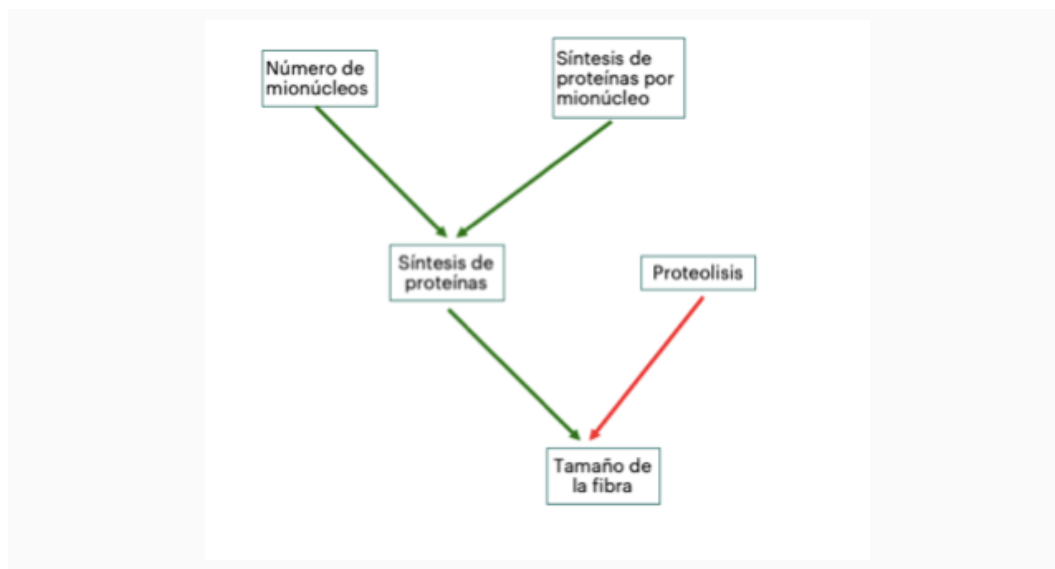


Figura 7. Regulación del tamaño de la fibra. Modificado de: Gundersen, K. (2016). Muscle memory and a new cellular model for muscle atrophy and hypertrophy. *Journal of Experimental Biology*, 219(2), 235–242. <https://doi.org/10.1242/jeb.124495>

### B.1.5 Regeneración de la fibra muscular.

Las fibras musculares poseen también un grupo de células troncales llamadas células satélite que se localizan entre el sarcolema y la lámina basal y contribuyen al crecimiento muscular, la reparación y la regeneración cuando son activadas por factores miogénicos (Frontera & Ochala, 2015). Los cambios en el tamaño de la fibra están asociados con la variación en el número de mionúcleos.

Las células satélite musculares son células mononucleares miogénicas no diferenciadas que se encuentran en el músculo incluyendo el huso neuromuscular.

Se trata de una población distinta de las células miogénicas embrionarias y fetales. Después de una lesión muscular, durante el crecimiento post-natal y en respuesta a cambios hipertróficos, las células satélite son activadas mediante vías altamente orquestadas que regulan su proliferación, polaridad y diferenciación (Owens et al. 2021).

Durante el proceso de regeneración muscular, las células satélite primero se encuentran en su estado quiescente normal y luego comienzan a proliferar. Después de varios ciclos de proliferación, la mayoría de las células se diferencian y fusionan para formar una nueva fibra o reparar la dañada. La activación de las células satélite no está restringida al sitio de daño, ya que las señales que se emiten son capaces de activar las células satélite a lo largo de la fibra y promover su migración al sitio de regeneración. A continuación, las células satélites quiescentes son resguardadas debajo de la lámina para las rondas de regeneración subsecuentes. El proceso de activación de células satélite y diferenciación en la regeneración del músculo esquelético es una reminiscencia del desarrollo muscular embrionario (Chargé & Rudnicki, 2004).

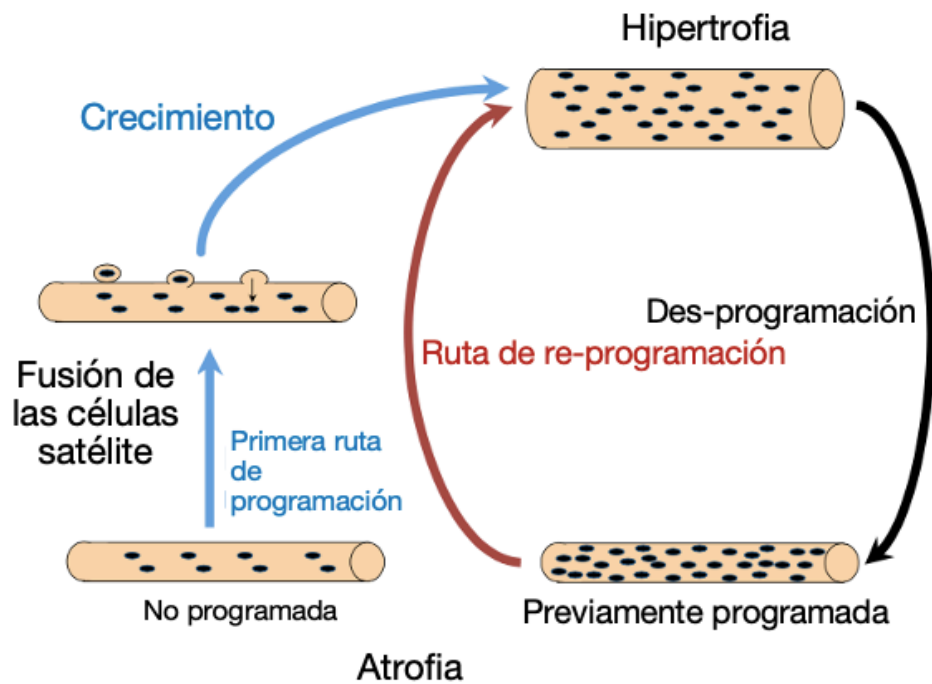


Figura 8. Memoria muscular. Modificado de: Gundersen, K. (2016). Muscle memory and a new cellular model for muscle atrophy and hypertrophy. *Journal of Experimental Biology*, 219(2), 235–242. <https://doi.org/10.1242/jeb.124495>

De acuerdo con el paradigma actual, el núcleo muscular obedece a cierto dominio citoplasmático. Para preservar el tamaño de este dominio, se cree que los núcleos nuevos, provenientes de las células satélite son insertados para fusionarse con fibras anteriores durante la hipertrofia; ocurriendo un proceso inverso en la atrofia muscular (Gundersen K & Bruusgaard J.C., 2008).

### B.1.6 Metabolismo del Músculo Esquelético.

El músculo esquelético convierte la energía química en energía mecánica para generar fuerza, mantener la postura y producir movimientos. Desde una perspectiva metabólica, el rol del músculo esquelético incluye una contribución al metabolismo basal de energía, sirviendo como almacén para sustratos importantes como aminoácidos y carbohidratos, así como la producción de calor

para mantener la temperatura corporal (Frontera & Ochala, 2015; Seaborne & Sharples, 2020).

El tipo de fibra muscular también determina la función metabólica de las mismas. Las fibras de tipo I o lentas, contienen una gran cantidad de mioglobina, rodeadas de una enorme red de capilares. En su interior se encuentra una mayor cantidad de mitocondrias, las cuales se encargan de oxidar carbohidratos y lípidos para la obtención de energía. La oxidación mitocondrial predominante en estas fibras permite que realicen tareas sostenidas, pero no de una intensidad alta. Por su parte, las fibras tipo II o rápidas tienen un metabolismo anaerobio en donde predomina la producción de lactato; al tener un número más reducido de mitocondrias, el glucógeno muscular es catabolizado a piruvato; lo que hace que la fibra produzca contracciones rápidas por lo que consumen sus sustratos metabólicos a la misma velocidad.

El músculo esquelético es de contracción voluntaria, a diferencia del músculo liso o el cardíaco, por lo que requiere una gran cantidad de energía en forma de ATP, derivado de la obtención de glucosa a través del transportador GLUT 4 y, mientras que en las fibras tipo I, se obtiene la energía de la acumulación y degradación de ácidos grasos. Existen tres vías mayores de regeneración de ATP y su distribución es marcadamente diferente en relación con cada tipo de fibra (Blaauw et al. 2013).

o La vía glucolítica permite la generación del ATP a partir de la glucosa 6-fosfato proveniente de la degradación del glucógeno intracelular o de la fosforilación de la glucosa proveniente del transporte de glucosa trans-sarcolema. Esta vía es aproximadamente dos veces más activa en las fibras rápidas a comparación de las lentas y se encuentra determinada por la producción de coenzimas NAD reducidas, las que necesitan conversión de piruvato a lactato para la regeneración de NADH.

- Las fibras lentas poseen una vía de generación de ATP oxidativa, mucho más efectiva, gracias a una mayor cantidad de mitocondrias. Esta vía tiene la ventaja de usar ácidos grasos, además de glucosa, como fuente de acetil CoA.

### B.1.7 Patologías del músculo esquelético.

Existen alrededor de 30 enfermedades genéticas que se consideran miembros de las distrofias musculares o miopatías, cuyas características clínicas incluyen degeneración muscular progresiva y debilidad muscular, siendo la más común la enfermedad de Duchenne (Henderson et al. 2018). También hay un gran número de miopatías asociadas a la lámina nuclear, conocidas como laminopatías. Las distrofias musculares congénitas asociadas a la lámina nuclear se manifiestan con un genotipo muscular particularmente severo, donde el daño muscular inicia en etapas muy tempranas del desarrollo; acompañadas de defectos nucleares frecuentes y mecanosensores dispares (Owens et al. 2021) como la ruptura en la envoltura nuclear, el daño al DNA y progresiones en la cromatina se han correlacionado con la severidad de las laminopatías musculares. En procesos donde las mutaciones de *LMNA* son responsables por distrofias congénitas de músculo, se pierde la habilidad de hipertrofia en respuesta a estímulos mecánicos (Owens et al. 2021). músculo, se pierde la habilidad de hipertrofia en respuesta a estímulos mecánicos (Owens et al. 2021).

Todas estas enfermedades tienen en común la desorganización celular presentándose de varias maneras, pero sobre todo con el movimiento de los núcleos de la periferia al centro de la fibra muscular (Gilbreath et al. 2014). Además, en la mayoría de ellas se han encontrado un gran número de genes implicados entre los que destacan Emerina (*EMED*), *Lamina nuclear (LMNA)*, *Nesprina-1 y 2 (SYNE1, SYNE2)*; los cuales están asociados con la envoltura nuclear (Heller et al, 2019).

## BIOTINA.

### B.2.1 Estructura Química.

La biotina es un compuesto orgánico heterobíciclico que consiste en 2-oxohexahidro-1H-tieno [3,4-d]imidazol, con un sustituyente de ácido valérico único al anillo tetrahidrotiofeno (figura 9). Esta vitamina como grupo prostético, como coenzima, de las carboxilasas.

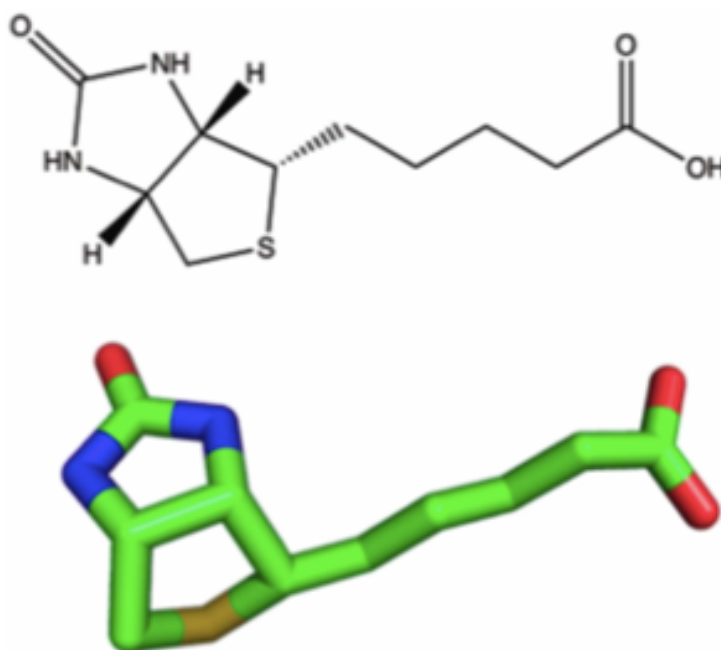


Figura 9. Estructura de la biotina. Tomada de: Beckett, D. (2018). Specificity and selectivity in post-translational biotin addition. *Biochemical Society Transactions*, 46(6), 1577–1591. <https://doi.org/10.1042/BST20180425>



### B.2.2 Funciones y requerimientos de la biotina.

La biotina es una vitamina hidrosoluble, que se agrupa dentro complejo B. Los mamíferos no tienen la capacidad de sintetizar la biotina por lo que los requerimientos tienen que ser cubiertos por la dieta o como producto de la síntesis bacteriana de la microflora del intestino, aunque este último punto se encuentra en controversia (Riveron-Negrete & Fernández-Mejía, 2018; Mock, 2017; Guargener, 2011). En humanos, la ingesta diaria recomendada (IDR) para hombres y mujeres adultos es de 30 µg. En estas concentraciones la biotina actúa como grupo prostético de enzimas carboxilasas.

Las carboxilasas se sintetizan como apocarboxilasas, que carecen de actividad enzimática y requieren unirse covalentemente a la biotina, a este proceso se le conoce como biotinilación, el cual es llevado a cabo por la holocarboxilasa sintetasa (figura 10) (Vilches-Flores, A. & Fernandez-Mejia. 2005).

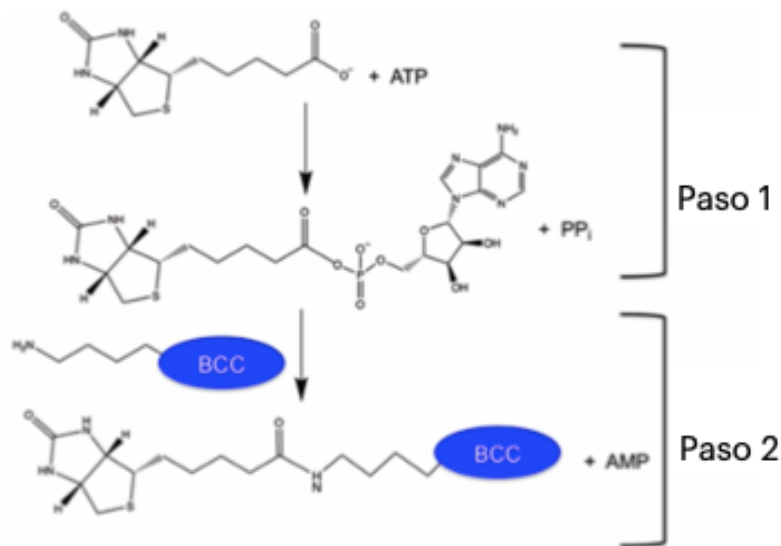


Figura 10. Reacción de biotilación de las carboxilasas. Tomada de: Beckett, D. (2018). Specificity and selectivity in post-translational biotin addition. *Biochemical Society Transactions*, 46(6), 1577–1591. <https://doi.org/10.1042/BST20180425>

### B.2.3 Metabolismo de la Biotina.

La biotina se puede encontrar de manera libre como biotina o en péptidos biotilados. Para su digestión se requiere que ésta se encuentre en su forma libre, la cual se absorbe por los enterocitos de la porción distal del duodeno y próxima la cual se absorbe por los enterocitos de la porción distal del duodeno y próxima del yeyuno, de aquí pasa al torrente sanguíneo. La entrada a las células se lleva a cabo a través del transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT), que reconoce la porción del ácido valérico de la biotina. Este transportador es una proteína transmembranal que funciona como importador neutro, introduciendo a la biotina y el ácido pantoténico junto al sodio, a favor del gradiente de concentración.

La biotina es capaz de reciclarse mediante un proceso conocido como el ciclo de la biotina, el cual comprende la degradación proteolítica de holocarboxilasas que

desemboca en la formación de péptidos biotinilados, cuyo fragmento más pequeño es la biocitina (biotinil e-lisina). La biotinidasa libera biotina de la biocitina para unirlos en nuevas holocarboxilasas, o bien puede catabolizarse formando otros productos derivados y excretarse.

#### B.2.4 Biotinilación de otras proteínas

En el grupo de trabajo de Zemleni (Xue et al., 2013) se estudiaron proteínas susceptibles a ser biotiniladas bajo la acción de la Holocarboxilasa Sintetasa (HCLS) y se encontraron al menos 108 proteínas que no corresponden a su clásica biotinilación de las carboxilasas, incluyendo miembros de la familia de proteínas de choque térmico o proteínas de respuesta a estrés, específicamente la proteína de choque 72 (*HSP72*), llegando a la conclusión de que la unión covalente de la biotina es un proceso biológico que ocurre en varios grupos de proteínas (Xue et al., 2013).

En un trabajo realizado en tumores de vesícula biliar, se encontraron inclusiones dentro de los mismos, las cuales eran ricas en biotina y positivas para dos enzimas del metabolismo de esta vitamina (Piruvato Carboxilasa y Propionil CoA Carboxilasa), sin que se encontrará una relación de estas inclusiones y las lesiones neoplásicas en esta patología. Estos cúmulos intranucleares de biotina también son encontrados en tumores no cancerígenos relacionados con la elevación de las hormonas femeninas, como estradiol y progesterona, así como la mucosa gástrica (Kimura et al; 2005)

En un estudio del fluido espinal cerebral de infantes (Mock et al., 2018) se encontró que el 20% de la biotina se encontraba unida a macromoléculas, además de encontrar varias bandas de proteínas biotiniladas que no correspondían al peso molecular de las carboxilasas; lo que llevó a la conclusión de que la biotinilación de proteínas independientemente a las carboxilasas cumple una función biológica aún no especificada. Apoyando esta hipótesis, un estudio con células mononucleares de sangre periférica (Zemleni et al., 2014) encontró que la

entrada de esta vitamina es significativamente mayor, en las fases G1, S o M, respondiendo a la proliferación con un aumento en la entrada de biotina, lo que refuerza el punto de vista de que la biotina posee efectos adicionales al de grupo prostético de las carboxilasas.

La biotina ha tenido gran utilidad en aplicaciones biotecnológicas debido a su gran afinidad con la estreptavidina, siendo este complejo el más fuerte entre las uniones covalentes, sin embargo, esta modificación natural entre los organismos es poco comprendida.

#### B.2.5 Autoensamblaje de la biotina

En un estudio realizado con eritrocitos en 2010 se encontró que la biotina exhibe una significativa forma de autoensamblaje para formar una red extensiva de fibras, posiblemente unidas por la interacción de la cadena lateral valérica con el grupo ureido, esto sin activar ningún grupo funcional como ancla (Joshi & Verma, 2010). Esta es una agregación que puede ser favorable al funcionar como protección para el eritrocito; sin embargo, esta agregación solo ocurre bajo la estimulación que proveen las mismas proteínas de la superficie del eritrocito. Esta propiedad, así como la unión biotina-avidina son de los enlaces covalentes más fuertes en términos fisicoquímicos, han sido aprovechados para crear moléculas que permitan mantener las funciones de algunas proteínas como la hemoglobina (Joshi & Verma, 2010) o como herramienta para múltiples técnicas de laboratorio. En el estudio de Singh & Kluger se creó un tetrámero de unión de avidina con hemoglobina usando dos moléculas de biotina como intermediario para ella, obteniendo una especie de mayor tamaño para evitar la extravasación mientras se mantiene la función de oxigenación de la hemoglobina. (Singh & Kluger, 2016). Lo anterior aporta evidencias de la participación de la biotina, tanto *in vivo* como *in vitro*, en la organización celular.

### B.2.6 Efectos de la biotina en dosis farmacológicas.

Se ha encontrado que la biotina en concentraciones en el orden de 30-650 veces sus requerimientos diarios de 30  $\mu\text{g}$ , esta vitamina es capaz de modificar la expresión de genes (Dakshinamurti, 2005). Estudios de microarreglos y de proteómica han revelado que concentraciones farmacológicas de biotina modifican la expresión de cientos de genes a nivel transcripcional (Wiedmann, et al. 2004) y post-transcripcional (Rodríguez-Melendez, et al. 2005). Asociado con su efecto sobre la expresión de genes, se ha observado que modifica funciones biológicas (Riverón-Negrete y Fernández-Mejía 2017).

Se conoce poco sobre los mecanismos moleculares mediante los cuales la vitamina afecta la expresión de genes. El mecanismo más aceptado es la participación de la vía de señalización de la guanilato ciclasa soluble/ proteína cinasa G. Los elementos existentes en este mecanismo (Vesely, 1982; Spence & Koudelka, 1984; De La Vega & Stockert, 2000; Solórzano-Vargas et al., 2002) proponen que la biotina es transportada al interior de la célula, y ahí, mediante la acción de la holocarboxilasa sintetasa (por un mecanismo que no se encuentra bien definido), activa a la guanilato ciclasa soluble, la cual aumenta las concentraciones intracelulares de guanósín monofosfato cíclico (GMPc), y este aumento activa a la cinasa PKG. concentraciones intracelulares de guanósín monofosfato cíclico (GMPc) y este aumento activa a la cinasa PKG.

Diversas investigaciones han reportado que concentraciones farmacológicas de biotina, disminuyen la hipertrigliceridemia y la intolerancia a la glucosa tanto en humanos como en animales de laboratorio (Riveron-Fernandez 2017), 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 biotina disminuye la hiperglicemia en modelos de diabetes en ratones KK, ratas OLEF, así como pacientes diabéticos del tipo 1 y 2 (Reddi et al, 1988; Suchy et al, 1986; Hemmati 2013).

Se ha observado una correlación negativa entre las concentraciones de biotina en plasma y lípidos en sangre (Marshall et al, 1980), también se han detectado síntomas espontáneos de deficiencia de biotina que en ratas con tendencia genética, conducen al aumento de lípidos en sangre. (Marshall et al, 1976) En pacientes con aterosclerosis e hipercolesterolemia la administración de 5 mg de biotina al día durante 4 semanas disminuyó las concentraciones de colesterol total (Duksova y Krivoruchenko, 1972). En el trabajo de Revilla-Monsalve y colaboradores (2006) se encontró que la suplementación con 5 mg de biotina tres veces al día durante 28 días produjo una disminución en las concentraciones séricas de triglicéridos y de las lipoproteínas de baja densidad tanto en pacientes diabéticos como en individuos no diabéticos con hipertrigliceridemia. En ratones sanos la administración durante 8 semanas de una dieta con biotina (97.7 mg/kg de dieta), con respecto a la dieta control (1.76mg/kg de dieta), disminuyó los niveles séricos de triglicéridos y de ácidos grasos (Suchy et al, 1986). Los mecanismos moleculares de estos efectos hipolipemiantes están asociados con un decremento en la expresión de genes y de factores lipogénicos, así como en la fosforilación de proteínas reguladoras de estas vías (Larrieta et al., 2010, Aguilera-Méndez y Fernández Mejía 2012, Boone et al., 2015). Otros trabajos (Lewis (2001) y Munday (1999) en los que se encontró que el consumo de una dieta de 100 mg/kg de peso durante 21 días reduce significativamente la abundancia de ACC-2 biotinilada, sugieren que la disminución de la malonil-CoA y, por ende, la desinhibición de la oxidación de ácidos grasos, podría también estar participando en la disminución de ácidos grasos al aumentarse su oxidación

#### *B.2.7 Efectos de la biotina en dosis farmacológicas sobre la estructura tisular*

Estudios en nuestro laboratorio encontraron que en el mismo modelo experimental en donde la biotina disminuye las concentraciones sanguíneas de glucosa y de triglicéridos, se observaron cambios en la estructura de diferentes tejidos. En el islote pancreático se encontraron incrementos en su tamaño y un porcentaje más elevado de islotes con células alfa localizadas hacia el centro del islote con

respecto a los ratones que recibieron la dieta control (Lazo de la Vega-Monroy et al., 2013). En el hígado, los resultados revelaron aumentos significativos en el porcentaje de hepatocitos binucleados y nucleomegalia, así como dilatación de sinusoides y aumento en la vascularización. Interesantemente, este cambio estructural del hígado no se vio reflejado en incrementos de marcadores de estrés oxidante, ni en enzimas de escape indicativas de daño hepático (Riverón-Negrete et al., 2016). En el testículo se observaron cambios en la circularidad de los túbulos seminíferos y aumentos en el número de espermatogonias (Pastén-Hidalgo et al. 2020). El aumento en la cantidad de espermatogonias está asociado con incrementos en las vías de proliferación celular AKT y ERK (Salazar-Anzures et al. 2021)

En ratones hembra se observó que la administración durante 9 semanas a partir del destete de una dieta con biotina (97.7 mg/kg de dieta), con respecto a la dieta control (1.76mg/kg de dieta), durante 9 semanas modificó la estructura de los ovarios, disminuyendo el número de folículos primarios y de folículos de Graaf (Báez-Saldaña et al., 2009). También, en otras investigaciones el tratamiento agudo con biotina (100 mg/kg de peso corporal) indujo atrofia en el cuerpo lúteo en ratas (Paul et al., 1973).

### **C. ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PROYECTO.**

Estudios previos en ratones Balb/C encontraron que la administración de una dieta suplementada con biotina administrada a partir del destete durante ocho semanas produjo cambios en la morfología del músculo esquelético, así como en otros tejidos.

En los cortes de músculo femoral de los ratones control encontramos la estructura típica de las fibras musculares estriadas con un paralelismo entre ellas, con núcleos periféricos y espacios entre fibras (Fig. 11) Por otro lado, músculo femoral de los ratones alimentados con la dieta suplementada con biotina encontramos zonas con: 1. Fibras de apariencia normal y fibras con lisis y 2. Fibras con daño

extenso (Fig. 11). El análisis de los núcleos reveló que los ratones que consumieron la dieta suplementada con biotina presentaron un aumento significativo de núcleos con cromatina fragmentada, forma redondeada y posición alejada de la periferia de la fibra muscular) (Figura 11). (Enriquez-Calderón, resultados no publicados).

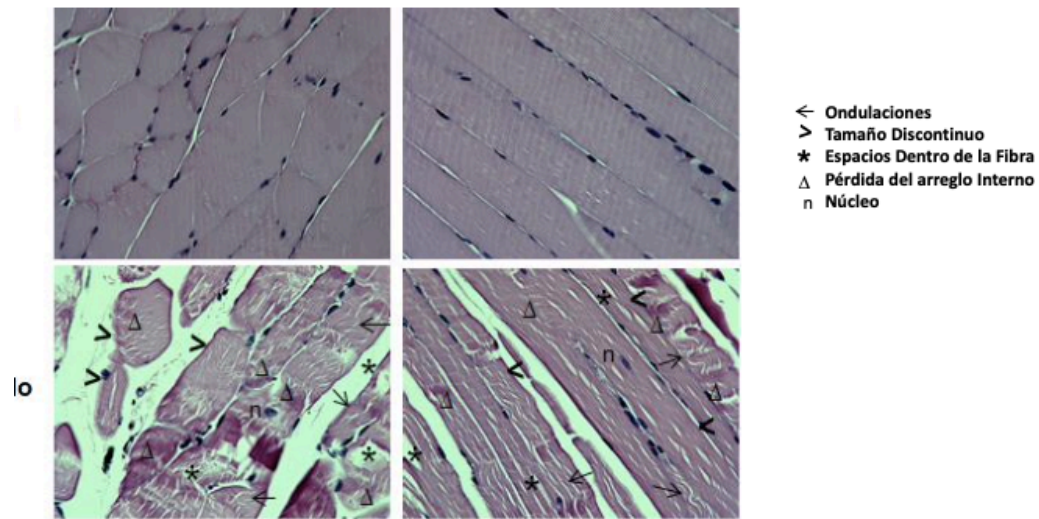


Figura 11. Análisis histológico de las muestras control (A) y suplementadas con biotina (B), donde se marcan con flechas y estrellas las diferencias entre ambos en cortes longitudinales y transversales a un aumento de 60X en microscopio de luz. Artículo en preparación, Esmeralda Enriquez Calderón.

Se realizó el conteo de núcleos por campo, destacando la aparición de un porcentaje significativamente mayor de núcleos denominados reactivos (encontrados en el centro de la fibra; con mayor cantidad de nucleolos y una forma circular (figura 12)



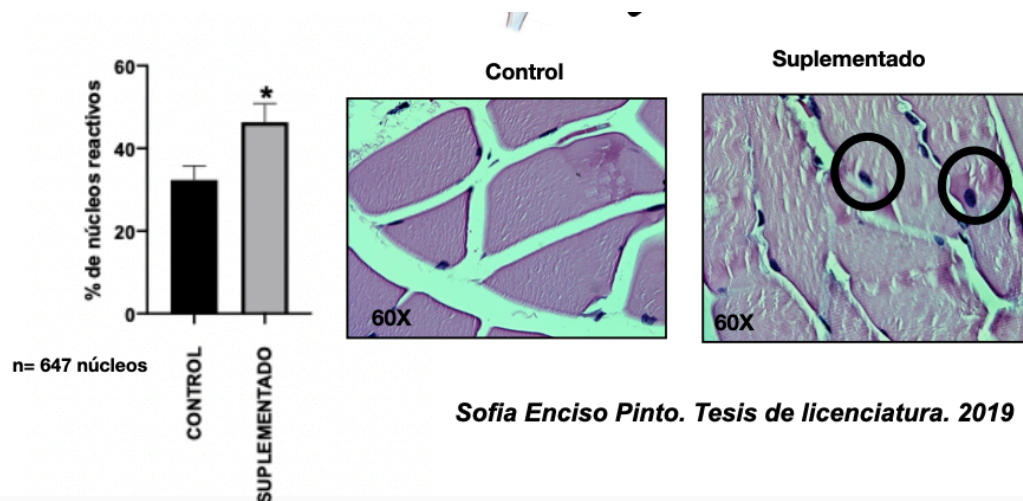


Figura 12. Diferencia en el porcentaje de núcleos denominados reactivos entre el grupo control y el suplementado con biotina.

El análisis por inmunofluorescencia de la Desmina, una proteína importante para el andamiaje del núcleo celular en la miofibrilla y necesaria para su movilización hacia la periferia, indicó una marcada diferencia en la distribución de la proteína, tanto en los cortes transversales como en los longitudinales, en estos últimos se observó la presencia de marcas parecidas a grietas o fisuras en el grupo suplementado comparado con el control (Figuras 13 y 14). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión del mensajero de desmina.

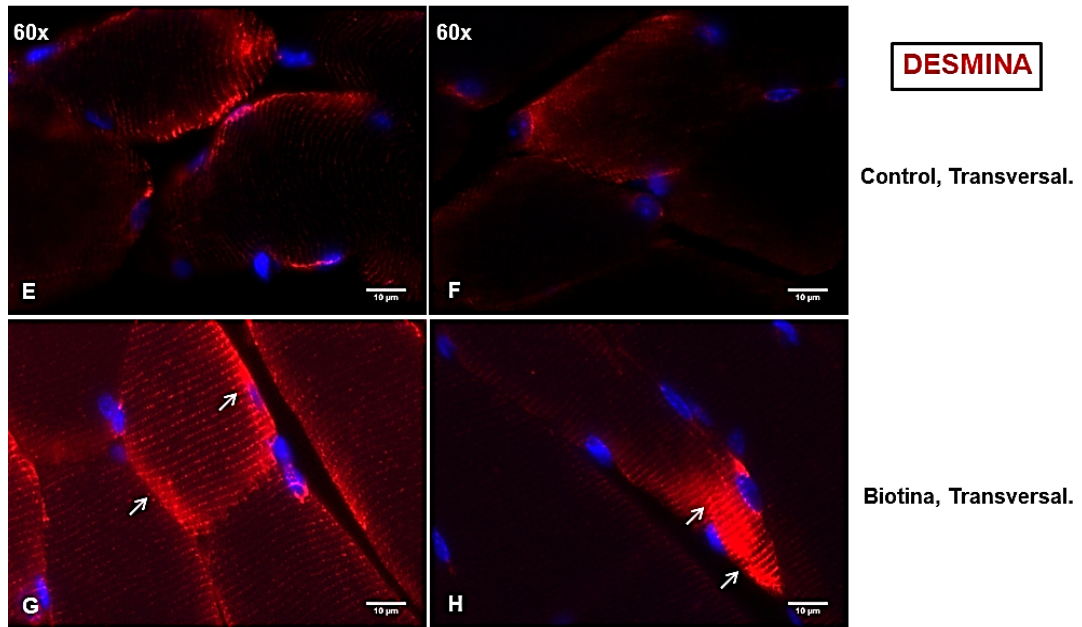


Figura 13. **Presencia de Desmina (rojo) en músculo esquelético.** Se observan imágenes representativas de cortes transversales del grupo control y del suplementado con biotina.,

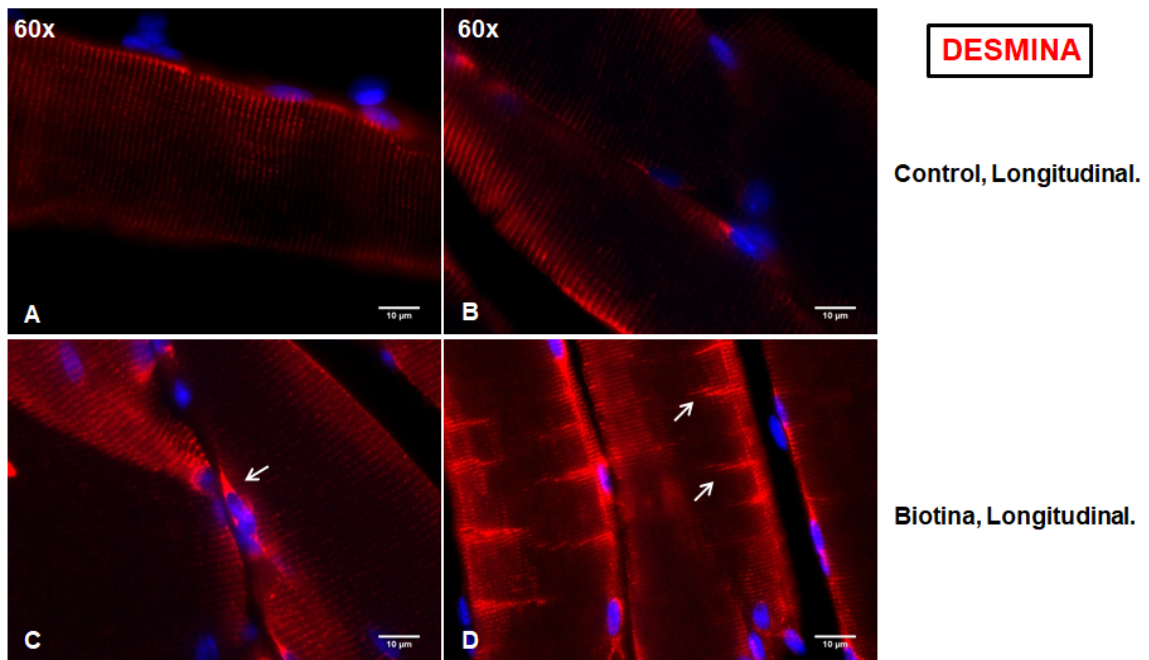
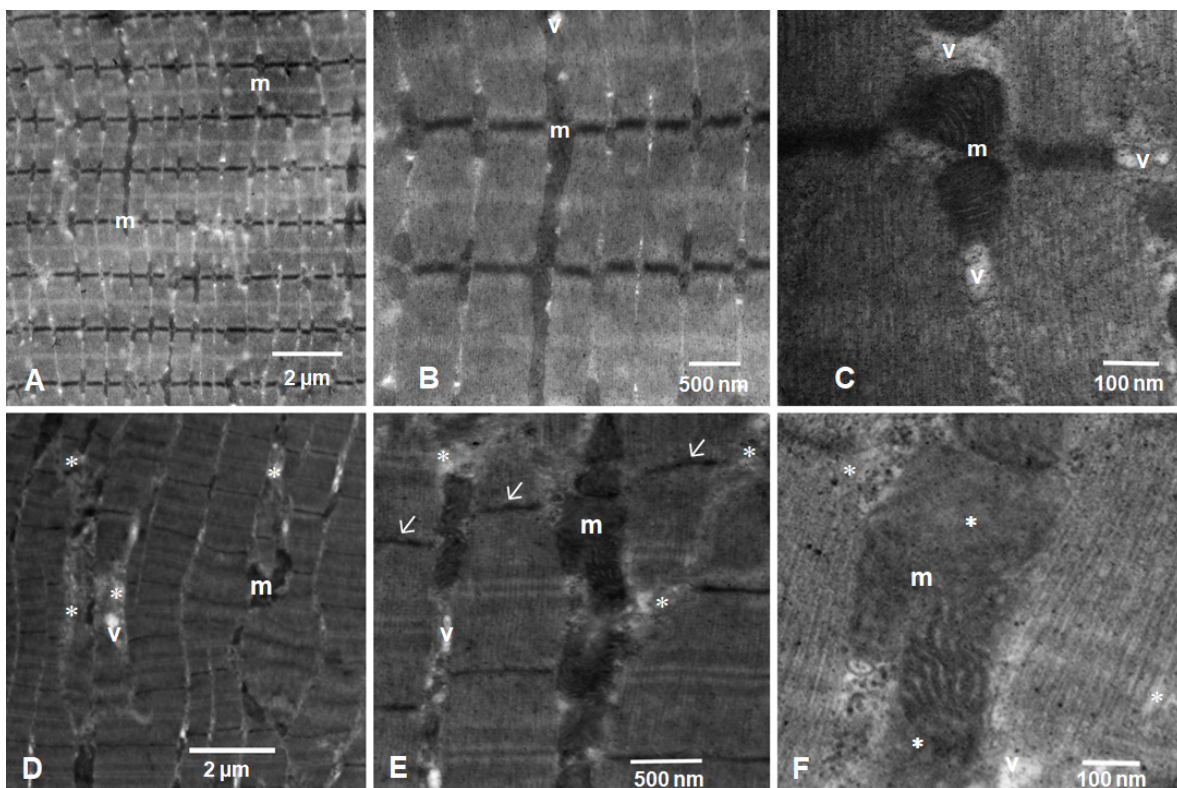


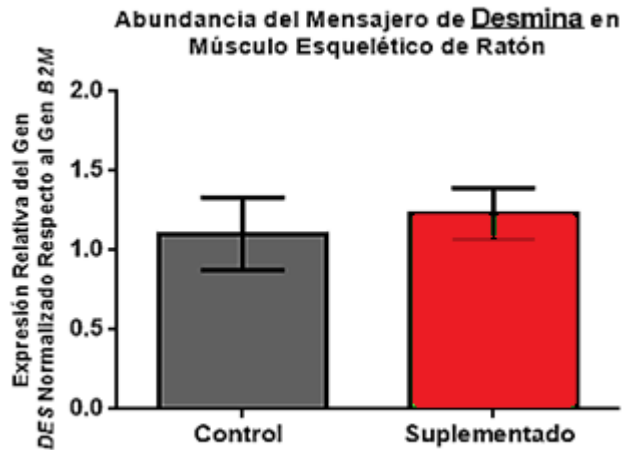
Figura 14. **Presencia de Desmina (rojo) en músculo esquelético.** Se observan imágenes representativas de cortes longitudinales del grupo control y suplementado con biotina.

En estudios de microscopía electrónica de músculo femoral y de ratones, se vio que los ratones control presentaron las bandas oscuras (Z) y claras (H, I) paralelas entre sí reflejando la organización precisa de las proteínas contráctiles actina y miosina dentro de cada miofibrilla; en el sarcoplasma se observaron mitocondrias de apariencia normal; a nivel ultraestructural (Fig. 15A, 15B, 15C).

En músculo femoral de ratones que recibieron dieta suplementada con biotina se perdió la organización de las miofibrillas. Los sarcómeros perdieron la alineación paralela (Fig. 16D, E y F).



**Figura. 15.** Músculo femoral de ratones control (A, B, C) y suplementados con biotina en su dieta (D, E, F). La ultraestructura de las miofibrillas y mitocondrias del músculo femoral de ratones control es normal. En ratones suplementados con biotina la línea Z de los sarcómeros no es paralela entre miofibrillas (E, flechas); hay aumento del diámetro de las miofibrillas, lisis de proteínas contráctiles y mitocondrias (\*). Vacuolas (v). Magnificación: A, D = 10,000x, barra de escala: 2 µm; B, E = 30,000x, barra de escala: 500 nm; C, F = 80,000x, barra de escala: 100 nm.



#### **D. JUSTIFICACIÓN**

La biotina es una vitamina que se vende de manera libre y comercial a dosis farmacológicas, su uso se ha comercializado ampliamente bajo el concepto de que mejora la apariencia de las uñas y el cabello; además de ser empleada como coadyudante en el tratamiento de enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico. Investigaciones recientes demostraron que la biotina en concentraciones farmacológicas produce modificaciones tisulares, por lo que existe la posibilidad de que esta vitamina pueda afectar la función de diversos tejidos. Por esta razón es importante profundizar en sus efectos histológicos y mecanismos mediante los cuales esta vitamina produce cambios en la morfología. Dado que se sabe que concentraciones farmacológicas de biotina modifica la expresión de genes, en este trabajo proponemos analizar el efecto de una dieta suplementada con concentraciones farmacológicas de biotina sobre la expresión de diferentes transcritos de proteínas que participan en la estructura muscular, en nuestro modelo experimental de ratón cepa Balbc/cAnN, en el cual se ha determinado que la suplementación de biotina en la dieta produce cambios en la localización del núcleo y en el disco Z del músculo esquelético.

## **E. HIPOTESIS**

Ya que la suplementación con biotina durante ocho semanas produce cambios estructurales en la fibra muscular, y que concentraciones farmacológicas de biotina modifican la expresión de genes, es posible que haya una disminución en la expresión de genes que codifican las proteínas que participan en el proceso de andamiaje del núcleo celular y del citoesqueleto.

## **F. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de una concentración farmacológica de biotina en la dieta sobre la expresión de genes participantes en el proceso de andamiaje del núcleo celular y del citoesqueleto, en el músculo esquelético de ratón.

## **G. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

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

- I. La abundancia de mensajeros de los genes que codifican para las proteínas asociadas a desmina en el mecanismo de andamiaje.
- II. La abundancia de mensajeros de los genes que codifican para las proteínas pertenecientes al disco-Z y a las costámeras, relacionados con el mantenimiento de la organización celular.
- III. La abundancia de mensajeros de los genes asociados al ensamblaje de la lámina nuclear.

## MÉTODOS

### I. 1. Modelo experimental

Se utilizaron 16 ratones macho de la cepa Balbc/cAnN de tres semanas de edad, los cuales se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Pediatría bajo Ética y Experimentación del Instituto. A partir del día del destete la mitad de los ratones recibieron una dieta control conteniendo 1.76 mg de biotina/kg- (TD-01362), cantidad que cubre en los ratones los requerimientos diarios de la vitamina; y la otra mitad una dieta suplementada con 97.7 mg de biotina/kg de dieta (TD-0136), lo cual representa 56 veces más biotina que la contenida en la dieta control. Esta cantidad de la vitamina es comparable a la encontrada en los suplementos vitamínicos que se venden comercialmente. Los ratones se mantuvieron en ciclos de luz/ oscuridad de 12 horas cada uno, a una temperatura promedio de 22° C, con agua y alimento *ad libitum* durante 8 semanas. 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 sevofluorano (Sevorane, Sedalpharma, CDMX, México) en una campana de flujo laminar, y se procedió a la eutanasia mediante dislocación cervical. Se extrajo el tejido del músculo esquelético correspondiente al cuádriceps femoral el cual se guardó a -70°C para después proceder a extraer el ARN.

### I. 2 Abundancia de Mensajeros por RT-PCR.

Se obtuvo ARN total de tejido músculo esquelético mediante Trizol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). La calidad del ARN se analizó por electroforesis en un gel de agarosa y por espectrofotometría determinando la relación de absorbancia medida a 260/280 de longitud de onda (BioTek, Winooski, VT, USA), para posteriormente sintetizar el cADN, a partir de 1

$\mu\text{g}$  de ARN total mediante la reacción de transcripción reversa con 500 unidades de M-MVL RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El cDNA se mezcló con Sybr Green Master mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y oligos específicos para cada gen, los que se sintetizaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología (UNAM, Cuernavaca, México), los cuales se describen en la tabla 1. La determinación de la abundancia de los transcritos se realizó por PCR en tiempo real usando el aparato ABI Prism 7700 Sequence Detector (Foster City, CA, USA). Como control interno se cuantificó la abundancia de la *Hprt* (Hipopoxantina fosforribosiltransferasa 1). Se hicieron curvas de estandarización para fijar la concentración óptima de sonda para cada caso. La expresión cuantitativa de los genes se calculó por el método de doble CT ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ) (Livak and Schmittgen, 2001). Este método, también llamado  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  es una fórmula aritmética usada para calcular el cambio relativo en la expresión de genes. Las letras CT representan el umbral del ciclo (cycle threshold) de la muestra, el cual es obtenido a través de la reacción de qPCR por el aparato utilizado para realizarla. Esto es el número de ciclos donde la fluorescencia generada por la reacción de PCR es distinguible del ruido de fondo. Delta, representada por la letra griega  $\Delta$ , la cual es un término matemático usado para describir la diferencia de dos números, resumiendo así las fórmulas. Dicho esto, la ecuación de  $\Delta\Delta\text{Ct}$  representa la diferencia del  $\Delta\text{Ct}$  de la muestra tratada con el  $\Delta\text{Ct}$  de la muestra control. A su vez, cada  $\Delta\text{Ct}$  representa la diferencia entre los valores del gen de interés con el gen de una muestra dada. Este procedimiento se realiza para normalizar el gen de interés con un gen endógeno que no es afectado por el tratamiento experimental. Durante la realización de este método aritmético se consideró la media geométrica para los valores del grupo control debido a la variabilidad entre muestras de los ciclos de amplificación. Una vez obtenido el gen calibrador, se procedió a obtener el valor de  $\Delta\Delta\text{CT}$  para cada una de las muestras y después obtener el exponencial de 2 elevado al negativo de estos valores, consiguiendo así los valores representativos de la amplificación de cada uno de los genes, es decir, el  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ .

Tabla 1. Oligonucleótidos para protocolo de RT-qPCR de músculo esquelético

Proteína	Gene Símbolo	Número de acceso	Secuencia 5'→3'	Producto
<i>Hipoxantina guanina fosforiltransferasa</i>	<i>hptr</i>	NC_000086.8	Fwd: CAA AGC CTA AGA TGA GCG CAAG Rev: GAAATG TCA GTT GCT GCG TCC C	173
<i>α-actinina 3</i>	<i>α-actn3</i>	NM_013456.2	Fwd: CAG GTA CTG ACC CGA GAT GC Rev: TGA GAC AAG CTC GGA AGT CG	149
<i>Vinculina</i>	<i>vcl</i>	NM_009502.5	Fwd: GGT CTA GCA AGG GCA ATG AC Rev: TGA ATA AGT GCC CGC TTG GT	112
<i>Emerina 1</i>	<i>emd</i>	NM_007927.3	Fwd: CGG GGA CCT CAC TTG TAG ATG Rev: GAG ACA TTG GAA ATG GGG CG	160
<i>Lamina A</i>	<i>Imna</i>	NM_00111110 2.2	Fwd: AGG ATG ACG ACG AGG ATG GA Rev: CTT TGG CAT GGA GGT GGG AG	126
<i>Nesprina 1</i>	<i>syne1</i>	NM_022027.2	Fwd: GCC CAA AGA GCA GGT CCA CA Rev: ACA TGG GTA CAA GGC AGG TA	101
<i>Dineina</i>	<i>dync1l</i>	NM_010063.4	Fwd: CAA ACC CAG CCG TCC TGT Rev: CGT CTG CAG CTC CAG TAA GT	142
<i>Desmina</i>	<i>des</i>	NC_000067.7	Fwd: GAG ACC ATC GCG GCT AAG AA Rev: TTG GCT GCC TGA GTC AAG TC	247
<i>Calcineurina</i>	<i>ppp3r1</i>	NM_024459.2	Fwd: ATCTGTCCCAGTGTC AACCG Rev: CCACAACGCCAGCCAAGATA	147
<i>Talina</i>	<i>tln1</i>	NM_011602.5	Fwd: ATGGGGACGTCCTTTCAAGC Rev: AGAACGCCCGAACTAAGCTG	133
<i>Distrofina</i>	<i>dnm</i>	NM_001314034.	Fwd: GCAAGCTTACTCCTCCGCTC Rev: AAGTGTTTTGGTCTCGTGG	100



<i>HSP90</i>	<i>hsp90AA</i>	NM_010480.5	Fwd: CGACGATGAGCAGTATGCCT	85
	1		Rev: TCCACGACCCATTGGTTCAC	
Sincoilina	<i>sync</i>	NM_023485.3	Fwd: ATGCTGCTGCCCAACTGAAAG	147
			Rev: CACCACTTCATCCCCCTCA	

### I. 3 Análisis estadístico.

Después de obtener los datos estadísticos por el método de  $\Delta\Delta\text{CT}$  estos fueron ingresados al software de Graph Prism 8.0 de GraphPad Software (California, Estados Unidos de Norte América), donde fueron analizados por el método de t de Student. El análisis estadístico de los parámetros geométricos de los núcleos se realizó por una regresión no lineal después de haber hecho análisis de distribución de los valores en parámetros establecidos aleatoriamente por medio de una campana de Gauss: por medio de la prueba de suma de los cuadrados F, todo esto se realizó en el software Graph Prism 8.0 de GraphPad Software (California, Estados Unidos de Norte América).

## J. RESULTADOS

### J.1. Efecto de la suplementación con biotina en músculo esquelético sobre:

#### J.1.1 La abundancia de mensajeros de los genes que codifican para las proteínas asociadas a desmina en el mecanismo de andamiaje.

Los transcritos escogidos para la medición de su expresión fueron aquellos que codifican para proteínas asociados a desmina, debido a que esta es una proteína central para las vías de señalización que mantienen la posición correcta de los organelos dentro del músculo esquelético cuya localización en estudios previos se ha visto modificada por la dieta suplementada con biotina usada en el modelo experimental de este trabajo.

Se analizó el mensajero de la  $\alpha$ -actinina 3 (*aactn*), isoforma de la proteína  $\alpha$ -actinina, característica del músculo esquelético, cuyo rol principal es la unión de activas para la formación de fibras de acción contráctil. El análisis de este mensajero, no reveló una diferencia significativa (Control=  $1.00 \pm 0.10$ ; Suplementado =  $1.05 \pm 0.10$ ;  $p > 0.05$ ) en su expresión entre el grupo suplementado comparado con el control, como se observa en la figura 16.

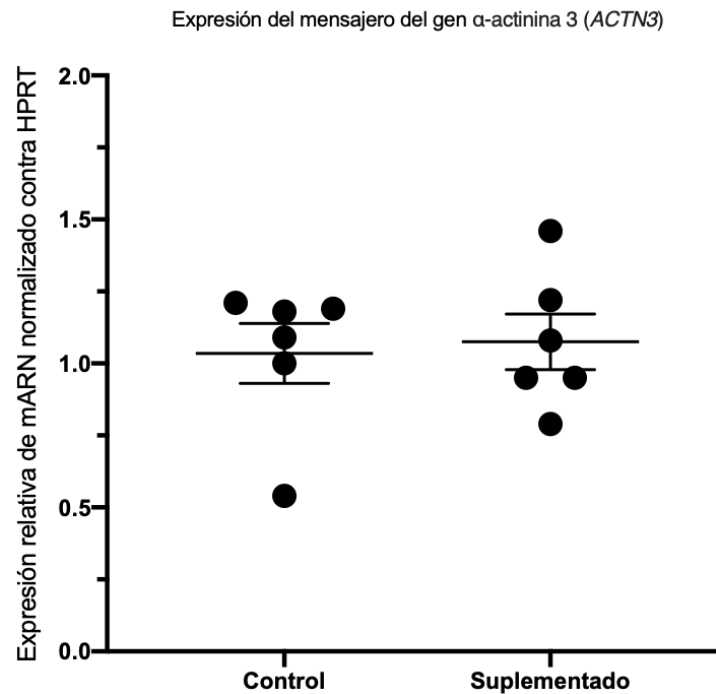


Figura 16. Expresión del mRNA de *Actn3*, en músculo esquelético de ratones control y suplementados con biotina por ocho semanas. Los puntos representan el doble delta CT de los datos obtenidos. La línea horizontal larga y las líneas pequeñas representan la media  $\pm$  error estándar. \*  $p \leq 0.05$ .

Entre las proteínas fundamentales para la contracción correcta del músculo esquelético, se encuentra la tropinina. Esta proteína se encarga de desplazar a

la tropomiosina, provocando parte del movimiento del músculo ante la excitación. Al estudiar la abundancia del mensajero de la Troponina (*Trop*), la cual participa en la contracción y relajación del núcleo, encontrando que en el grupo suplementado disminuye significativamente su expresión una vez con respecto al grupo control. (Control=  $1.06 \pm 0.11$ ; Suplementado =  $0.37 \pm 0.22$ ;  $p < 0.05$ ) como se muestra en la siguiente figura.

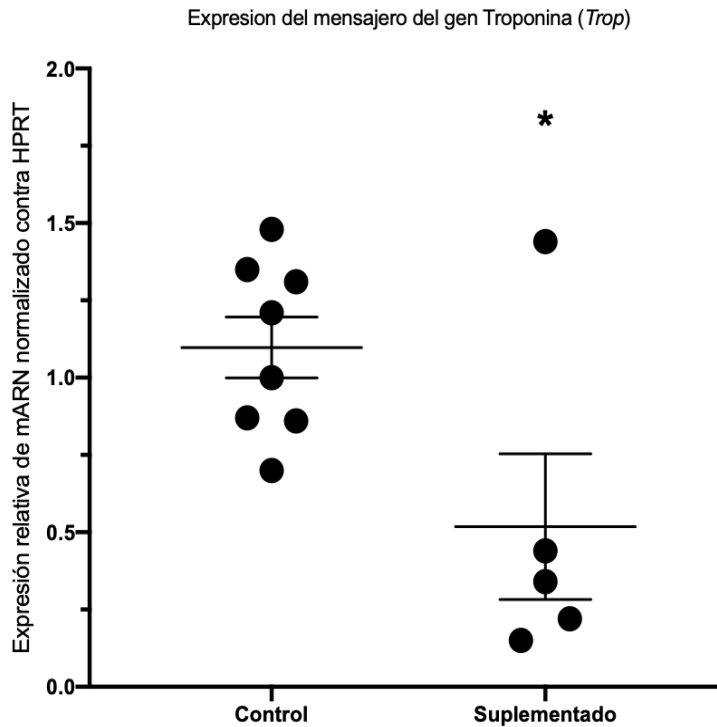


Figura 17. Expresión del mRNA de *Trop*, en músculo esquelético de ratones control y suplementados con biotina por ocho semanas. Los puntos representan el doble delta CT de los datos obtenidos. La línea horizontal larga y las líneas pequeñas representan la media  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$  )

### J.1.2 La abundancia de mensajeros de los genes que codifican para las proteínas asociadas al disco-Z y a las costámeras

Se midió la expresión del mensajero de vinculina *Vcl*, una proteína asociada al disco-Z y a las costámeras. Se encontró que el transcrito de VLNC no presenta una diferencia significativa (Control=  $1.00 \pm 0.10$ ; Suplementado =  $0.87 \pm 0.13$ ;  $p > 0.05$ ) en su expresión entre el grupo suplementado comparado con el control, como se observa en la figura 18.

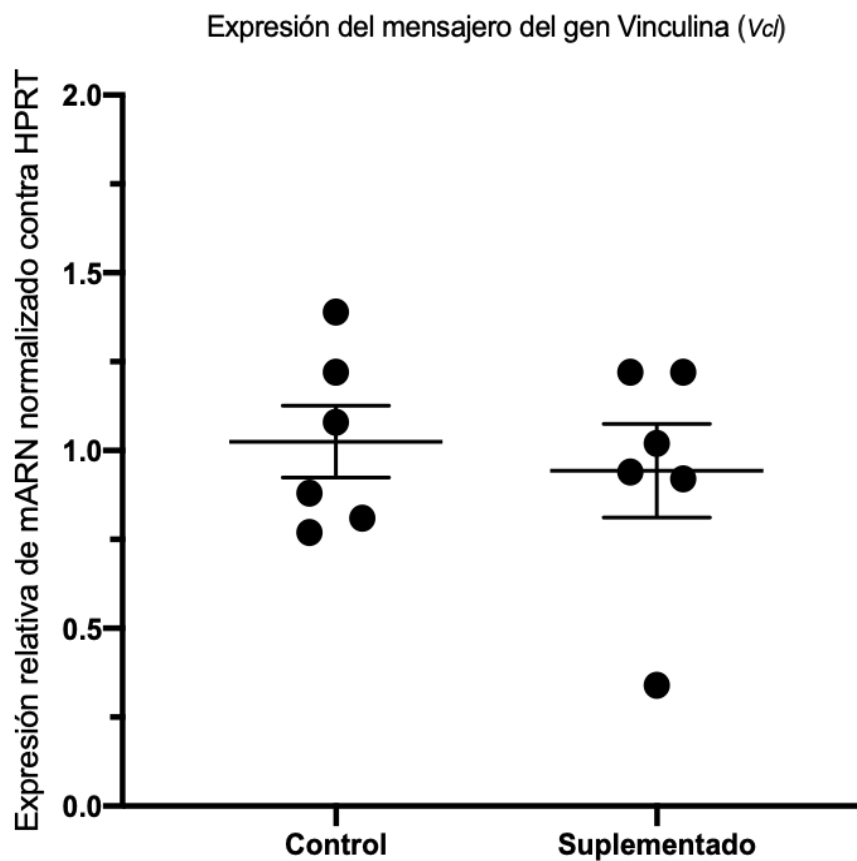


Figura 18. Expresión del mRNA de *Vcl* en músculo esquelético de ratones control y suplementados con biotina por ocho semanas. Los puntos representan el doble delta CT de los datos obtenidos. La línea horizontal larga y las líneas pequeñas representan la media  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$

Igualmente se analizó la expresión del mensajero de la distrofina (*Dmn*), proteína que conecta al citoesqueleto intracelular con la matriz extracelular del músculo estriado. Como se observa en la figura 19, no se encontraron diferencias significativas en la expresión del transcrito de este gen (Control=  $1.00 \pm 0.10$ ; Suplementado =  $1.12 \pm 0.17$ ;  $p > 0.05$ ) entre el grupo suplementado y control. Cabe destacar que este mensajero es uno de los principales genes de referencia para identificar las distrofias musculares, antes de que se presente el fenotipo.

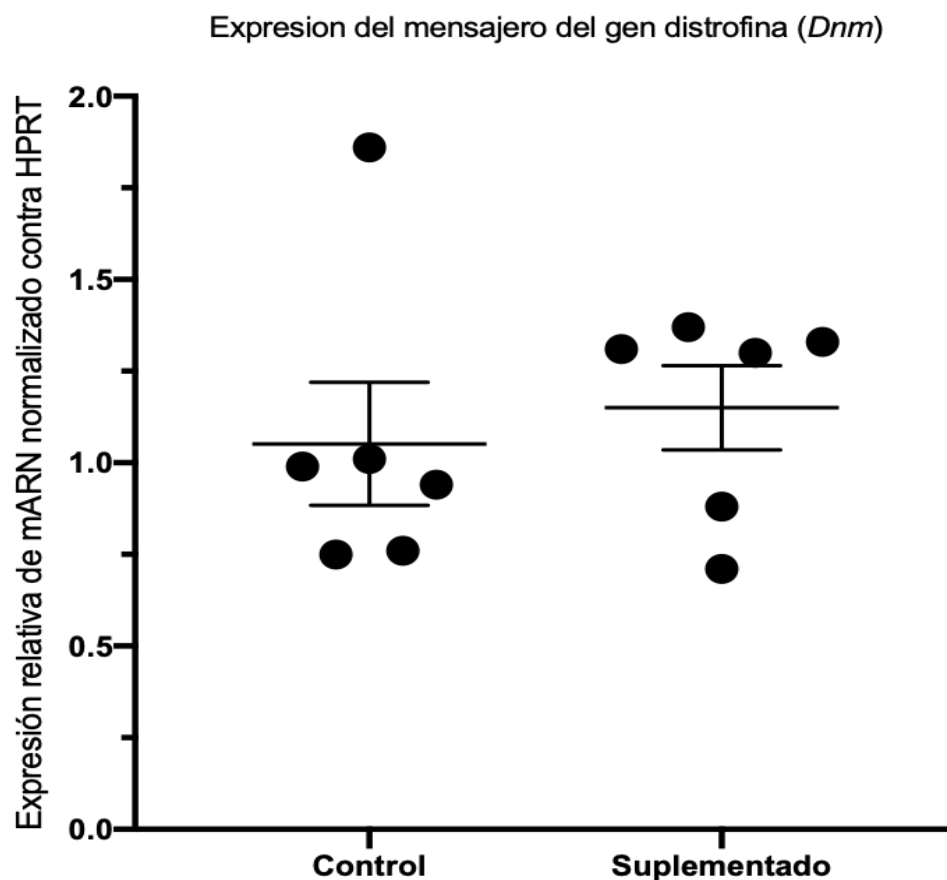


Figura 19. Expresión del mRNA de *Dnm*, en músculo esquelético de ratones control y suplementados con biotina por ocho semanas. Los puntos representan el doble delta CT de los datos obtenidos. La línea horizontal larga y las líneas pequeñas representan la media  $\pm$  error estándar. \*  $p \leq 0.05$

Se continuó con el análisis de mensajeros asociados al disco Z y a las costámeras. Estas dos partes integrales del sarcómero generan estructuras filamentosas para sostener el músculo entre el núcleo, la mitocondria y la matriz extracelular. Anteriormente, se encontró una desorganización en elementos asociados a desmina, así como una disminución de una de las proteínas relacionadas con la función, por lo cual es determinante analizar las proteínas que se asocian al andamiaje así como las medidas anteriormente.

Por lo anterior, se determinó el mensajero de talina, proteína asociada a vinculina, cuya expresión encontramos significativamente disminuida en los ratones que fueron suplementados con biotina (Fig 16). Por el contrario, el mensajero de Talina (Tln1), no se encontró significativamente modificado en el control (Control=  $1.00 \pm 0.19$ ; Suplementado =  $1.18 \pm 0.34$ ;  $p > 0.050$ ), como puede verse en la figura 20.

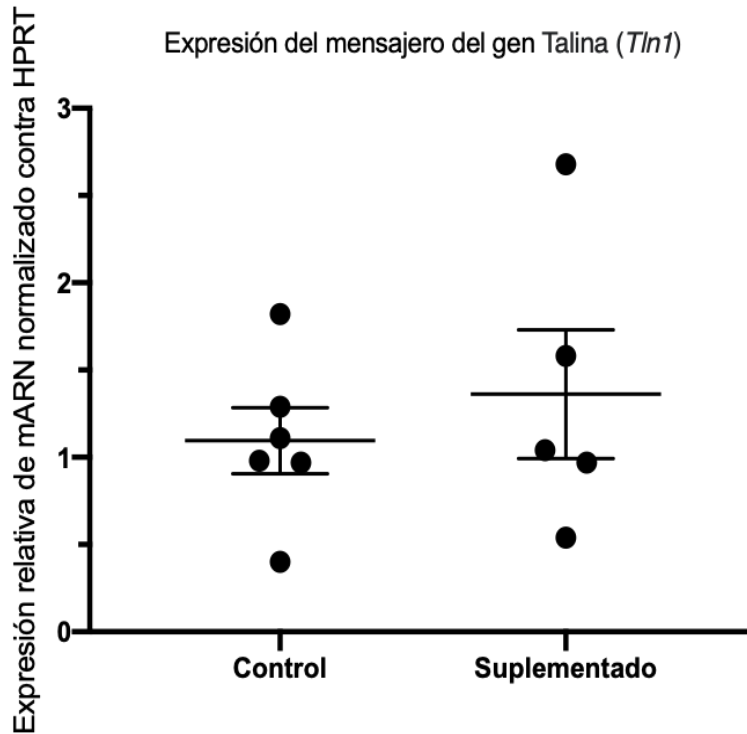


Figura 20. Expresión del mRNA de *Tln1*, en músculo esquelético de ratones control y suplementados con biotina por ocho semanas. Los puntos representan el doble delta CT de los datos obtenidos. La línea horizontal larga y las líneas pequeñas representan la media  $\pm$  error estándar. \*  $p \leq 0.05$

Dentro de las costámicas, un grupo de proteínas relevante es aquel de las integrinas, cuya función principal es la de participar en las adhesiones focales; así como el anclaje directo al citoesqueleto de actina, asociándose también a las uniones adherentes. Entre ellas se analizó la expresión del mensajero de integrina alfa 7 (*Int7*), propia del músculo esquelético, e importante para el anclaje correcto de la célula a la matriz extracelular, cuya deficiencia se ha asociado a distrofias musculares congénitas. Como se puede observar en la figura 21, los resultados muestran que la expresión de su mensajero se encuentra significativamente disminuida en el grupo suplementado con la vitamina, casi en un 70% en comparación del grupo control (Control=  $1.00 \pm 0.26$ ; Suplementado =  $0.34 \pm 0.13$ ;  $p < 0.05$ )

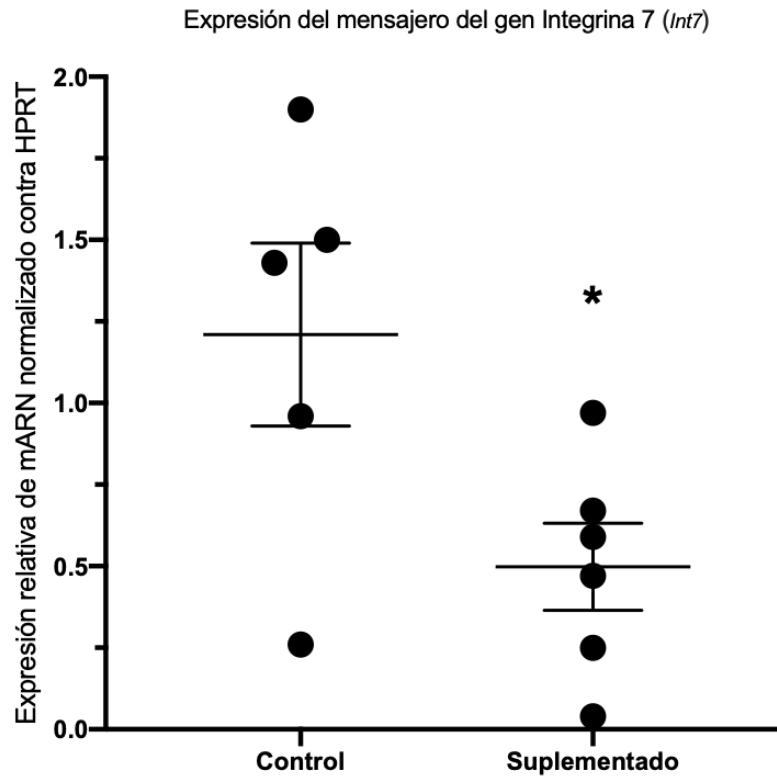


Figura 21. Expresión del mRNA de *Int7*, en músculo esquelético de ratones control y suplementados con biotina por ocho semanas. Los puntos representan el doble delta CT de los datos obtenidos. La línea horizontal larga y las líneas pequeñas representan la media  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$

Entre las proteínas pertenecientes a la banda Z, se encuentra la proteína sincoilina; la cual se caracteriza por la pertenecer al grupo de los filamentos intermedios a pesar de no formar filamentos a menos que esté asociada a desmina. En estudios que evalúan la relación entre ambas proteínas se ha encontrado una especie de retroalimentación entre ellas, aumentando una cuando disminuye la otra. Como puede verse en la figura 22, la expresión del transcrito de sincoilina se encontró casi cinco veces aumentada en el grupo suplementado con biotina por ocho semanas, con respecto al grupo control, sin encontrar una modificación en el mensajero de desmina.



Expresión del mensajero del gen Sincoilina (*Syn*)

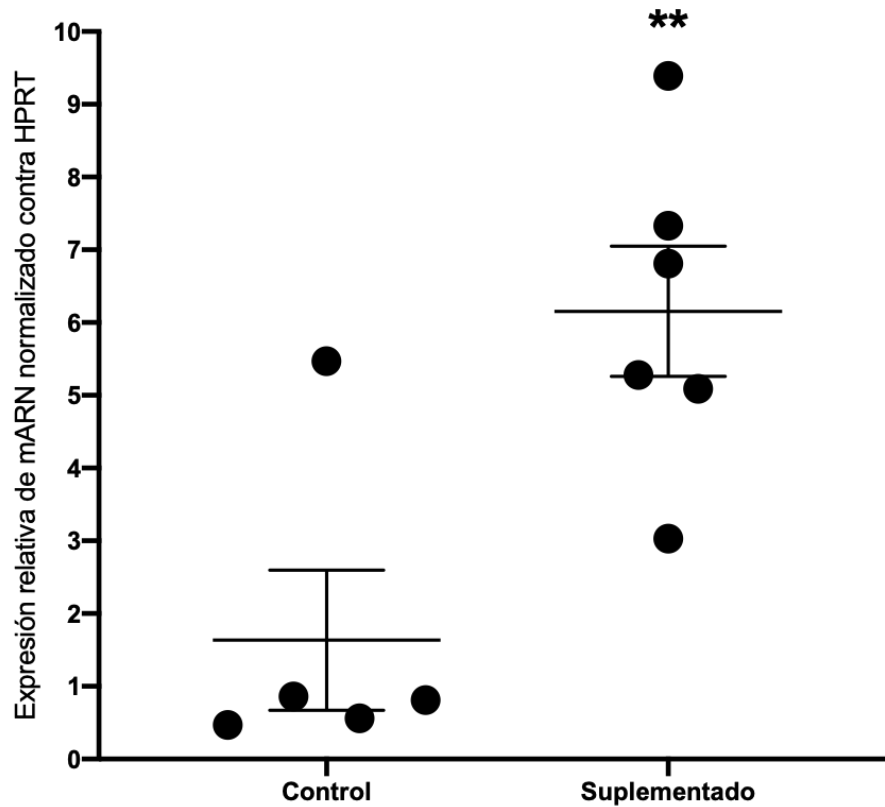


Figura 22. Expresión del mRNA de *Syn*, en músculo esquelético de ratones control y suplementados con biotina por ocho semanas. Los puntos representan el doble delta CT de los datos obtenidos. La línea horizontal larga y las líneas pequeñas representan la media  $\pm$  error estándar. \*\*  $p < 0.005$

Se analizó también el mensajero que codifica para la proteína de choque 90 (HSP90), la cual participa en la formación del sarcómero, la homeostasis proteica y los procesos inflamatorios dentro de varios tejidos, entre ellos el músculo esquelético. Después de ocho semanas de suplementación con biotina, no se encontró una diferencia significativa en la abundancia de este gen entre el grupo control y el grupo suplementado (Control=  $1.00 \pm 0.09$ ; Suplementado =  $0.91 \pm 0.17$ ;  $p > 0.05$ ).

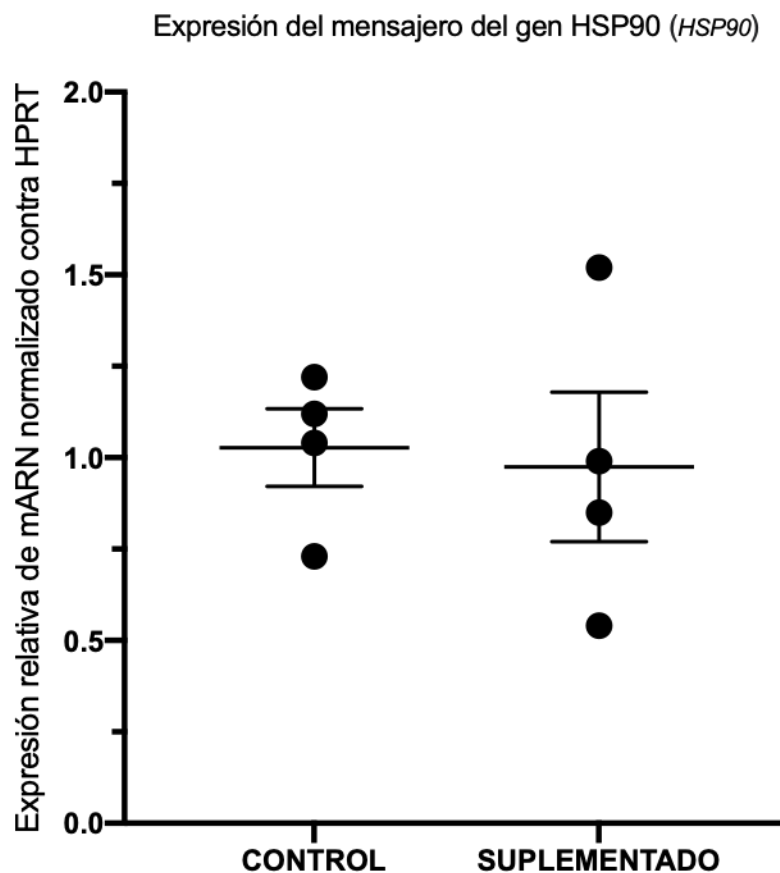


Figura 23. Expresión del mRNA de *Hsp90*, en músculo esquelético de ratones control y suplementados con biotina por ocho semanas. Los puntos representan el doble delta CT de los datos obtenidos. La línea horizontal larga y las líneas pequeñas representan la media  $\pm$  error estándar.

### J.1.3 La abundancia de mensajeros de las proteínas asociadas a núcleo.

En trabajos anteriores del laboratorio, donde se estudió la suplementación con biotina por ocho semanas; se encontró que los núcleos del grupo de estudio presentaban un aumento de tamaño y un cambio de posición con respecto al grupo control. Esto motivó al estudio de algunos de los mensajeros centrales para

la correcta posición y mantenimiento del núcleo en la periferia de la fibra del músculo esquelético.

Debido a que la nesprina es una proteína esencial en la asociación entre el núcleo y el citoesqueleto se analizó la expresión de su mensajero (*syne1*). Como se observa en la figura 24, no se encontró diferencia significativa (Control=  $1.00 \pm 0.04$ ; Suplementado =  $1.06 \pm 0.11$ ;  $p > 0.05$ ) en el grupo suplementado comparado con el grupo control

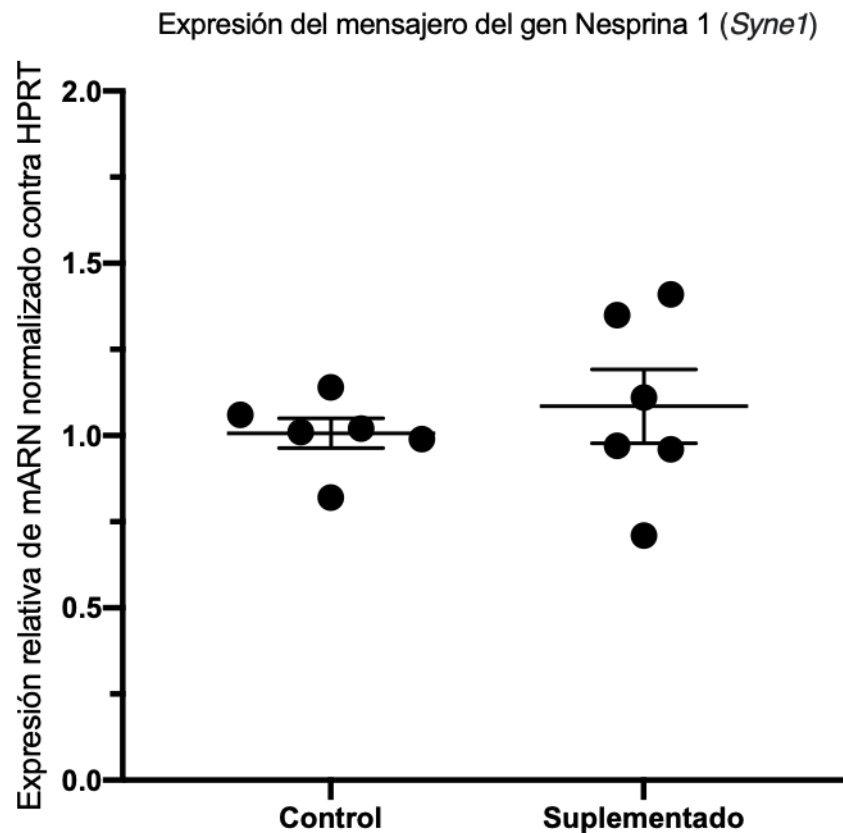


Figura 24. Expresión del mRNA de SYNE1, en músculo esquelético de ratones control y suplementados con biotina por ocho semanas. Los puntos representan el doble delta CT de los datos obtenidos. La línea horizontal larga y las líneas pequeñas representan la media  $\pm$  error estándar.

De igual manera, se analizó la expresión del mensajero de Emerina, una proteína asociada con la Nesprina 1 y la lámina nuclear, que es importante en la

organización de la forma y posición del núcleo muscular. Como se observa en la figura 25, la expresión de este mensajero no se ve modificada significativamente en el grupo que recibió la dieta suplementada con biotina (Control=  $1.00 \pm 0.07$ ; Suplementado =  $1.2 \pm 0.22$ ;  $p > 0.05$ ).

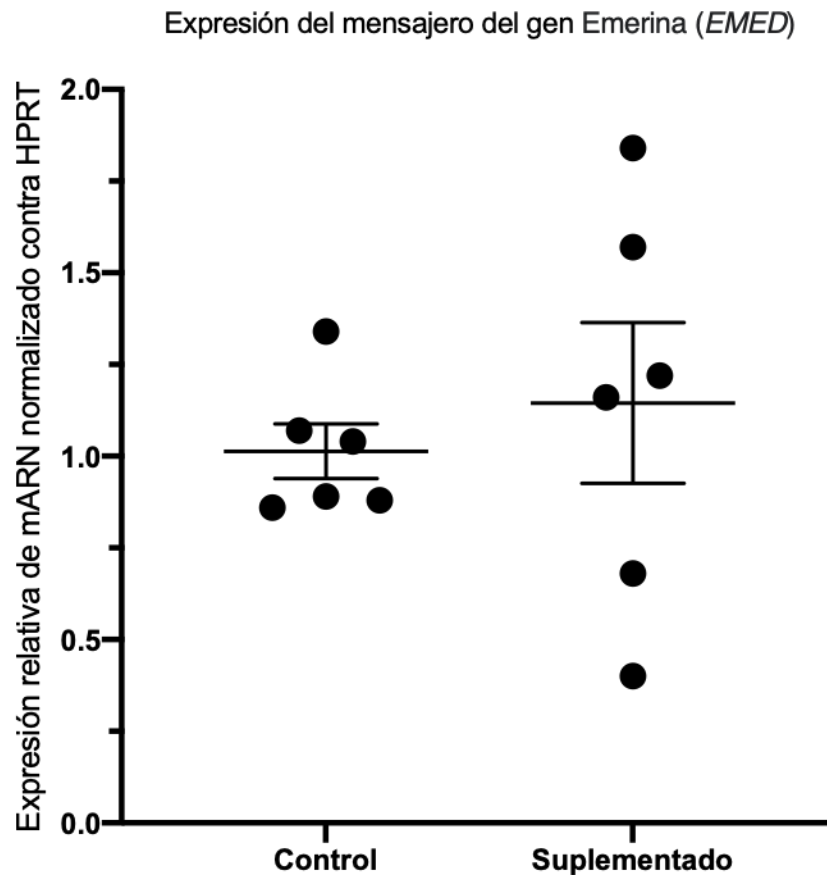


Figura 25. Expresión del mRNA de EMED1, en músculo esquelético de ratones control y suplementados con biotina por ocho semanas. Los puntos representan el doble delta CT de los datos obtenidos. La línea horizontal larga y las líneas pequeñas representan la media  $\pm$  error estándar.  $p > 0.05$ ).

Una proteína central para la función y el movimiento del núcleo de la célula son el grupo de las laminas. Está compuesta por una red de filamentos intermedios, que confieren estabilidad mecánica al núcleo de la célula. Se encontró un cambio en el mensajero que codifica para la proteína Lámina A (*lmnA*), una de las encargadas de mantener la forma y estructura del núcleo. Este RNA mensajero se encontró disminuido una vez en el grupo suplementado a comparación con el grupo control después de ocho semanas de suplementación con biotina (Control=  $1.00 \pm 0.12$ ; Suplementado =  $0.15 \pm 0.01$ ;  $p < 0.05$ ), lo cual se observa en la figura 26.

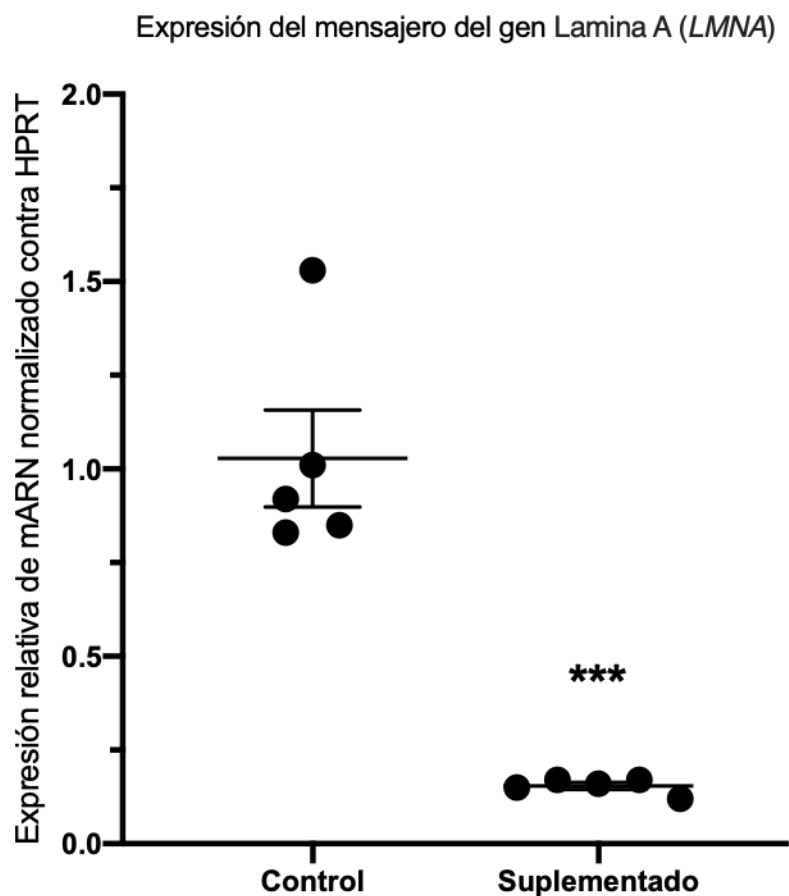


Figura 26. Expresión del mRNA de LMNA, en músculo esquelético de ratones control y suplementados con biotina por ocho semanas. Los puntos representan el doble delta CT de los datos obtenidos. La línea horizontal larga y las líneas pequeñas representan la media  $\pm$  error estándar. \*\*\*  $p \leq 0.0005$

En el análisis de mensajeros que codifican para proteínas asociadas a la lámina nuclear, también se encontró que el mensajero que codifica para la proteína dineína (la cual, junto con la cinesina, está asociada al movimiento de los microtúbulos para el mantenimiento del núcleo en su posición), se encontró disminuida significativamente en el grupo suplementado con biotina durante ocho semanas, con respecto al control (Control=  $1.00 \pm 0.07$ ; Suplementado =  $0.23 \pm 0.02$ ;  $p < 0.05$ ). Los resultados se encuentran representados en la figura 27.

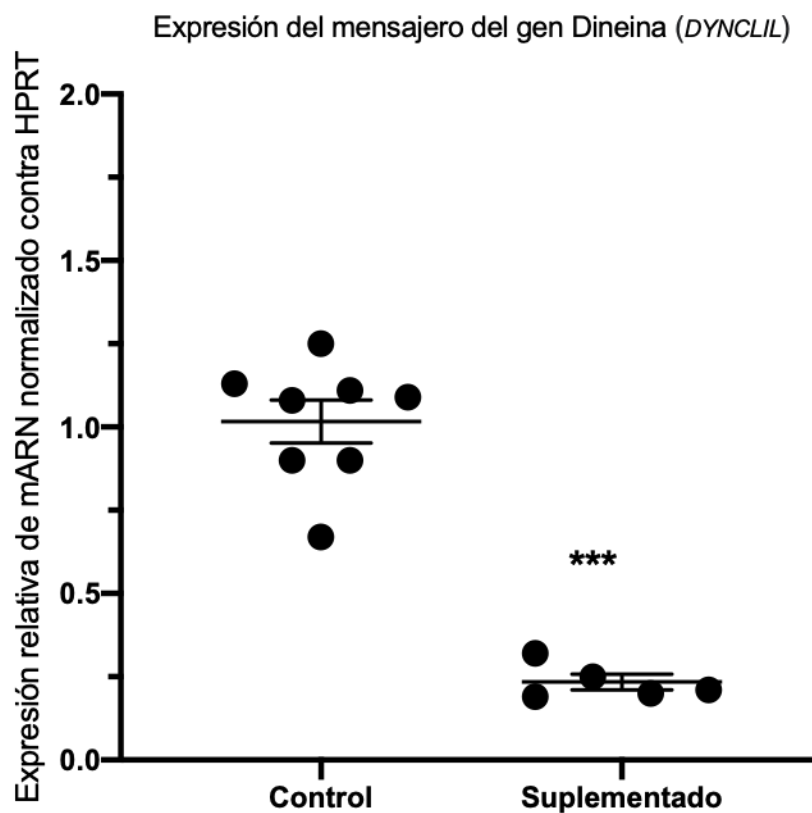


Figura 27. Expresión del mRNA de *Dynclil*, en músculo esquelético de ratones control y suplementados con biotina por ocho semanas. Los puntos representan el doble delta CT de los datos obtenidos. La línea horizontal larga y las líneas pequeñas representan la media  $\pm$  error estándar. \*\*\* $p < 0.0005$

Era importante estudiar también proteínas que traslocan entre el núcleo y la membrana, por lo cual se eligió la calcineurina; enzima dependiente de calcio que cataliza la desfosforilaciones. La calcineurina, además de pertenecer a la banda Z se ha encontrado en estudios recientes que puede translocar a núcleo y actuar como regulador transcripcional. Después de ocho semanas de suplementación con biotina observamos una diferencia significativa en este grupo con respecto al control, en un cincuenta por ciento menos (Control=  $1.00 \pm 0.32$ ; Suplementado =  $0.46 \pm 0.03$ ;  $p > 0.05$ ), representados en la figura 28.

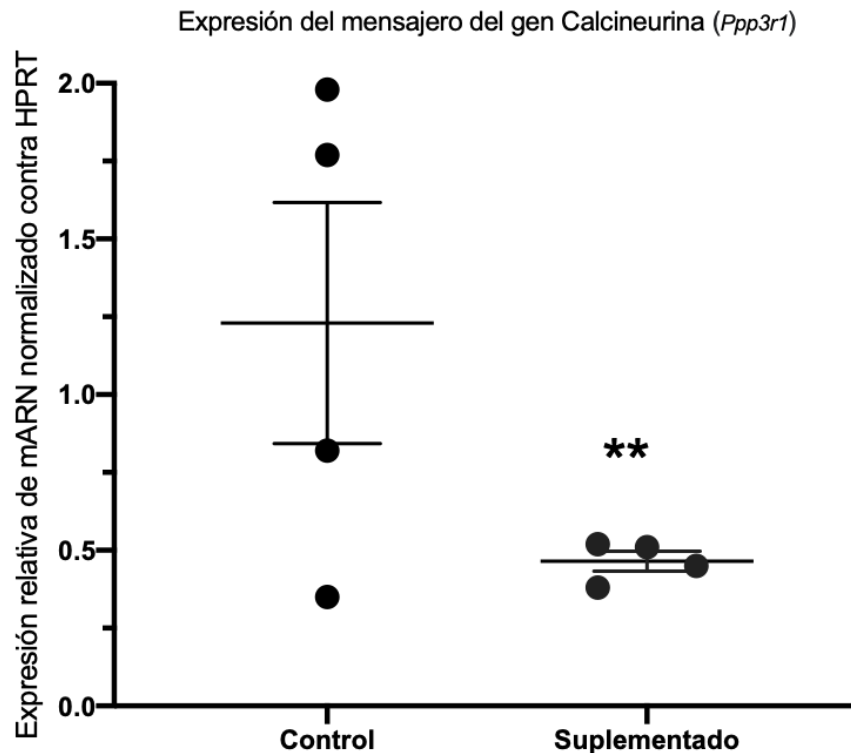


Figura 28. Expresión del mRNA de *Ppp3r1* en músculo esquelético de ratones control y suplementados con biotina por ocho semanas. Los puntos representan el doble delta CT de los datos obtenidos. La línea horizontal larga y las líneas pequeñas representan la media  $\pm$  error estándar. \*\*  $p \leq 0.005$

## RESUMEN DE RESULTADOS

En la figura 29, se muestran de forma gráfica los cambios encontrados en el RNA mensajero de diversas proteínas musculares a lo largo de este proyecto. Se encontró una desregulación general de los transcritos que codifican para las diferentes proteínas que mantienen la posición correcta del núcleo y la estructura del músculo esquelético al ser suplementados con biotina por ocho semanas. Es posible observar el aumento del transcrito en la costamera y la banda Z; mientras que hay una disminución en los transcritos de proteínas nucleares tan importantes como la Lamina A. Así mismo, en la tabla 2 se muestra la expresión relativa de los genes medidos durante este trabajo, comparando el grupo control contra el suplementado con biotina.



Expresión relativa de mRNA normalizado contra  
HPRT

Gen	Control	Suplementado
<i>α-actinina 3</i>	1	1.05
<i>Vinculina</i>	1	0.87
<i>Emerina 1</i>	1	1.02
<i>Lamina A</i>	1	0.15
<i>Nesprina 1</i>	1	1.06
<i>Dineina</i>	1	0.23
<i>Calcineurina</i>	1	0.46
<i>Talina</i>	1	1.18
<i>Distrofina</i>	1	1.12
<i>HSP90</i>	1	0.91
Sincoilina	1	5.8
Integrina 7	1	0.34
Troponina	1	0.24

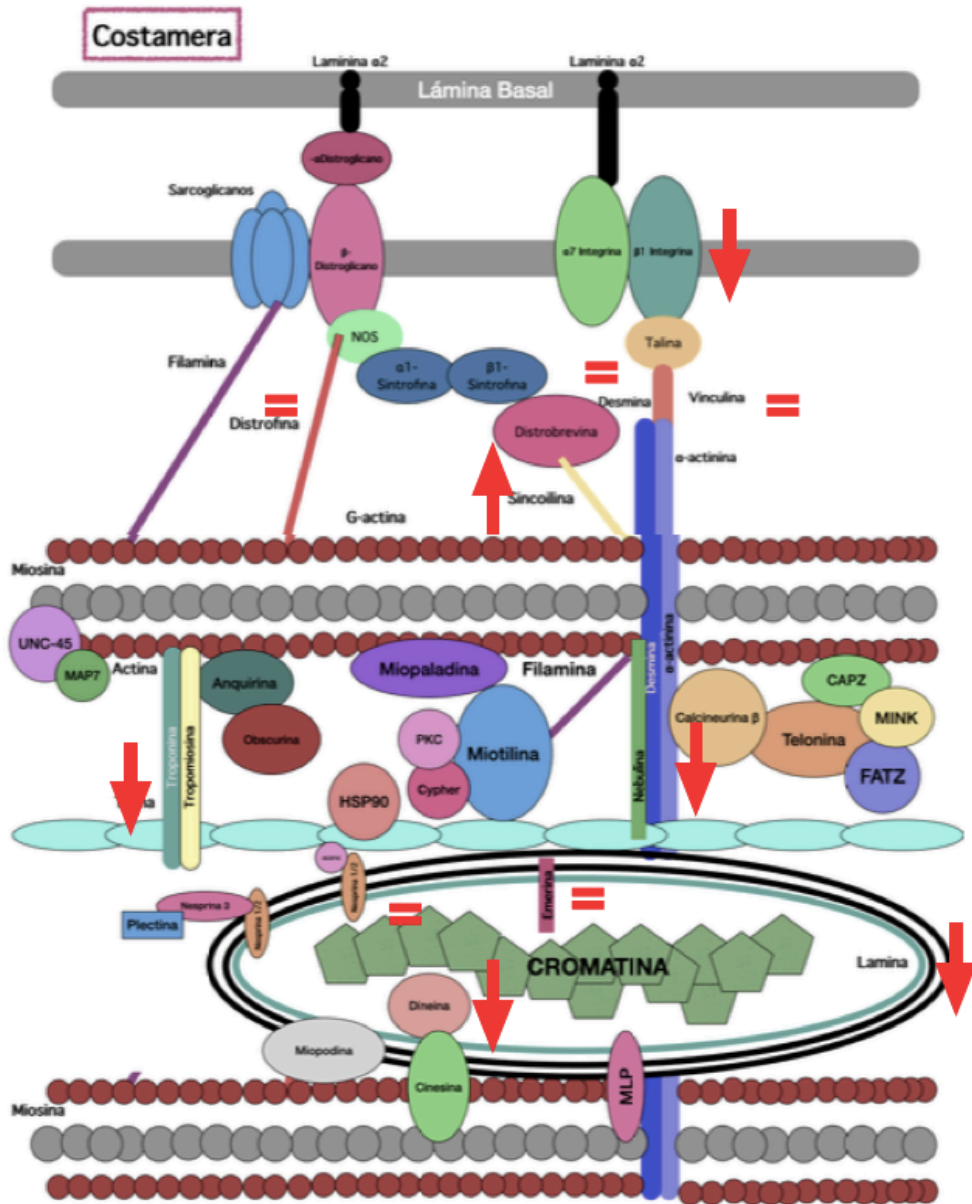


Figura 29. Diagrama representativo de vías de señalización participantes en la manutención de la estructura y organización del núcleo y la fibra muscular.

## DISCUSIÓN

En trabajos anteriores del laboratorio se ha demostrado que la suplementación con dosis farmacológicas de biotina produce cambios en la organización celular (Moreno Méndez et al. 2019; Pasten Hidalgo et al. 2019; Riverón Negrete et al.

2016; Lazo de la Vega Monroy et al. 2013). En el músculo se encontró que una dieta suplementada con biotina durante ocho semanas después del destete produce cambios estructurales en el músculo (Enríquez et al., manuscrito en preparación). Las modificaciones más notorias fueron el desplazamiento de los núcleos hacia el centro de la fibra y su cambio hacia una forma redondeada en vez de alargada (denominados grupos reactivos (Encino Pinto, Tesis de licenciatura, enero 2020), así como des-estructuración del disco Z ((Enríquez et al., manuscrito en preparación). En este proyecto se analizó tanto la expresión de proteínas relacionadas con el mantenimiento de la localización del núcleo como las que integran las costámeras y el disco-Z.

La mayor parte de los mensajeros estudiados en el presente trabajo que se encontraron modificados pertenecen a proteínas costámeras, las cuales tienen una función importante en el mantenimiento de la localización del núcleo. Río arriba en la estructura de las costámeras se encuentra la integrina cuyo transcrito se encontró aumentado. Igualmente se encontraron decrementos en los transcritos de lámina y desmina, dos proteínas que participan en las propiedades físicas del núcleo. Estos resultados son acordes con datos que dan origen a esta investigación que encontraron un aumento en el número de núcleos denominados “reactivos” en respuesta a la dieta suplementada con biotina (figura 13 y figura 14).

La lámina nuclear tiene como una de sus funciones el control de las propiedades físicas del núcleo (Chatzifrangkesku et al. 2020). El transcrito de la lámina estudiada en este trabajo codifica para la lámina A y C diferenciándolas solamente por un splicing. Se trata de una proteína con múltiples funciones que cumple un rol fundamental en la red de conexiones que mantienen la forma, integridad, preservación de los telómeros; el control de los complejos de poros nucleares; la replicación del DNA; la transcripción y la post-traducción; la regulación de la proliferación celular y la apoptosis (Carboni et al., 2013). La disminución del transcrito de esta proteína coincide con la deformación progresiva de los núcleos denominados como reactivos que produce la suplementación con biotina. Debido a las múltiples funciones de esta proteína, resulta interesante señalar que las

mutaciones en el gen LMNA puede sobrelaparse entre varios síndromes e incluso presentarse como alteraciones metabólicas sin alteraciones fenotípicas musculares visibles (Carboni et al., 2013), lo que hace el estudio de este RNA mensajero un tema de investigación a ahondar en futuros estudios dado que, su transcrito se ve significativamente disminuido sin alteraciones musculares visibles en los ratones suplementados con biotina por ocho semanas. También, resulta interesante señalar que defectos en la lámina A están asociados con cambios que se han visto se modifican con concentraciones farmacológicas de la biotina: Estudios de Chatzifrangkesku et al. 2020 y Earle et al, 2020 reportaron que mutaciones de la lámina (LMNA) llevan a la activación de ERK1/2, una proteína cuya forma activa se ha encontrado aumentada en respuesta a la dieta suplementada con biotina usada en este trabajo (Salazar-Anzures et al, 2021). También, se han encontrado relaciones entre las mutaciones de *LMNA* y el síndrome metabólico (Steinle et al, 2020), una condición metabólica en donde varios parámetros como la hipertrigliceridemia y la intolerancia a la glucosa se han visto modificados por concentraciones farmacológicas de biotina; razón por la cual la biotina se ha usado como coadyuvante en el tratamiento de la diabetes y el síndrome metabólico. Sin embargo, no acorde con las similitudes anteriores en las patologías relacionadas con mutaciones en las láminas, se encuentra elevada la proteína creatina cinasa (CK) en suero (Barraza-Flores et al. 2020), proteína cuya concentración en suero no se encuentra modificada en el grupo suplementado con biotina (datos no mostrados, (Enríquez et al., artículo en preparación).

La lámina tipo A conecta al citoesqueleto de actina, a través del complejo de unión núcleo-citoesqueleto, que comprende proteínas como la nesprina y SUN 1/2 (Chatzifrangkesku et al. 2020), las cuales al ser abatidas promueven la deformación del núcleo al invertir las fuerzas contráctiles de la envoltura nuclear. Se ha visto que, en el músculo esquelético, la deficiencia de nesprina y lámina A, provocan un desorden en el citoesqueleto perinuclear; sin embargo el análisis del RNAm de la nesprina (Figura 24) no se vio modificado en este estudio.

Otras proteínas muy importantes en la dinámica nuclear del músculo esquelético son los microtúbulos de fuerza motora (Foisner, 2002; Wilson et al., 2016). Entre estos destacan las proteínas cinesina y dineína, esta última tiene la función de participar directamente en la ruptura controlada de la envoltura nuclear durante la mitosis. Los resultados obtenidos de la presente investigación encontraron que después de ocho semanas de suplementación el mensajero de esta proteína disminuyó significativamente (figura 28), lo cual sugiere que la biotina podría afectar la mitosis en el músculo.

La emerina y la calcineurina participan en la regulación de la forma y tamaño del núcleo. Los datos de RT-PCR de estos dos transcritos tuvieron dispersiones importantes. En el caso de la emerina, el grupo suplementado mostro amplias variaciones (figura 25). En el caso de la calcineurina los valores obtenidos en el grupo control se encuentran muy dispersos, en tanto que los del grupo suplementado se agrupan por debajo de la mayoría de los valores del grupo control (figura 29), lo que sugiere que el transcrito. Resultará importante aumentar el número de casos, cosa que no fue posible en este trabajo por la suspensión de labores del bioterio debido al Covid-19 ya que el músculo esquelético, al igual que el estriado y cardíaco, usan el calcio como segundo mensajero para responder y adaptarse al estímulo ambiental. Además, de acuerdo con Bassel-Duby & Olson, 2003, la falta de calcineurina en modelos murinos promueve la inducción del fenotipo de fibras rápidas Tipo II, mientras que disminuye las fibras lentas Tipo I; por lo que, en caso de que encontrarse disminución en el transcrito de calcineurina la sería interesante estudiar el tipo de fibras que se encuentran en los ratones suplementados con biotina, considerando las repercusiones que el cambio de fibras tendría en el músculo esquelético.

Es importante señalar que cuando las fibras musculares se encuentran en proceso de regeneración, se observa la presencia de núcleos centrales, por lo que una posibilidad sería que estos núcleos centrales que se observan en los ratones del grupo suplementado con la vitamina fuese el resultado de músculos en

regeneración. Estudios acerca del RNA mensajero de sincoilina, muestran que, durante los procesos de regeneración este se encuentra aumentado (Wakayama et al, 2010), en tanto que en nuestros estudios este mismo mensajero se encuentra disminuido (figura 22), lo que podría deberse a la relación intrínseca de esta proteína con la desmina, que le sirve de andamiaje para formar filamentos, la cual presenta una falta de organización estructural, al analizarla mediante estudios de inmunohistoquímica (artículo en preparación). También podría significar que la fibra muscular está comenzando un proceso de degradación o distrofia, en un estadio muy temprano al no mostrarse esto en los marcadores de daño o toxicidad. Por otro lado, ya que los núcleos se encuentran preferentemente localizados cerca de los vasos sanguíneos, un punto importante sería analizar si la suplementación con biotina mantiene o modifica la concordancia de la localización entre estas dos estructuras.

Se encontró un aumento significativo del mensajero de sincoilina. En estudios previos de inmunofluorescencia realizados en el laboratorio se encontró que la desmina se muestra deslocalizada, dado que se ha sugerido que la disrupción de los filamentos de desmina puede ser el resultado de la perturbación de la relación en la cantidad entre la desmina y sincoilina (Bronw et al. 2005); sería importante hacer estudios de inmunofluorescencia de esta última para determinar cómo se ve afectada la interacción de éstas en respuesta a la suplementación con biotina.

Con respecto a las proteínas del disco Z, se vio un aumento en la troponina que podría comprometer la organización correcta del sarcómero y con ello la movilidad muscular. Estos cambios, que coinciden con las alteraciones en la banda z de muchas patologías, pueden ser vistos en la ultra-estructura modificada del músculo esquelético después de ocho semanas de suplementación con biotina. La sincoilina es una proteína poco estudiada, participante en el complejo de proteínas asociadas a distrofina; al que se le ha atribuido un rol en estabilizar el sarcolema. Se ha encontrado que la sincoilina se acumula anormalmente en áreas específicas cuando ocurren re-arreglos musculares de gran magnitud, especialmente en ausencia de distrofina o desmina (Bronw et al. 2005); este fenómeno puede

observarse en la suplementación con biotina después de ocho semanas tanto en la expresión del mensajero de sincoilina (Figura 22), como en las imágenes obtenidas por microscopio electrónica ((Enríquez et al., artículo en preparación).

Respecto a la disminución significativa en la integrina 7 (Figura 21), proteína vital para el correcto funcionamiento de las costámeras, que forma parte de del sistema vinculina-integrina-talina, el cual ancla el sarcolema con la línea Z, sirviendo un propósito doble: unir la Matriz extra-celular y permitir la transmisión bi-direccional de información (Anastasi et al. 2008), El estudio de esta proteína en pacientes adultos con polineuropatías motoras sensitivas, se encontró que los niveles reducidos de distrofina, vinculina y talina se desregulan para mantener las capacidades mecánicas y de transacción del músculo, por lo que será importante prolongar la administración de la dieta suplementada con biotina más tiempo para observar si los ratones presentan signos de atrofia o de degeneración neuromotora.

Una incógnita que surge de este trabajo es porqué, a pesar de la modificación morfológica y de la expresión de genes observada con la administración de la dieta suplementada con biotina, la locomoción de estos ratones no parece dañarse. Una explicación es que las  $\alpha$ -actininas pueden sustituir sus funciones con otras proteínas como la vinculina y la miotilina, esto es una adaptación evolutiva de proteínas no-musculares pre-existentes involucradas en el control de la forma celular o el movimiento de la misma (Takada et al, 2001). Este tipo de relaciones entre las proteínas podría explicar el porqué de la falta de concordancia entre la estructura modificada y el daño motor en los ratones suplementados.

En un estudio piloto reciente, el 90% de pacientes con esclerosis múltiple han encontrado que la suplementación de biotina en dosis farmacológicas de 100 a 300 mg por día durante nueve meses, mejoraron clínicamente en varios niveles (Evans et al. 2018). En otro estudio realizado en 154 pacientes de este padecimiento durante 12 meses comparando el tratamiento con 100 mg de biotina al día contra un placebo, encontró que 12.6 % de los pacientes que consumieron

biotina mejoraron en su habilidad motora (Evans et al. 2018). No existen estudios investigando el funcionamiento de la biotina a nivel celular en el músculo esquelético en relación a esta enfermedad, sin embargo, con base en nuestros resultados resulta difícil explicar la mejoría observada en los pacientes con esclerosis múltiple.

En resumen, los resultados de este estudio encontraron que la ingesta de la dieta suplementada con biotina modificó en el músculo la expresión de diversas proteínas estructurales identificando por primera vez los mecanismos moleculares participantes en el efecto de concentraciones farmacológicas de biotina sobre el tejido muscular. Estos hallazgos aunados a los cambios histológicos observados en nuestras investigaciones previas, pone en alerta sobre el daño potencial que pueden causar los suplementos de biotina, llamando a una ponderación acerca de los riesgos y beneficios de usar esta vitamina como coadyudante en ciertas patologías, ya que el músculo no es el único tejido cuya organización celular se modifica con la suplementación con biotina, principalmente porque no existen regulaciones sobre las concentraciones farmacológicas de biotina en los suplementos que se encuentran en venta libre.

## **L. CONCLUSIONES.**

La concentración farmacológica de biotina produce cambios en la estructura de andamiaje alrededor del núcleo celular de la fibra muscular, que están asociadas con la modificación de mensajeros de proteínas que participan en ello:

1) El estudio de la abundancia de mensajeros de los genes que codifican para las proteínas asociadas a desmina en el mecanismo de andamiaje encontró que la troponina, se encontró disminuida.

2) El análisis de la abundancia de mensajeros de los genes que codifican para las proteínas asociadas al disco-Z y a las costámeras, reveló que la integrina disminuyó. La sincoilina, proteína que se asocia directamente a la desmina



aumentó la expresión de su transcrito lo que podría apoyar la deslocalización celular de la desmina encontrada en los estudios de inmunofluorescencia

3) Respecto a la abundancia de mensajeros de los genes asociados al ensamblaje de la lámina nuclear, se encontró que después de ocho semanas de suplementación con biotina los mensajeros de lamina nuclear y dineína se encuentran disminuidos con respecto al grupo control, esto es correspondiente con el encuentro de un porcentaje de núcleos en el centro de la fibra, en vez de en su posición canónica en la periferia

#### **M. PERSPECTIVAS.**

- Analizar la abundancia de las proteínas de los mensajeros que se vieron alterados en los análisis de RT-qPCR en este trabajo.
- Realizar estudios de inmunofluorescencia para determinar cómo repercute la modificación de los mensajeros que se vieron alterados en los análisis de RT-qPCR en este trabajo en la estructura muscular.
- Análisis de inmunohistoquímica de biotilación para determinar si este mecanismo participa en los cambios de la estructura muscular. Determinación de la identidad de las proteínas biotiladas mediante secuenciación..
- Análisis de los efectos de la suplementación con biotina a un plazo mayor a ocho semanas.
- Análisis de la respuesta a retos de ejercicio después de la suplementación con biotina.

## N. REFERENCIAS.

- [1] Albarracin, C., Fuqua, B., Geohas, J., Finch, M. & Komorowski. (2005). Improvement in glycemic control, lipids and insulin sensitivity with the combination of chromium picolinate and biotin in type 2 diabetes mellitus. J. Diabetes care. 54. A428.
- [2] Albarracin, C. A., Fuqua, B. C., Evans, J. L. & Goldfine, I. D. (2007). Combination of chromium and biotin improves coronary risk factors in hypercholesterolemic type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blind randomized clinical trial. J Cardiometab Syndr. 2(2):91-7
- [3] Aguilera-Mendez, A. & Fernandez-Mejia, C. (2013). The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. Biofactors. 38. 387-94.
- [4] Anastasi, G., Cutroneo, G., Santoro, G., Arco, A., Rizzo, G., Bramanti, P., Rinaldi, C., Sidoti, A., Amato, A., & Favaloro, A. (2008). Costameric proteins in human skeletal muscle during muscular inactivity. Journal of anatomy, 213(3), 284–295. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00921.x>
- [5] Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2003). Role of calcineurin in striated muscle: development, adaptation, and disease. Biochemical and biophysical research communications, 311(4), 1133–1141. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.020>
- [6] Barraza-Flores P, Bates CR, Oliveira-Santos A and Burkin DJ (2020) Laminin and Integrin in LAMA2-Related Congenital Muscular Dystrophy: From Disease to Therapeutics. Front. Mol. Neurosci. 13:1. doi: 10.3389/fnmol.2020.00001.
- [7] Baez-Saldana, A. et al. (2009). Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system. Steroids. 74. 863-9. 8.
- [8] Beckett, D. (2018). Specificity and selectivity in post-translational biotin addition. Biochemical Society Transactions, 46(6), 1577–1591. <https://doi.org/10.1042/BST20180425>
- [9] Beserra, S. R., Souza, F. I. S., Sarni, R. O. S., & Pereira, M. M. de M. (2020). Association Between Low Vitamin D Levels and the Greater Impact of Fibromyalgia. Journal of Clinical Medicine Research, 12(7), 436–442. <https://doi.org/10.14740/jocmr4136>
- [10] Bischoff, R. (1990). Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers. Development, 109(4), 943–952. <https://doi.org/10.1242/dev.109.4.943>

- [11] Blaauw, B., Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2013). Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Comprehensive Physiology*, 3(4), 1645–1687. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130009>.
- [12] Boppart, M. D., & Mahmassani, Z. S. (2019). Integrin signaling: Linking mechanical stimulation to skeletal muscle hypertrophy. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 317(4), C629–C641. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00009.2019>
- [13] Bogusiewicz A, Stratton S. L, Ellison D. A, Mock D. M. (2008) Biotin accounts for less than half of all biotin and biotin metabolites in the cerebrospinal fluid of children. *Am J Clin Nutr* 88, 1291-1296.
- [14] Brown, S. C., Torelli, S., Ugo, I., De Biasia, F., Howman, E. V., Poon, E., Britton, J., Davies, K. E., & Muntoni, F. (2005). Syncoilin upregulation in muscle of patients with neuromuscular disease. *Muscle and Nerve*, 32(6), 715–725. <https://doi.org/10.1002/mus.20431>
- [15] Brunn, A. (2018). The complex pericentriolar material 1 protein allows differentiation between myonuclei and nuclei of satellite cells of the skeletal muscle. *Acta Physiologica*, 223(4), 0–1. <https://doi.org/10.1111/apha.13103>
- [16] Cadot, B., Gache, V., & Gomes, E. R. (2015). Moving and positioning the nucleus in skeletal muscle - one step at a time. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 6(5), 373–381. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1090073>
- [17] 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.
- [18] Carboni, N., Mateddu, A., Marrosu, G., Cocco, E., & Marrosu, M. G. (2013). Genetic and clinical characteristics of skeletal and cardiac muscle in patients with lamin A/C gene mutations. *Muscle & nerve*, 48(2), 161–170. <https://doi.org/10.1002/mus.23827>
- [19] Chargé, S. B. P., & Rudnicki, M. A. (2004). Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiological Reviews*, 84(1), 209–238. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2003>
- [20] Chapman, M. A., Zhang, J., Banerjee, I., Guo, L. T., Zhang, Z., Shelton, G. D., Ouyang, K., Lieber, R. L., & Chen, J. (2014). Disruption of both nesprin 1 and desmin results in nuclear anchorage defects and fibrosis in skeletal muscle. *Human Molecular Genetics*, 23(22), 5879–5892. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu310>

- [21] Chatzifrangkeskou, M., Kah, D., Lange, J. R., Goldmann, W. H., & Muchir, A. (2020). Mutated lamin A modulates stiffness in muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 529(3), 861–867. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.102>
- [22] Couloume, L., Barbin, L., Leray, E., Wiertelowski, S., Le Page, E., Kerbrat, A., Ory, S., Le Port, D., Edan, G., Laplaud, D. A., & Michel, L. (2020). High-dose biotin in progressive multiple sclerosis: A prospective study of 178 patients in routine clinical practice. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(14), 1898–1906. <https://doi.org/10.1177/1352458519894713>
- [23] Dakshinamurti, K. J. (2005). Biotin--a regulator of gene expression. *Nutr Biochem*.16. 419-23.
- [24] De La Vega LA, Stockert RJ. (2000). Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*. Dec;279(6):C2037-42.
- [25] Dupuis, L., Fergani, A., Braunstein, K. E., Eschbach, J., Holl, N., Rene, F., Gonzalez De Aguilar, J. L., Zoerner, B., Schwalenstocker, B., Ludolph, A. C., & Loeffler, J. P. (2009). Mice with a mutation in the dynein heavy chain 1 gene display sensory neuropathy but lack motor neuron disease. *Experimental neurology*, 215(1), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.09.019>
- [26] Earle, A. J., Kirby, T. J., Fedorchak, G. R., Isermann, P., Patel, J., Iruvanti, S., Moore, S. A., Bonne, G., Wallrath, L. L., & Lammerding, J. (2020). Mutant lamins cause nuclear envelope rupture and DNA damage in skeletal muscle cells. *Nature materials*, 19(4), 464–473. <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0563-5>
- [27] Evans, E., Piccio, L., & Cross, A. H. (2018). Use of vitamins and dietary supplements by patients with multiple sclerosis a review. *JAMA Neurology*, 75(8), 1013–1021. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.0611>
- [28] Fernandez-Mejia, C. (2005). Pharmacological effects of biotin. *J Nutr Biochem*. 16. 424-7.
- [29] Frontera W. R. And Ochala J. (2015) Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int* 96:183-195.
- [30] Foisner, R. (2003). Cell cycle dynamics of the nuclear envelope. In *TheScientificWorldJournal* (Vol. 3, pp. 1–20). <https://doi.org/10.1100/tsw.2003.06>

- [31] Gravel, R. A., & Narang, M. A. (2005). Molecular genetics of biotin metabolism: Old vitamin, new science. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(7), 428–431. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.03.020>
- [32] Gilbreath HR, Castro D, Iannaccone ST. Congenital myopathies and muscular dystrophies. *Neurol Clin*. 2014;32(3):689-viii. doi:10.1016/j.ncl.2014.04.006.
- [33] Goldmann, W. H. (2018). Intermediate filaments and cellular mechanics. *Cell Biology International*, 42(2), 132–138. <https://doi.org/10.1002/cbin.10879>
- [34] Gundersen, K. (2016). Muscle memory and a new cellular model for muscle atrophy and hypertrophy. *Journal of Experimental Biology*, 219(2), 235–242. <https://doi.org/10.1242/jeb.124495>.
- [35] Gundersen, K., & Bruusgaard, J. C. (2008). Nuclear domains during muscle atrophy: Nuclei lost or paradigm lost? *In Journal of Physiology* (Vol. 586, Issue 11, pp. 2675–2681). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.154369>
- [36] Hall, M. N., Corbett, A. H., & Pavlath, G. K. (2011). Regulation of nucleocytoplasmic transport in skeletal muscle. *Current Topics in Developmental Biology*, 96, 273–302. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385940-2.00010-3>
- [37] Hall, Z. W., & Ralston, E. (1989). Nuclear Domains in Muscle Cells. *In Cell* (Vol. 59).
- [38] 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.
- [39]Heller, SA, Shih, R, Kalra, R, Kang, PB. Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2020; 61: 436– 448. <https://doi.org/10.1002/mus.26782>
- [40] Hemmati, M., Babaei, H., & Abdolsalehei, M. (2013). Survey of the effect of biotin on glycemic control and plasma lipid concentrations in type 1 diabetic patients in kermanshah in iran (2008-2009). *Oman medical journal*, 28(3), 195–198. <https://doi.org/10.5001/omj.2013.53>
- [41] Henderson C.A, Gomez C.G, Novak S.M, Mi-Mi L, Gregorio C.G (2018) Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Compr Physiol* 7(3); 891-944
- [42] Hinkle, E. R., Wiedner, H. J., Black, A. J., & Giudice, J. (2019). RNA processing in skeletal muscle biology and disease. *Transcription*, 10(1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/21541264.2018.1558677>

- [43] Houweling, P. J., Berman, Y. D., Turner, N., Quinlan, K., Seto, J. T., Yang, N., Lek, M., Macarthur, D. G., Cooney, G., & North, K. N. (2017). Exploring the relationship between  $\alpha$ -actinin-3 deficiency and obesity in mice and humans. *International journal of obesity* (2005), 41(7), 1154–1157. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.72>
- [44] 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.
- [45] Ingaramo, M., & Beckett, D. (2011). Biotinylation, a post-translational modification controlled by the rate of protein-protein association. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13071–13078. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.183624>
- [46] Joshi K.B, Venkatesh V, Verma S. (2010) Biotin interaction with human erythrocytes: contact on membrane surface and formation of self-assembled fibrous structures. *Chem. Commun.*, 46, 3890-3892
- [47] Kimura Y, Kashima K, Daa T, Kondo Y, Yada K, Sasak A, Matsumoto T, Kitano S, Kubo N, Yokohama S. (2005) Biotin-rich intranuclear inclusions in module-lacking adenocarcinoma of the gallbladder: a new category of “neoplastic/non-morular” lesions. *Virchow Arc* 446:194-199.
- [48] Kirby, T. J., & Lammerding, J. (2018). Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor. *Nature Cell Biology*, 20(4), 373–381. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0038-y>
- [49] Koch A.J, Holaska J.M, (2014) Emerin in health and disease. *HHS Public Access. Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.12.008>.
- [50] Komiya Y, Sawano S, Mashima D, Ichitsubo R, Nakamura M, Tatsumi R, Ikeuchi Y, Mizunoya W. Mouse soleus (slow) muscle shows greater intramyocellular lipid droplet accumulation than EDL (fast) muscle: fiber type-specific analysis. *J Muscle Res Cell Motil.* 2017 Apr;38(2):163-173. doi: 10.1007/s10974-017-9468-6. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28281032.
- [51] Lagalice, L., Pichon, J., Gougeon, E., Soussi, S., Deniaud, J., Ledevin, M., Maurier, V., Leroux, I., Durand, S., Ciron, C., Franzoso, F., Dubreil, L., Larcher, T., Rouger, K., & Colle, M. A. (2018). Satellite cells fail to contribute to muscle repair but are functional in Pompe disease (glycogenosis type II). *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0609-y>

- [52] Lazarides E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*. 17;283(5744):249-256.
- [53] Lazo de la Vega-Monroy, M. L., Larrieta, E., German, M. S., Baez-Saldana, A. & Fernandez-Mejia.(2013). Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *C. J Nutr Biochem*. 24. 169-77.
- [54] Lek, M., & North, K. N. (2010). Are biological sensors modulated by their structural scaffolds? The role of the structural muscle proteins  $\alpha$ -actinin-2 and  $\alpha$ -actinin-3 as modulators of biological sensors. In *FEBS Letters* (Vol. 584, Issue 14, pp. 2974–2980). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.059>
- [55] Lewis B, Rathman S, McMahon R. Dietary biotin intake modulates the consorcio of free and protein-bound biotin in rat liver. *J Nutr* 2001;131:2310– 5.
- [56] Lotierzo, M., Tse Sum Bui, B., Florentin, D., Escalettes, F., & Marquet, A. (2005). Biotin synthase mechanism: An overview. *Biochemical Society Transactions*, 33(4), 820–823. <https://doi.org/10.1042/BST0330820>.
- [57] Mahnart A, Windner S, Baylies, M, Mogliner A. (2018). Mechanical positioning of multiple nuclei in muscle cells. *PLoSComputBiol* 14(6). 1-25.
- [58] Mathes, S., Vanmunster, M., Bloch, W., & Suhr, F. (2019). Evidence for skeletal muscle fiber type-specific expressions of mechanosensors. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 76, Issue 15, pp. 2987–3004). <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03026-3>
- [59] Marshall, M. W., Haubrich, M., Washington, V. A., Chang, M.-L. W., Young, C. W., & Wheeler, M. A. (1976). Biotin Status and Lipid Metabolism in Adult Obese Hypercholesterolemic Inbred Rats. *Nutrition and Metabolism*, 20(1), 41–61. <http://www.jstor.org/stable/45098639>
- [60] Marshall MW, Kliman PG, Washington VA, Mackin JF, Weinland BT. Effects of biotin on lipids and other constituents of plasma of healthy men and women. *Artery*. 1980;7(4):330-51. PMID: 7011260.
- [61] Mayer, U. (2003). Integrins: Redundant or important players in skeletal muscle? *Journal of Biological Chemistry*, 278(17), 14587–14590. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200022200>

- [62] Reddi A, DeAngelis B, Frank O, Lasker N, Baker H. Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci.* 1988;42(13):1323-30. doi: 10.1016/0024-3205(88)90226-3. PMID: 3280936.
- [63] Romeu Montenegro, K., Carlessi, R., Cruzat, V., & Newsholme, P. (2019). Effects of vitamin D on primary human skeletal muscle cell proliferation, differentiation, protein synthesis and bioenergetics. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 193(July), 105423. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105423>
- [64] 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. <https://doi.org/10.1002/biof.1480>
- [65] Moorwood, C. (2008). Syncoilin, an intermediate filament-like protein linked to the dystrophin associated protein complex in skeletal muscle. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(19), 2957–2963. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8306-9>
- [66] Munday MR, Hemingway CJ. The regulation of acetyl-CoA carboxylase- a potential target for the action of hypolipidemic agents. *Adv Enzyme Regul* 1999;39:205–34.
- [67] National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 171548, Biotin. Retrieved June 1, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Biotin>.
- [68] Nur, S. M., Rath, S., Ahmad, V., Ahmad, A., Ateeq, B., & Khan, M. I. (2021). Nutritive vitamins as epidrugs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(1), 1–13. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1712674>
- [69] Olewnik Ł, Zielinska N, Paulsen F, Podgórski M, Haładaj R, Karauda P, Polguy M. A proposal for a new classification of soleus muscle morphology. *Ann Anat.* 2020 Nov;232:151584. doi: 10.1016/j.aanat.2020.151584. Epub 2020 Aug 15. PMID: 32810614.
- [70] Owens, D. J., Messéant, J., Moog, S., Viggars, M., Ferry, A., Mamchaoui, K., Lacène, E., Roméro, N., Brull, A., Bonne, G., Butler-Browne, G., & Coirault, C. (2021). Lamin-related congenital muscular dystrophy alters mechanical signaling and skeletal muscle growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms22010306>
- [71] Pastén-Hidalgo K, Riverón-Negrete L, Sicilia-Argumedo G, Canul-Medina G, Salazar-Anzures T, Tapia-Rodríguez M, Hernández-González 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.

[72] Paul, P. K. & Duttagupta. (1976). The effect of an acute dose of biotin at a post-implantation stage and its relation with female sex steroids in the rat. *P. N. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 22. 181-6. 9.

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

[74] Poon, E., Howman, E. V., Newey, S. E., & Davies, K. E. (2002). Association of syncoilin and desmin: Linking intermediate filament proteins to the dystrophin-associated protein complex. *Journal of Biological Chemistry*, 277(5), 3433–3439. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105273200>

[75] Puckelwartz, M. J., Kessler, E., Zhang, Y., Hodzic, D., Randles, K. N., Morris, G., Earley, J. U., Hadhazy, M., Holaska, J. M., Mewborn, S. K., Pytel, P., & McNally, E. M. (2009). Disruption of nesprin-1 produces an Emery Dreifuss muscular dystrophy-like phenotype in mice. *Human Molecular Genetics*, 18(4), 607–620. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn386>

[76] Que J, Zhou J, Zemleni J. (2013) Holocarboxylase synthetase catalyzes biotinylation of heat shock protein 72, thereby inducing RANTES expression in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 149: C1240-C1245.

[77] Ralston, E., Lu, Z., Biscocho, N., Soumaka, E., Mavroidis, M., Prats, C., Lømo, T., Capetanaki, Y. and Ploug, T. (2006), Blood vessels and desmin control the positioning of nuclei in skeletal muscle fibers. *J. Cell. Physiol.*, 209: 874-882. <https://doi.org/10.1002/jcp.20780>

[78] 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. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 60(4), 182–185. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.03.005>

[79] 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.

[80] 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.

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

[82] Roman W, Pimentel M.R, Gomes E.R. (2018) An In Vitro System to Measure the Positioning, Stiffness, and Rupture of the Nucleus in Skeletal Muscle. *Methods Mol Biol.* 1840:283–293.

[83] Sanger, J. M., & Sanger, J. W. (2008). The dynamic Z bands of striated muscle cells. *Science Signaling*, 1(32), 1–4. <https://doi.org/10.1126/scisignal.132pe37>

[84] Salazar-Anzures, T., Pastén-Hidalgo, K., Sicilia-Argumedo, G., Riverón-Negrete, L., Hernández-Vázquez, A. J., & Fernanadez-Mejia, C. (2021). Dietary biotin supplementation increases proliferation pathways in mice testes without affecting serum follicle-stimulating hormone levels and stem cell factor expression. *Toxicology and applied pharmacology*, 433, 115774. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115774>

[84] Seaborne RA, Sharples AP. The Interplay Between Exercise Metabolism, Epigenetics, and Skeletal Muscle Remodeling. *Exerc Sport Sci Rev.* 2020 Oct;48(4):188-200. doi: 10.1249/JES.0000000000000227. PMID: 32658040.

[85] Sharples, A. P., Stewart, C. E., & Seaborne, R. A. (2016). Does skeletal muscle have an ‘epi’-memory? The role of epigenetics in nutritional programming, metabolic disease, aging and exercise. *Aging Cell*, 15(4), 603–616. <https://doi.org/10.1111/accel.12486>

[86] Schwartz, C., Fischer, M., Mamchaoui, K., Bigot, A., Lok, T., Verdier, C., Duperray, A., Michel, R., Holt, I., Voit, T., Quijano-Roy, S., Bonne, G., & Coirault, C. (2017). Lamins and nesprin-1 mediate inside-out mechanical coupling in muscle cell precursors through FHOD1. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01324-z>

[87] Seaborne, R. A., & Sharples, A. P. (2020). The interplay between exercise metabolism, epigenetics, and skeletal muscle remodeling. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 48(4), 188–200. <https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000227>

[88] Seto, J. T., Chan, S., Turner, N., MacArthur, D. G., Raftery, J. M., Berman, Y. D., Quinlan, K. G. R., Cooney, G. J., Head, S., Yang, N., & North, K. N. (2011). The effect of  $\alpha$ -actinin-3 deficiency on muscle aging. *Experimental Gerontology*, 46(4), 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.11.006>

- [89] Simmins, P. H. & Brooks, P. H. (1983). Supplementary biotin for sows: effect on reproductive characteristics. *Vet Rec.* 112. 425-9.
- [90] Solórzano-Vargas RS, Pacheco-Alvarez D, León-Del-Río A. (2002). Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* Apr 16;99(8):5325-30.
- [91] Singh S and Kluger R., (2016) Self-Assembly of a Functional Triple Protein: Hemoglobin-Avidin-Hemoglobin via Biotin-Avidin Interaction. *Biochemistry.* 55, 2875-2882.
- [92] Spence JT, Koudelka AP. (1984). Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem.* May 25;259(10):6393-6.
- [93] Steinle, N. I., Kazlauskaitė, R., Imumorin, I. G., Hsueh, W. C., Pollin, T. I., O'Connell, J. R., Mitchell, B. D., & Shuldiner, A. R. (2004). Variation in the lamin A/C gene: Associations with metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(9), 1708–1713. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000136384.53705.c9>
- [94] Sternicki, L. M., Wegener, K. L., Bruning, J. B., Booker, G. W., & Polyak, S. W. (2017). Mechanisms Governing Precise Protein Biotinylation. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(5), 383–394. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.001>
- [95] Suchy, Sharon & Rizzo, William & Wolf, Barri. (1986). Effect of biotin deficiency and supplementation on lipid metabolism in rats, saturated fatty acids. *The American journal of clinical nutrition.* 44. 475-80. 10.1093/ajcn/44.4.475.
- [96] Takada, F., Vander Woude, D. L., Tong, H. Q., Thompson, T. G., Watkins, S. C., Kunkel, L. M., & Beggs, A. H. (2001). Myozenin: An  $\alpha$ -actinin- and  $\gamma$ -filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1595–1600. <https://doi.org/10.1073/pnas.041609698>
- [97] Tanaka H, Okuda K, Ohtani S, et al. (2018) Chained nuclei and python pattern in skeletal muscle cells as histological markers for electrical injury. *Leg Med (Tokyo).* 32:75–78.
- [98] Tambovtseva RV, Kornienko IA. Razvitie razlichnykh tipov myshechnykh volokon chetyrekhglavoï myshtsy bedra i kambalovidnoï myshtsy v ontogeneze cheloveka [*Development of various types of muscle fibers in the quadriceps femoris and the soleus*

during human ontogenesis]. *Arkh Anat Gistol Embriol.* 1986 Sep;91(9):96-9. Russian. PMID: 2947554.

[99] Taylor-Weiner H, Grigsby CL, Ferreira DMS, Dias JM, Stevens MM, Ruas JL, Teixeira AI. Modeling the transport of nuclear proteins along single skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Feb 11;117(6):2978-2986. doi: 10.1073/pnas.1919600117. Epub 2020 Jan 27. PMID: 31988126; PMCID: PMC7022209.

[100] Terada, M., Lan, Y. B., Kawano, F., Ohira, T., Higo, Y., Nakai, N., Imaizumi, K., Ogura, A., Nishimoto, N., Adachi, Y., & Ohira, Y. (2010). Myonucleus-related properties in soleus muscle fibers of mdx mice. *Cells Tissues Organs*, 191(3), 248–259. <https://doi.org/10.1159/000240245>

[101] Torgan, C. E., & Daniels, M. P. (2006). Calcineurin localization in skeletal muscle offers insights into potential new targets. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54(1), 119–128. <https://doi.org/10.1369/jhc.5A6769.2005>

[102] Vesely DL. (1982). Biotin enhances guanylate cyclase activity *Science.* Jun 18;216(4552):1329-30.

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

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

[105] Wakayama, Y., Matsuzaki, Y., Yamashita, S., Inoue, M., Jimi, T., Hara, H., Unaki, A., Iijima, S., & Masaki, H. (2010). Dysbindin, syncoilin, and  $\beta$ -synemin mRNA levels in dystrophic muscles. *International Journal of Neuroscience*, 120(2), 144–149. <https://doi.org/10.3109/00207450903279717>

[106] Watanabe T. (1996). Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia.* 52. 149-547.7.

[107] 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

- [108] Wiedmann, S., Rodriguez-Melendez, R., Ortega-Cuellar, D. & Zempleni, J. (2004). Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr Biochem*. 15. 433-9.
- [109] Wilson, M. H., Bray, M. G., & Holzbaur, E. L. F. (2016). Methods for assessing nuclear rotation and nuclear positioning in developing skeletal muscle cells. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1411, pp. 269–290). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3530-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3530-7_18)
- [110] Yong, W. C., Sanguaneko, A., & Upala, S. (2017). Effect of vitamin D supplementation in chronic widespread pain: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Rheumatology*, 36(12), 2825–2833. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3754-y>
- [111] Zhang, J., Bang, M. L., Gokhin, D. S., Lu, Y., Cui, L., Li, X., Gu, Y., Dalton, N. D., Scimia, M. C., Peterson, K. L., Lieber, R. L., & Chen, J. (2008). Syncoilin is required for generating maximum isometric stress in skeletal muscle but dispensable for muscle cytoarchitecture. In *American Journal of Physiology - Cell Physiology* (Vol. 294, Issue 5). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00049.2008>
- [112] Zhang, Q., Bethmann, C., Worth, N. F., Davies, J. D., Wasner, C., Feuer, A., Ragnauth, C. D., Yi, Q., Mellad, J. A., Warren, D. T., Wheeler, M. A., Ellis, J. A., Skepper, J. N., Vorgerd, M., Schlotter-Weigel, B., Weissberg, P. L., Roberts, R. G., Wehnert, M., & Shanahan, C. M. (2007). Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery - Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Human Molecular Genetics*, 16(23), 2816–2833. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm238>
- [113] Zempleni, J., & Mock, D. M. (2005). Biotin homeostasis during the cell cycle. *Nutrition Research Reviews*, 14(1), 45–64. <https://doi.org/10.1079/095442201108729132>
- [114] Zempleni J, Liu D, Teixeira Camara D, Cordonier E.L. (2014) Novel roles of holocarboxylase synthetase in gene regulation and intermediary metabolism. *Nutr Rev*. 72(6) 369-376.
- [115] Zempleni, J., Teixeira, D. C., Kuroishi, T., Cordonier, E. L., & Baier, S. (2012). Biotin requirements for DNA damage prevention. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733(1–2), 58–60. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.08.001>