



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO FARMACOLÓGICO DE LA BIOTINA EN EL DESARROLLO DEL
TEJIDO ADIPOSEO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

L.Q.I. Gustavo Adolfo Rojas Olave

TUTOR PRINCIPAL

Dra. María Cristina Fernández Mejía
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Yazmín Macotela Guzmán
[Instituto de Neurobiología](#)

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán](#)

Ciudad de México, Septiembre, 2019



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.

Este trabajo de tesis fue realizado en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)/ Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Durante los estudios de maestría, el autor de la tesis obtuvo apoyo del:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

CVU/Becario: 784183/620033

Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cristina Fernández Mejía, tutora principal de la presente tesis. Gracias por el tiempo dedicado a enseñar, discutir, corregir y motivar durante el tiempo que estuve realizando mis estudios. Su labor fue fundamental para mi formación como maestro.

A la Dra. Yazmín Macotela Guzmán y el Dr. Armando Tovar Palacio, miembros del comité tutor. Gracias por sus valiosas aportaciones en la realización de este proyecto.

A la Dra. Wilma Tixi Verdugo y la Dra. Ericka Moreno Méndez. Gracias por su dedicación y constante esfuerzo en la enseñanza de las actividades de laboratorio y la labor investigativa, así como la co-dirección del presente proyecto. Sus aportes fueron fundamentales durante mi formación.

A mis compañeros de laboratorio, por su aporte al desarrollo de un ambiente de trabajo óptimo y sus aportaciones al presente proyecto.

A mis padres y amigos, por hacer parte de mi motivación para superarme y crecer constantemente.

INDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS.....	2
INTRODUCCIÓN	3
BIOTINA.....	3
Biodisponibilidad e ingesta adecuada	3
Transporte de biotina	4
Toxicidad de la biotina	4
Rol biológico de la biotina	4
Acetil-CoAcarboxilasa	5
Piruvato carboxilasa.....	6
Propionil-CoAcarboxilasa	6
Metilcrotonil-CoAcarboxilasa.....	6
Efecto farmacológico de la biotina	7
Efecto de la biotina sobre el desarrollo	9
Efecto de la biotina en el metabolismo de lípidos	10
Deficiencia marginal de biotina en la gestación y la lactancia.....	11
TEJIDO ADIPOSO	12
Depósitos de tejido adiposo	13
Morfología del tejido adiposo	15
Adipogénesis.....	16
Desarrollo del tejido adiposo.....	17
Genes de interés en el tejido adiposo	20
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO.....	24
OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Modelo animal.....	26
Análisis morfológico de tejido adiposo	27

Análisis de abundancia relativa de mRNA	28
Análisis estadístico.....	30
RESULTADOS	30
Efecto de la dieta suplementada con biotina durante la gestación y la lactancia sobre la cantidad de tejido adiposo de las crías.....	30
Efecto de la dieta suplementada con biotina durante la gestación y la lactancia sobre el tejido adiposo perigonadal.....	31
Efecto en la morfología del tejido adiposo perigonadal.....	31
Efecto en la expresión génica en el tejido adiposo perigonadal.....	33
Efecto de la dieta suplementada con biotina durante la gestación y la lactancia sobre el tejido adiposo inguinal	34
Efecto en la morfología del tejido adiposo inguinal	34
Efecto en la expresión génica en el tejido adiposo inguinal	37
Efecto de la dieta suplementada con biotina durante la gestación y la lactancia en la morfología del tejido adiposo blanco interescapular.....	38
Efecto de la dieta suplementada con biotina durante la gestación y la lactancia sobre el tejido adiposo marrón interescapular.....	40
Efecto en la morfología del tejido adiposo marrón interescapular.....	40
Efecto en la expresión génica en el tejido adiposo marrón interescapular.....	41
DISCUSION	42
CONCLUSIONES.....	46
REFERENCIAS	48

RESUMEN

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B que actúa como grupo prostético de las enzimas carboxilasas. En adición, se ha encontrado que concentraciones farmacológicas de biotina modifican funciones como la reproducción, metabolismo de glucosa y lípidos. Estas acciones se efectúan mediante mecanismos sobre la expresión génica.

Un estudio previo demostró que la suplementación con biotina en ratones adultos modifica la expresión génica de diversas proteínas participantes en el metabolismo y formación del tejido adiposo, tales como SREBP-1c y PPAR γ , lo que sugiere que la biotina podría modificar el desarrollo del tejido adiposo. En el presente trabajo analizamos los efectos de la suplementación con biotina durante la gestación y lactancia en la cantidad, morfología y expresión génica en el tejido adiposo de las crías.

Ratones hembra Balbc/AnNHsd fueron alimentadas con dieta control o suplementada con biotina (1.76 mg y 97.7 mg of biotina/kg dieta, respectivamente) durante la gestación y lactancia. Al día 21 de vida (día destete) se sacrificaron las crías previo ayuno de 8 horas y se extrajeron los depósitos de tejido adiposo. Se analizó la morfología del tejido mediante tinción con hematoxilina-eosina y el programa Image J-1.4. El análisis de la expresión de los genes Ppar γ , Pref-1, Ucp-1, Lep y Adipoq se realizó mediante Q-RT-PCR.

Los resultados muestran una disminución en la cantidad de tejido adiposo blanco en el depósito inguinal y el interescapular, mientras el perigonadal permanece igual. En estos depósitos se observó menor área de los adipocitos blancos. En el tejido marrón interescapular no se observaron diferencias en la cantidad y morfología del depósito. No encontramos diferencias significativas en la expresión de los genes medidos en los diferentes depósitos.

Nuestros resultados evidencian por primera vez que la suplementación con biotina durante gestación y lactancia modifica el desarrollo del tejido adiposo de las crías y que este efecto es diferencial entre los depósitos del mismo.

ABREVIATURAS

ACC Acetil CoA carboxilasa

Adipoq Adiponectina

AKT Proteína cinasa B

AMPc Monofosfato de adenosina cíclico

AMPK Proteína cinasa activada por AMP

CEBPa Proteína alfa de unión al potenciador CCAAT

DNAc Ácido desoxirribonucleico complementario

FAS Sintasa de ácidos grasos

HPRT Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa

Lep Leptina

LPL Lipoproteína lipasa

PI3K Fosfoinositol 3 cinasa

PKC Proteína cinasa C

PPAR γ Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas

Pref-1 Factor de preadipocitos 1

RNAm Ácido ribonucleico mensajero

RT-PCR1 Transcriptasa Reversa- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SREBP-1c Proteína de unión al elemento regulador de esterol 1c

Ucp-1 Proteína desacoplante 1

INTRODUCCIÓN

BIOTINA

La biotina es una vitamina hidrosoluble del complejo B que participa en el organismo como cofactor de las enzimas carboxilasas, por lo que es esencial para la homeostasis metabólica (Zempleni, 2005). Mamíferos y aves no pueden sintetizar biotina, por lo que es necesario que sea consumida en la dieta. Sin embargo, bacterias de la flora intestinal pueden aportar biotina al organismo (Melo et al., 2007).

Estructuralmente la molécula de biotina está compuesta por un anillo de imidazolidona unido a un anillo de tetrahidrotiofeno, éste a su vez enlazado a una cadena lateral de ácido valérico.

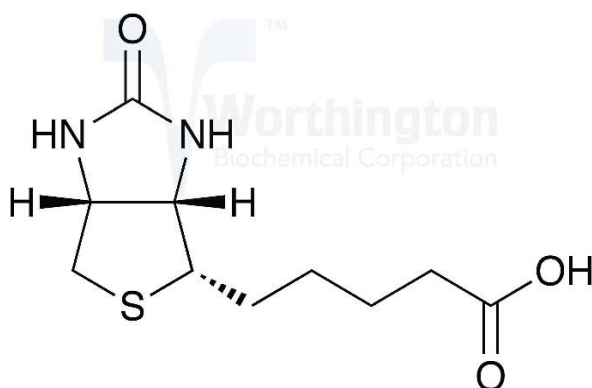


Figura 1. Estructura química de la biotina

Biodisponibilidad e ingesta adecuada

La biotina se encuentra presente en gran variedad de los alimentos que se incluyen en la dieta de consumo humano, sin embargo, la concentración de ésta y sus requerimientos diarios es más baja que la de otras vitaminas hidrosolubles (Combs & McClung, s. f.).

La ingesta adecuada de biotina en humanos es de 5 ug/día para bebés (0 a 5 meses), 30 ug/día para adultos y de 35 ug/día para mujeres embarazadas y lactantes. Valores que resultaron principalmente de dos estudios en los que se encontró que dosis diarias de 28 a 42 ug (Yates A.A, 1998) y 60 ug (Innis & Allardyce, 1983) de biotina en adultos no representaron síntomas de deficiencia de la vitamina.

Transporte de biotina

La absorción de biotina libre se da mediante dos transportadores en las células: el transportador 1 multivitamínico dependiente de sodio (SMVT 1), el cual también media el transporte de ácido pantoténico y ácido lipoíco junto con sodio, en un gradiente a favor de concentración (Chatterjee et al., 1999); y el transportador 1 de monocarboxilatos (MCT 1), sobre el cual se sabe que facilita el transporte de biotina en células mononucleares de sangre periférica (Daberkow et al., 2003).

Toxicidad de la biotina

Sobre la toxicidad de la biotina existen pocos estudios. En humanos se ha administrado biotina de forma oral, intramuscular e intravenosa en un rango de 0.25 a 50 mg hasta por 40 días sin encontrar efectos adversos (Dokusova & Krivoruchenko, 1972). La DL₅₀ oral para ratas es de 10 g/kg peso y en ratones de 354 mg/g peso. Mientras la DL₅₀ intraperitoneal reportada para ratas es de 29 mg/kg peso y de 1000 mg/kg peso para ratones (Klein, 1985; Dokusova & Krivoruchenko, 1972).

Rol biológico de la biotina

En mamíferos, el rol más conocido de la biotina es como cofactor de las enzimas carboxilasas: piruvatocarboxilasa (PC; E.C.6.4.1.1), acetil-CoA carboxilasa (ACC; E.C. 6.4.1.2), propionil-CoA carboxilasa (PCC; E.C. 6.4.1.3) y metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC; E.C. 6.4.1.4). Estas enzimas son sintetizadas como apoenzimas y participan en la gluconeogénesis (Sarawut Jitrapakdee & Wallace, 2003). La enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS; E.C. 6.3.4.10) es la encargada de unir covalentemente la biotina a las apoenzimas

carboxilasas y generar su forma activa. La reacción ocurre en dos pasos: primero se forma un compuesto intermediario, biotinil-5-AMP (B-AMP) (Cazzulo et al., 1971); en el segundo paso, el intermediario B-AMP es transferido a la apoenzima en un residuo de Lys, ubicado en una secuencia Met-Lys-Met altamente conservado en las apocarboxilasas (Lamhonwah et al., 1987), esta reacción conlleva un gasto de ATP y la liberación de AMP.

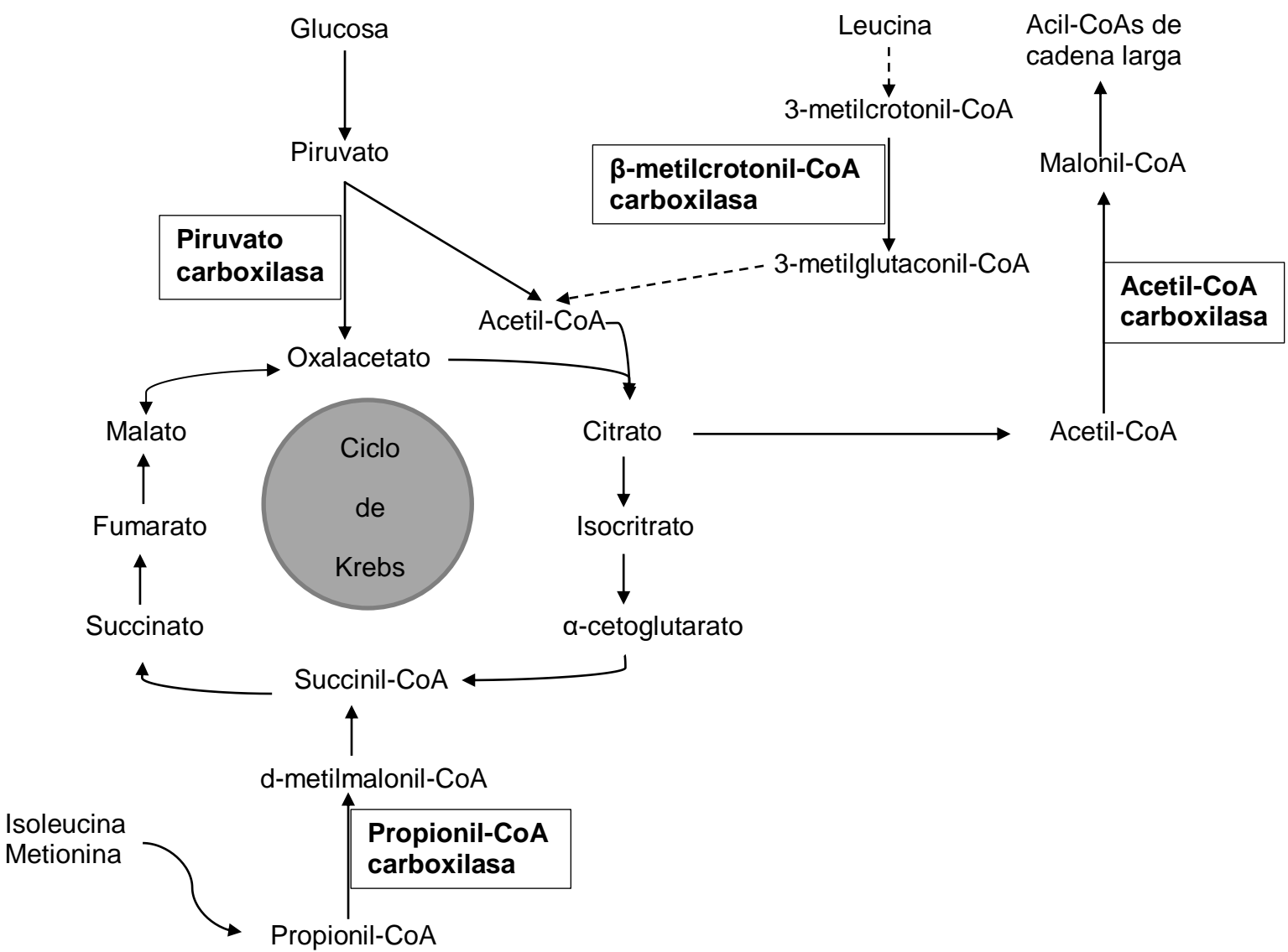


Figura 2. Enzimas carboxilasas y su función en el metabolismo (Lazo de la Vega, ML. 2012).

Acetil-CoA carboxilasa

La enzima acetil-CoA carboxilasa cataliza la carboxilación de acetil-CoA para formar malonil-CoA. Se han identificado dos isoformas: acetil-CoA carboxilasa 1 (~250 kDa) que se encuentra en el citoplasma y sintetiza el malonil-CoA usado como sustrato para la síntesis de ácidos grasos; la acetil-CoA carboxilasa 2 (~280 kDa) se encuentra en la mitocondria y el malonil-CoA que ésta sintetiza actúa como inhibidor de la enzima carnitina aciltransferasa, por lo que regula la oxidación de ácidos grasos (McMahon, 2002). La acetil-CoA carboxilasa 1 se expresa principalmente en órganos con actividad lipogénica, mientras la expresión de acetil-CoA carboxilasa 2 está asociada a órganos que oxidan ácidos grasos (Abu-Elheiga et al., 1997).

Piruvato carboxilasa

La enzima piruvato carboxilasa (~120 kDa) cataliza la carboxilación de piruvato a oxalacetato, reacción esencial para la gluconeogénesis y el mantenimiento anaplerótico del ciclo de Krebs (S. Jitrapakdee & Wallace, 1999). La piruvato carboxilasa se expresa en la mitocondria de una amplia gama de tejidos (Ashman et al., 1972).

Propionil-CoA carboxilasa

La enzima propionil-CoA carboxilasa (~750kDa) cataliza la carboxilación de propionil-CoA para formar metilmalonil-CoA; el propionil-CoA se forma como producto del catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, ácidos grasos impares y colesterol (Sarawut Jitrapakdee & Wallace, 2003).

Metilcrotonil-CoA carboxilasa

La enzima metilcrotonil-CoA carboxilasa cataliza la carboxilación de 3-metilcrotonil-CoA a 3-metilglutaconil-CoA, reacción fundamental para el catabolismo del aminoácido leucina (Lau et al., 1980).

La biotina unida a las enzimas holocarboxilasas es liberada en forma de biocitina (biotina-Lys) por proteólisis, la biocitina puede ser catabolizada por la biotinidasa, dando como resultado biotina libre que puede ser reutilizada en nuevas

apoenzimas o degradada y excretada en forma de biotinsulfóxido o bisnorbiotina (Said, 2012).

Efecto farmacológico de la biotina

Independiente de su función como cofactor de las enzimas carboxilasas, actualmente se sabe que concentraciones farmacológicas de biotina modifican la expresión de diversos genes relacionados con el metabolismo de lípidos y glucosa, además de generar diversos efectos sobre el desarrollo, reproducción y metabolismo tanto a nivel transcripcional, como post transcripcional y traduccional (Riveron-Negrete & Fernandez-Mejia, 2017).

En 1960 se demostró que concentraciones farmacológicas de biotina aumentan la actividad de la glucocinasa hepática en ratas diabéticas (aloxano) y no diabéticas (Dakshinamurti & Cheah-Tan, 1968) (Dakshinamurti & Ho Chong Hong, 1970). Posteriormente, se observó el mismo efecto en cultivos de hepatocitos de rata, donde además se observó un incremento en el contenido de GMPc (Spence & Koudelka, 1984).

En modelo de ratas diabéticas inducidas con aloxano se observó también un aumento en la actividad de las enzimas fosfofructocinasa y piruvatocinasa en hígado por una dosis farmacológica de biotina (2 mg/kg) (Dakshinamurti & Ho Chong Hong, 1970). Finalmente, en la década de los 90 se demostró que el efecto en la actividad de la glucocinasa estaba dado por un aumento en la transcripción del gen de la enzima (Chauhan & Dakshinamurti, 1991). En un estudio de microarreglos se encontró que la administración de 2.15 mg de biotina por día a humanos sanos durante 21 días modificó de forma positiva la expresión de 139 genes, mientras tuvo efecto negativo en la expresión de 131 genes en células mononucleares de sangre periférica (Wiedmann et al., 2004).

A nivel traduccional se encontró que la biotina en una concentración de 10 nM regula la síntesis de diversas proteínas en células HepG2. En estudios proteómicos se modificaron aproximadamente 40 proteínas con un cambio de al

menos 25% de su abundancia en respuesta a la suplementación con la vitamina (Rodríguez-Melendez et al., 2005).

Aunque existen múltiples estudios sobre el efecto de la biotina en la expresión de diversos genes, el o los mecanismos moleculares por los cuales ejerce sus efectos permanecen sin ser totalmente dilucidado. En 1982 se demostró que la adición de biotina aumentaba la actividad de la guanilato ciclasa soluble en líneas celulares (Vesely, 1982). En apoyo a esta observación, posteriormente se reportó un aumento en las concentraciones intracelulares de GMPc en hepatocitos de rata con un aumento en la actividad de la glucocinasa en respuesta a biotina (Spence & Koudelka, 1984). Se ha propuesto que el biotinil-5'-AMP producido por la holocarboxilasa sintetasa participa en la activación de la guanilato ciclasa soluble mediante un mecanismo desconocido (Solórzano-Vargas et al., 2002).

Estudios realizados por nuestro laboratorio encontraron que la suplementación con biotina aumenta la expresión de la glucocinasa pancreática mediante la vía de señalización de GMPc/ Proteína cinasa G (PKG). En islotes pancreáticos tratados con 1uM de biotina se observó que la activación de la guanilato ciclasa soluble y PKG aumenta el contenido de ATP, el cual induce la secreción de insulina por los canales de potasio sensibles a ATP. La hormona por efecto autocrino activa la vía PI3K/Akt y aumenta la transcripción del gen de la glucocinasa (Vilches-Flores et al., 2010). Sin embargo, este mecanismo es privativo de la célula-beta, única célula que secreta insulina, y, por esta razón, no puede extrapolarse a otros tejidos.

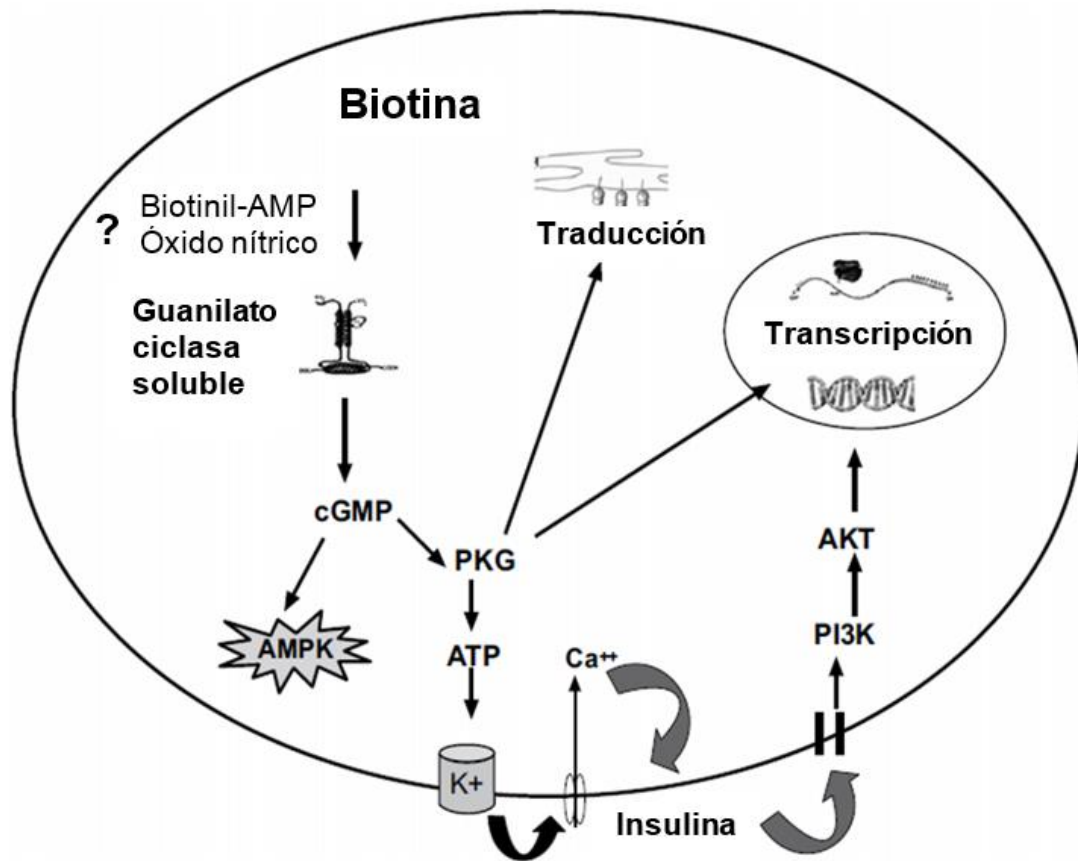


Figura 3. Mecanismo de acción de la biotina sobre transcripción y traducción génica (Riveron-Negrete & Fernandez-Mejia, 2017).

Efecto de la biotina sobre el desarrollo

Sobre el efecto de concentraciones farmacológicas de biotina en el desarrollo existen resultados divergentes. En un estudio realizado en ratonas gestantes a las que se les suministró una dieta suplementada con biotina (1000 mg/kg dieta) no se observaron malformaciones externas de los fetos (Watanabe, 1996). Sin embargo, un estudio en el que se inyectaron diferentes concentraciones de biotina al ojo de embriones de pollo demostró que se afectaba la estructura del ojo al inducir malformaciones en la retina y lente del embrión en forma dependiente de la dosis. Efectos similares fueron observados al usar biocitina, un análogo de la biotina, mientras la avidina evitó estos efectos (Valenciano et al., 2002).

Efecto de la biotina en el metabolismo de lípidos

El rol de la biotina como cofactor de las enzimas acetil-CoA carboxilasas 1 y 2, enzimas que regulan la síntesis y oxidación de ácidos grasos, respectivamente, establece una relación directa entre la vitamina y el metabolismo de lípidos (Dakshinamurti & Desjardins, 1968). Además de esta relación, actualmente se sabe que el tratamiento con biotina en dosis farmacológicas tiene efectos benéficos sobre la concentración de triglicéridos y colesterol en sangre (Riveron-Negrete & Fernandez-Mejia, 2017).

En un estudio realizado en 1960 en humanos adultos sanos se encontró que una inyección de 10 mg de biotina disminuía la concentración de lípidos totales en suero (PAOLETTI et al., 1987). En pacientes con aterosclerosis e hipercolesterolemia, la administración de 5 mg de biotina por 4 semanas tuvo como efecto la disminución de colesterol total (Dokusova & Krivoruchenko, 1972). En voluntarios sanos la administración de 0.9 mg/día de biotina modificó los niveles de lípidos plasmáticos de forma dependiente del tiempo de administración y el grado de lipidemia del paciente (Marshall et al., 1980). Estudios realizados en pacientes diabéticos y no diabéticos por nuestro laboratorio revelaron que el tratamiento con 5 mg de biotina tres veces al día tenía como efecto la disminución de la concentración de triacilgliceroles en sangre, siendo el efecto una vez más dependiente del nivel de triacilgliceroles del paciente, adicionalmente, se observó una disminución en las lipoproteínas de muy baja densidad (Revilla-Monsalve et al., 2006).

Efectos similares han sido observados en modelos murinos. En la cepa de ratas Bureau of Home Economics (BHE), la cual tiene predisposición genética a concentraciones elevadas de glucosa y lípidos en sangre, se encontró que el tratamiento con 8 ug diarios de biotina disminuyó la concentración de lípidos en sangre (Marshall et al., 1976). En un estudio realizado por nuestro laboratorio en ratas hipertrigliceridémicas se encontró que una inyección de 2 mg/peso animal durante 28 días disminuyó la concentración de triacilgliceroles en sangre, así como también la expresión de diferentes genes que participan en la síntesis de lípidos (Vital et al., 2006).

En otro estudio de nuestro laboratorio realizado en ratones macho BALB/c se encontró que la administración de una dieta con un contenido de biotina 56 veces mayor al de una dieta control durante 8 semanas, se observó una disminución en la concentración de triacilgliceroles séricos, efecto asociado a la disminución de ácidos ribonucleicos mensajeros (mRNA) de enzimas y factores de transcripción que participan de la síntesis de lípidos, tanto en hígado como en tejido adiposo, dos órganos fundamentales en la regulación de los niveles de lípidos en el organismo. En hígado se observó una disminución en los mensajeros del factor de transcripción de la proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides 1c (SREBP-1c) y de mensajeros cuya transcripción dependen de este último, como el de la acetil Coa carboxilasa 1 (ACC1), ácido graso sintasa (FAS). En el tejido adiposo se observó igualmente una disminución de los mensajes de SREBP-1c, ACC1, FAS; adicionalmente, también se vieron disminuidos los mensajeros de la enzima esteroil-CoA desaturasa 1 (SCD1) y el receptor de peroxisoma proliferador activado gamma (PPAR γ), el cual es un factor de transcripción fundamental para la diferenciación de nuevos adipocitos en el tejido adiposo (Larrieta et al., 2010).

Deficiencia marginal de biotina en la gestación y la lactancia

En la actualidad hay evidencia de que durante los eventos de gestación y lactancia en humanos existe propensión de que se desarrolle una deficiencia de biotina en el 50% de las mujeres embarazadas, condición que se ha denominado como deficiencia marginal de biotina (Mock, Quirk, & Mock, 2002). Un estudio realizado en mujeres embarazadas encontró alteraciones en biomarcadores relacionados con el metabolismo de la biotina, lo que indicó cierto grado de deficiencia de biotina. Durante la lactancia también se encontró alteración de estos biomarcadores, indicio de deficiencia durante esta etapa. Estos indicadores de biotina insuficiente en el organismo fueron restablecidos a valores normales cuando se aumentó la ingesta diaria de biotina (Perry et al., 2014), lo que sugiere que es necesario aumentar el valor de ingesta adecuada durante las etapas de gestación y lactancia en humanos ya sea por ajustes en la dieta o por suplementación con biotina. Sin embargo, es necesario investigar

más sobre el efecto de la suplementación con biotina durante gestación y lactancia tanto en la salud de la madre como en la de la descendencia.

TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo, también llamado tejido graso, es el órgano encargado y especializado en el almacenamiento de energía en forma de triacilgliceroles. Además de esto, actualmente se sabe que es un tejido fundamental en la regulación energética del organismo mediante el eje Hipotálamo-Adiposo (Fliers et al., 2003), así como también participa en diversos procesos de forma endocrina mediante la secreción de diferentes hormonas y citocinas, denominadas adipocinas (Fain, 2006; Y. Lee et al., 2015). La composición celular del tejido adiposo es heterogénea, si bien aproximadamente el 90% del volumen tisular está compuesto por adipocitos maduros, existen también presencia de preadipocitos, células endoteliales, fibroblastos y células del sistema inmune, de este último grupo destacan los macrófagos (Cook A et al., 2009).

Se conocen tres tipos de tejido adiposo con función y morfología diferente. El tejido adiposo blanco que tiene por funciones almacenar energía en forma de triglicéridos en condición de postprandio, liberar ácidos grasos en condición de ayuno y, de forma dependiente del estado energético del organismo secretar múltiples moléculas que regulan la ingesta de alimento y metabolismo energético (Y.-H. Lee et al., 2014). Los adipocitos blancos se caracterizan tener por una gota de grasa (unilocular) que ocupa la mayor parte del citoplasma (M.-J. Lee et al., 2013); por otro lado, el tejido adiposo marrón cuya función principal es oxidar la grasa almacenada para producir energía en forma de calor mediante la proteína mitocondrial desacoplante (UCP 1) tiene múltiples gotas de grasa (multilocular) de menor tamaño y un gran contenido mitocondrial (Berry et al., 2013a; Giordano et al., 2014). El tercer tipo de tejido adiposo es denominado “beige” o “brite”, su aparición se induce por exposición prolongada a bajas temperaturas y/o agonistas adrenérgicos (Rosen & Spiegelman, 2014). Los adipocitos beige también participan en el proceso termogénico y se han encontrado en los depósitos de tejido adiposo blanco (Kajimura et al., 2015a).

Depósitos de tejido adiposo

En mamíferos, el tejido adiposo se localiza en depósitos definidos en diferentes partes del cuerpo y por tanto la clasificación depende del tipo de tejido (blanco y/o marrón) y de su localización corporal. El tejido adiposo subcutáneo, localizado bajo la piel incluye los depósitos de tejido adiposo inguinal e interescapular; el tejido adiposo visceral que se encuentra en la cavidad troncal del cuerpo incluye los depósitos de tejido adiposo perigonadal, retroperitoneal y mesentérico (Berry et al., 2013a).

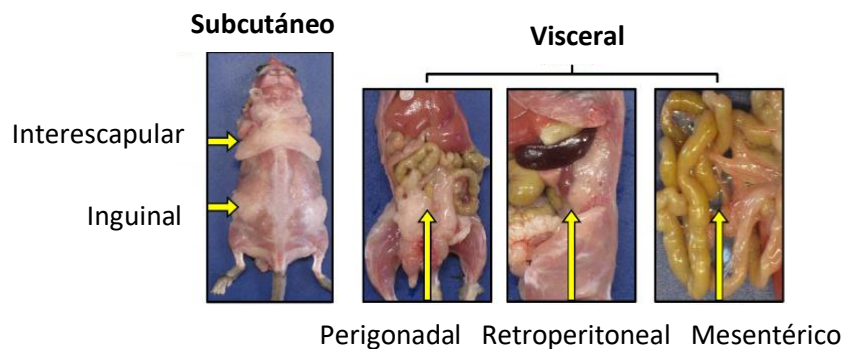


Figura 4. Distribución de depósitos de tejido adiposo en ratón, adaptado de (Berry et al., 2013a).

Actualmente se sabe que los diferentes depósitos de tejido adiposo tienen características que varían entre los depósitos y responden de forma diferente ante varios factores, así como también participan de manera diferencial en distintas patologías, como la obesidad y síndrome metabólicos (Pellegrinelli et al., 2016).

Morfológicamente el depósito inguinal se caracteriza por tener adipocitos uniloculares maduros intercalados con adipocitos más pequeños multiloculares, en tanto que en los depósitos de tejido visceral los adipocitos tienden a ser uniformemente uniloculares (Berry et al., 2013b). Sobre el incremento del tejido

adiposo en humanos se sabe que la deposición de grasa en los depósitos subcutáneos (característica en mujeres) ejerce cierta protección contra disfunciones metabólicas (Snijder et al., 2003), mientras el aumento de los depósitos viscerales (característica en hombres) se ha asociado con complicaciones metabólicas y aumento del riesgo de padecer diabetes, hiperlipidemia y enfermedades cardiovasculares (Grauer et al., 1984).

Una de las razones que se han planteado para explicar esta notable diferencia es que el tejido adiposo subcutáneo presenta un recambio de adipocitos más alto y también mayor tasa de diferenciación de adipocitos nuevos, lo que concuerda con la idea de que los adipocitos más pequeños no se asocian con disfunciones metabólicas (Björntorp et al., 1971; Salans et al., 1973). Estudios recientes encontraron diferencias intrínsecas entre la expresión de dos factores transcripcionales claves para la diferenciación de adipocitos entre los depósitos subcutáneos y viscerales, teniendo el primero mayor expresión de los factores PPAR γ y C/EBP α , lo que concuerda con su tasa de diferenciación (Baglioni et al., 2012).

Otro factor a tener en cuenta es la diferencia encontrada en el patrón de expresión de diferentes genes a nivel transcripcional y traduccional: el tejido subcutáneo tiende a expresar mayores niveles de leptina, angiotensinógeno respecto al visceral. Por otro lado, éste último expresa mayores niveles de receptor de insulina e interleucina 6 (Stephane Gesta et al., 2001). Otros estudios han revelado cambios de expresión característicos no sólo en diferentes depósitos sino también en adipocitos de diferentes tamaños (S. Gesta et al., 2006; Jernås et al., 2006).

Adicionalmente, los depósitos de tejido subcutáneo y visceral también presentan una respuesta diferencial a estímulos externos. En humanos y roedores se han observado respuestas específicas a hormonas esteroideas, el estrógeno incrementa la deposición de grasa en depósitos subcutáneos, mientras los depósitos viscerales responden más a glucocorticoides (Shi & Clegg, 2009).

Cada depósito es influenciado por su localización anatómica, el microambiente hormonal, la edad, el sexo y el metabolismo (Williams et al., 2014). Sin embargo,

las respuestas que presenta cada depósito ante estas señales está determinado por las diferencias genéticas intrínsecas, que les dan la capacidad de desarrollar y funcionar de formas específicas, por lo que podría considerarse a cada depósito como un mini-órgano (Berry et al., 2013b).

Morfología del tejido adiposo

Los adipocitos blancos son células de forma esférica cuyo tamaño es variable y depende principalmente de una sola gota de grasa en la que se almacena triglicéridos (unilocular). Esta gota de grasa ocupa más del 90% del volumen celular. El contenido mitocondrial en los adipocitos blancos es de cantidad variable. Por otro lado, los adipocitos marrón se caracterizan por almacenar triglicéridos en múltiples vacuolas de menor tamaño (multilocular). Debido a la función oxidativa de éstos, el contenido mitocondrial es alto (Saely et al., 2012). Al igual que los adipocitos marrón, los adipocitos beige tienen una morfología multilocular y tienen alto contenido mitocondrial. Estos adipocitos pueden encontrarse inmersos en depósitos de tejido adiposo blanco (Kajimura et al., 2015b).

El tejido adiposo se organiza en lóbulos definidos que contienen cúmulos de adipocitos. Estos lóbulos se encuentran separados por la matriz extracelular del tejido (Peurichard et al., 2017) compuesta por diversas proteínas estructurales que participan tanto en la arquitectura del tejido como en la diferenciación de adipocitos (Divoux & Clément, 2011). El color marrón se debe a que en el tejido adiposo marrón existe mayor inervación, necesaria para el control del proceso termogénico desde el sistema nervioso central; además el grado de vascularización es más alto debido a la alta demanda de oxígeno (Saely et al., 2012).

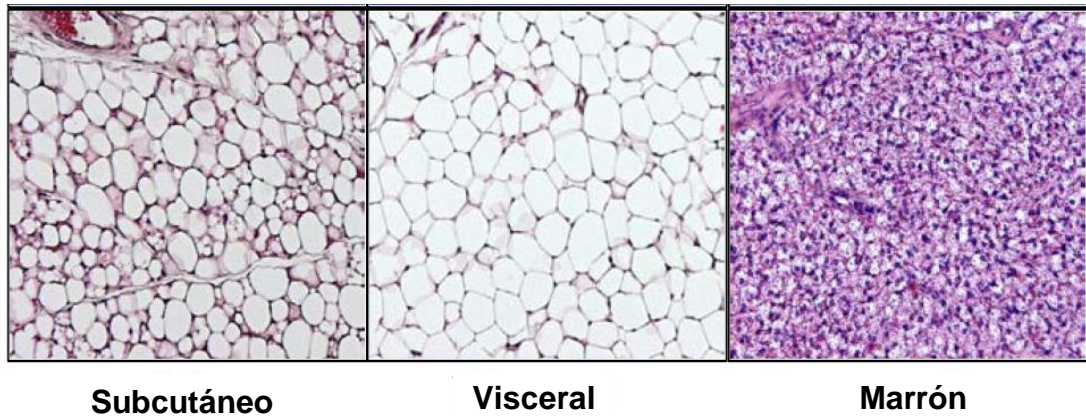


Figura 5. Morfología del tejido adiposo. Adaptado de (Berry et al., 2013b)

Adipogénesis

El tejido adiposo blanco se encarga de almacenar triacilgliceroles y/o liberar ácidos grasos en respuesta a las necesidades energéticas del organismo, por tanto, la plasticidad en cuanto a tamaño del tejido es fundamental para el correcto funcionamiento del órgano. El tejido aumenta mediante dos mecanismos: hipertrofia, en el cual los adipocitos aumentan de tamaño al acumular mayor cantidad de triacilgliceroles; hiperplasia, en el cual ocurre un aumento en el número de adipocitos maduros capaces de almacenar grasa en el tejido (Stephane Gesta et al., 2007). Este último mecanismo requiere que ocurra mayor adipogénesis en el tejido. Estos mecanismos de expansión del tejido adiposo ocurre en forma diferencial en los diferentes depósitos de tejido y depende del sexo (Fuente-Martín et al., 2013).

El proceso mediante el cual se desarrollan los adipocitos se conoce como adipogénesis. Este proceso es regulado por diferentes factores entre los que se encuentran hormonas, edad, organismo y depósito de tejido (Kim et al., 2010). La diferenciación se da en múltiples pasos y es regulada principalmente por dos factores de transcripción que promueven la diferenciación, incluyendo cambios morfológicos, y la expresión génica necesaria para la traducción de las proteínas características de un adipocito maduro, estos son: receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas PPAR γ y miembros de la familia de proteínas de

unión a potenciadores C/EBPs. Estos factores se encargan de dirigir la cascada transcripcional que lleva a la diferenciación de adipocitos (Moreno-Navarrete & Fernández-Real, 2012).

Es importante mencionar que un desequilibrio en la cantidad de tejido adiposo puede tener consecuencias sobre todo el organismo. Ya sea en caso de obesidad o lipodistrofia, se han observado diferentes patologías asociadas a estas condiciones, como lipotoxicidad, resistencia a insulina, diabetes tipo 2, entre otras (Hegele et al., 2007).

Desarrollo del tejido adiposo

Un estudio histológico realizado en 1983 demostró que el tejido adiposo se desarrolla durante el segundo trimestre de gestación en humanos (C.M. Poissonnet et al., 1983), existiendo diferencias en el tiempo exacto que dependen del tamaño del feto. En fetos de mayor tamaño el tejido adiposo es detectable más pronto que en fetos más pequeños (Claude Michéle Poissonnet et al., 1984). En roedores, el tejido adiposo se desarrolla desde las etapas tardías de gestación hasta cuatro semanas de la edad postnatal (Greenwood & Hirsch, 1974).

En un estudio en el que se usó un ratón mutante en el cual es posible diferenciar adipocitos ya desarrollados de aquellos recién formados en un día específico, se demostró que el tejido adiposo subcutáneo y el visceral tienen tiempos de desarrollo diferente. El tejido adiposo blanco subcutáneo se desarrolla durante la etapa embrionaria en roedores, desde el día E14 al E18, mientras el depósito gonadal (depósito visceral) durante la etapa post-natal (Q. A. Wang et al., 2013a), resultado que concuerda con Han et al., quienes demostraron que en el tejido adiposo epididimal la presencia de células con capacidad de diferenciarse en adipocitos sólo ocurre hasta el cuarto día postnatal (J. Han et al., 2011).

Debido a que el tejido adiposo se desarrolla durante los períodos de gestación y lactancia, es sensible a señales hormonales, nutricionales y epigenéticas de la madre que pueden determinar un cambio permanente en la programación del

tejido adiposo (Liang et al., 2016). Actualmente se sabe que la descendencia de madres que han estado bajo un régimen de desnutrición o de sobrenutrición presenta alteraciones en el tejido adiposo que “reprograman” su metabolismo: cambios en la distribución de lípidos, en la sensibilidad a diferentes hormonas, predisposición a aumento de adiposidad por acumulación de grasa, entre otras alteraciones que influyen en el metabolismo y por tanto salud de la descendencia (Calkins & Devaskar, 2011).

Para el estudio del efecto de la desnutrición durante gestación y lactancia se han usado dos modelos principalmente: dieta baja en proteína (del 20% reducida al 8%) y restricción de alimento desde el 20% hasta el 70%. Ambos modelos producen crecimiento intrauterino restringido (IUGR) y bajo peso al nacimiento en la descendencia (Lukaszewski et al., 2013). En ratas se ha visto que la alimentación con una dieta baja en proteína durante las etapas de gestación y lactancia disminuye tanto la cantidad de tejido adiposo visceral como el tamaño de los adipocitos de las crías (Ferland-McCollough et al., 2012).

En un modelo murino también se observó una disminución tanto en el peso al nacimiento como en la cantidad de tejido adiposo visceral en las crías macho; interesantemente, encontraron que estas crías presentaban menor peso corporal luego de 9 semanas de ser alimentadas con una dieta alta en grasa respecto al grupo control (R. Han et al., 2012). Por otro lado, en modelos de restricción de alimento del 50% en rata durante la gestación desde el día 10 hasta el término (Desai et al., 2008), o 70% durante toda la gestación se encontró que las crías presentaban adipocitos hipertróficos, aunque el peso al momento del nacimiento de las crías fuese menor (Lukaszewski et al., 2011). En estas crías se observó un rápido crecimiento, hiperfagia y obesidad en etapa adulta al ser alimentadas con una dieta normal después del destete (Desai et al., 2008).

En el estudio del efecto de la sobrenutrición durante la gestación y lactancia en la programación del tejido adiposo se han usado dos dietas principalmente: dietas alta en grasa y dietas de cafetería/alta energía (grasa y azúcar) administradas antes y durante las etapas de gestación y lactancia (Lukaszewski et al., 2013). En un modelo murino en el que se administró una dieta alta en grasa antes y durante la gestación se observó que las crías descendientes

presentaban hipertrofia en el tejido adiposo subcutáneo, a pesar de tener un peso de nacimiento similar al del grupo control (Murabayashi et al., 2013). En los modelos de obesidad materna por dietas altas en grasa durante la lactancia se ha observado que la descendencia desarrolla un crecimiento acelerado y obesidad distinguible al final del período de lactancia (Desai & Ross, 2011).

Cabe mencionar que los resultados encontrados en diversas investigaciones sobre programación del desarrollo del tejido adiposo demuestran no solo que este órgano es sensible a cambios en la nutrición durante las etapas de gestación y lactancia, sino que también cambian las propiedades del tejido adiposo en la etapa adulta de la descendencia (Lukaszewski et al., 2011). De esta forma, la nutrición antes y durante la gestación y, después en la etapa de lactancia, ejerce un papel fundamental para la correcta programación del tejido adiposo en su etapa de desarrollo y posterior desempeño en la vida adulta de la descendencia. Sin embargo, existen pocas investigaciones orientadas al estudio del efecto de micronutrientes específicos en el desarrollo y programación del tejido adiposo.

En un estudio realizado en ratas a las que se les administró por vía oral vitamina A (retinol, 3 veces la concentración de la leche materna) durante la etapa de lactancia se encontró que al día 21 de vida estas ratas suplementadas con la vitamina presentan adipocitos blancos más pequeños en el tejido adiposo inguinal, así como también una disminución transcripcional y traduccional de la proteína PPAR γ ; mientras se observó un aumento en la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular PCNA. Adicionalmente, se vio que los animales que recibieron la suplementación con vitamina A durante la lactancia son propensos a desarrollar mayor obesidad en respuesta a una dieta alta en grasa que aquellos que no recibieron la suplementación. El tejido adiposo inguinal y perigonadal de ambos sexos fue mayor en los animales suplementados respecto al grupo control (Granados et al., 2013).

En ratones se encontró que la suplementación vía oral con vitamina B3 (niacina, 15 veces el contenido de la leche materna) desde el día 2 al día 20 de nacimiento

(etapa de lactancia) afecta a los ratones macho adultos haciéndolos propensos a un mayor aumento de peso en respuesta a una dieta alta en grasa suministrada por 10 semanas desde el día 90 de vida. En el tejido adiposo inguinal de estos machos se observaron cambios en la transcripción de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos y actividad de adipocitos beige y marrón. Estas diferencias no se observaron en ratones hembra (Serrano et al., 2018).

Genes de interés en el tejido adiposo

En el presente proyecto se estudiaron los RNAm de las siguientes proteínas:

PPAR γ 2. El gen *Ppar γ 2* codifica el Receptor gama activado por proliferador de peroxisomas, el cual es un factor de transcripción que pertenece a la familia de receptores nucleares activados por hormonas (Tyagi et al., 2011). Se han identificado principalmente tres subtipos: α , β/δ y γ . El subtipo γ -2 es el de mayor expresión en tejido adiposo y es un factor transcripcional clave en el proceso de adipogénesis que da origen a adipocitos maduros a partir de fibroblastos (Moreno-Navarrete & Fernández-Real, 2012). Como factor transcripcional, PPAR γ 2 regula la transcripción de múltiples genes de proteínas implicadas en el transporte y almacenamiento de lípidos en adipocitos maduros, por lo que promueve la adipogénesis, entre sus genes diana se encuentran los que codifican las proteínas: proteína de unión a ácidos grasos (aFABP), estearil Coa desaturasa 1 (SCD-1) y ácido graso sintasa (FAS) (Moreno-Navarrete & Fernández-Real, 2012).

Pref-1. El gen *Pref-1* codifica el Factor de preadipocitos 1, el cual es una proteína transmembrana expresada por preadipocitos y cuya función es bien conocida por inhibir el proceso de diferenciación de éstos en adipocitos maduros. El mecanismo mediante el cual Pref-1 frena la adipogénesis se da por la activación del factor de transcripción Sox9, el cual tiene un efecto inhibitorio en la transcripción de los factores que dan pie a la activación de PPAR γ 2 (Y. Wang et al., 2010).

Ucp1. El gen Ucp1 codifica la proteína desacopladora 1, la cual es expresada en las mitocondrias de los adipocitos marrón y cuya función es la de disipar el gradiente de protones resultante de la cadena respiratoria generando calor, por lo que es la principal proteína del proceso termogénico no dependiente de movimiento. Además de expresarse en adipocitos marrón, se ha visto que su expresión es inducida en adipocitos beige residentes en depósitos de tejido adiposo blanco (Vargas-Castillo et al., 2017).

Actualmente existe gran interés en el estudio de los mecanismos que llevan a la inducción en la expresión de esta proteína en los adipocitos beige puesto que supone una disminución en la eficiencia metabólica por oxidación de ácidos grasos, es decir, aumenta el gasto energético de las células por la producción de energía en forma de calor desacoplado de la producción de ATP, planteándose así como un posible tratamiento de problemas de salud como la obesidad (Kajimura et al., 2015b).

Adipoq. El gen Adipoq codifica la proteína adiponectina. Esta proteína es secretada exclusivamente por adipocitos y pertenece al grupo de moléculas secretadas por el tejido adiposo conocidas como adipocinas y que tienen efecto en la regulación del metabolismo de manera endocrina. La adiponectina circula en plasma en forma de trímeros, hexámeros o en forma de complejo de alto peso molecular (Ahima, 2006). La principal función metabólica conocida para la acción de la adiponectina es la de incrementar la sensibilidad a insulina promoviendo la oxidación de ácidos grasos y la captación de glucosa en el músculo esquelético (Galic et al., 2010).

Lep. El gen Lep codifica la proteína leptina, la cual fue la primer adipocina descubierta. Es secretada principalmente por el tejido adiposo, sin embargo, también se ha rastreado su secreción hasta la pared gástrica, pared vascular, placenta, ovarios, músculo esquelético e hígado (Koerner et al., 2005). Una de las funciones más importantes de la leptina es la de dirigir el almacenamiento de lípidos hacia el tejido adiposo, evitando que éstos se acumulen en otros órganos (Ahima, 2006; Friedman & Halaas, 1998). Además, la leptina también participa en el balance energético del organismo mediante el eje Hipotálamo-adiposo

regulando el apetito y promoviendo la termogénesis en el tejido adiposo marrón (Ahima, 2006).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Efecto de la suplementación con biotina durante gestación y lactancia sobre el peso de las madres y consumo de alimento.

En un estudio previo (Tesis Doctoral Wilma Tixi-Verdugo) se encontró que la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia no modifica la ganancia de peso de las ratonas gestantes y lactantes. El peso promedio al final de la gestación fue para el control: 33.3 ± 0.6 g, y suplementado: 34.3 ± 1.0 g (Figura 6 A). El peso promedio al final de la lactancia fue para el control: 21.6 ± 0.7 g, y suplementado: 22.6 ± 0.6 g (Figura 6 B).

Adicionalmente, el análisis del consumo de alimento durante estas dos etapas tampoco reveló diferencia en la ingesta de dieta suplementada respecto a la dieta control. El peso promedio de alimento consumido durante la gestación por el grupo control fue de 0.33 ± 0.01 g de alimento/g de peso corporal y por el suplementado fue de 0.31 ± 0.01 g de alimento/g de peso corporal. (Figura 6 C). Durante la lactancia el peso promedio de alimento consumido por el grupo control fue 0.65 ± 0.004 g de alimento/g de peso corporal y por el grupo suplementado 0.56 ± 0.003 g de alimento/g de peso corporal (Figura 6 D).

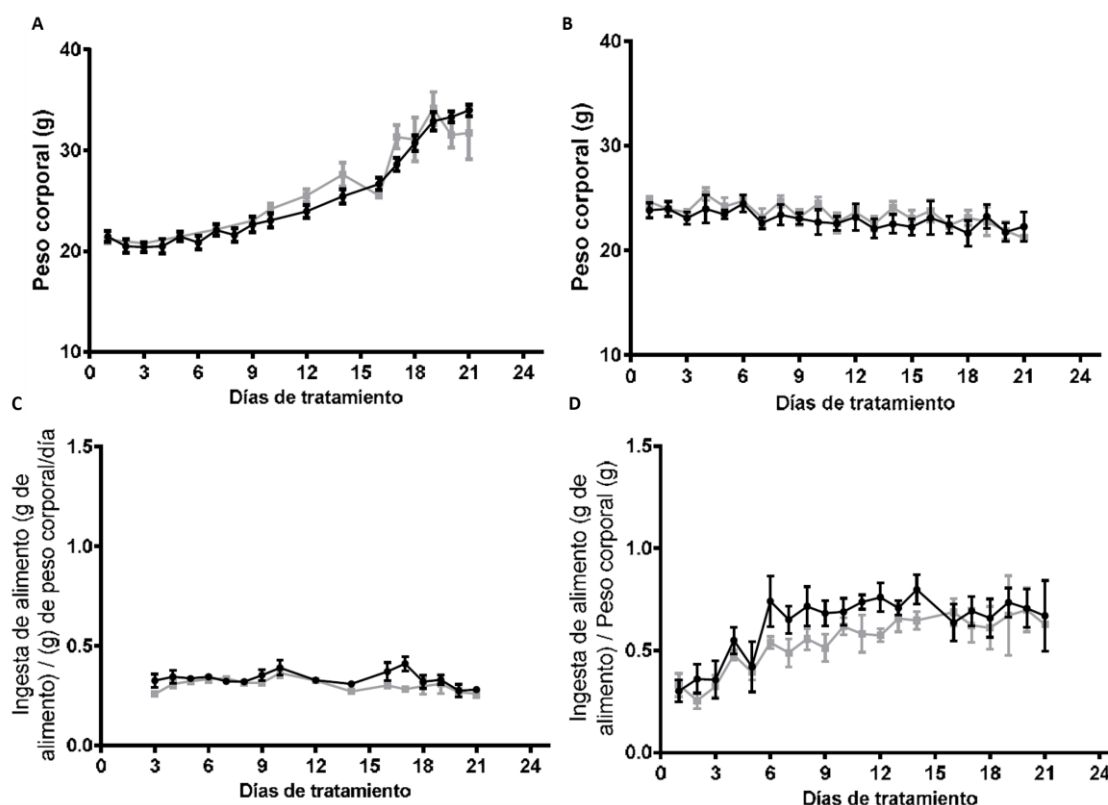


Figura 6. Efecto de la suplementación con biotina sobre el peso corporal de las madres y la ingesta de alimento durante la gestación y la lactancia. **A)** Peso corporal durante la gestación. **B)** Peso corporal durante la lactancia. **C)** Ingesta de alimento durante la gestación. **D)** Ingesta de alimento durante la lactancia. Control en negro, suplementado en gris. n = 16 ratones para cada grupo. Los datos representan la media \pm EE. La significancia se evaluó mediante un ANOVA (dieta, tiempo). * $p < 0.05$ comparado con el control.

Efecto de la suplementación con biotina durante gestación y lactancia sobre el peso corporal de las crías.

En el análisis del peso de las crías al día 21 de vida, día de su destete, se observó que la suplementación con biotina no modifica el peso de las crías del grupo suplementado respecto al control. El peso promedio de las crías al día 21 de vida fue de 7.01 ± 0.26 g para el control y 6.39 ± 0.22 g para el suplementado (Figura 7).

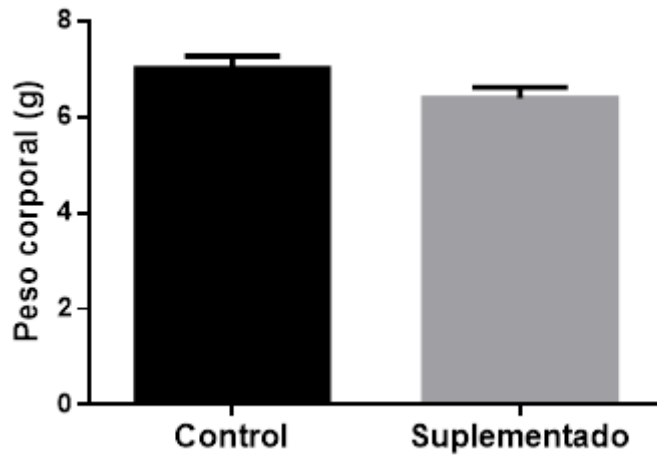


Figura 7. Efecto de la suplementación con biotina durante la gestación y la lactancia en el peso corporal de las crías macho al momento del destete. Control en negro, suplementado en gris. n= 21 ratones en casa grupo. Los valores representan la media \pm EE. * $p < 0.05$ comparado con el control. Prueba T-student.

HIPÓTESIS

Dado que concentraciones farmacológicas de biotina administradas después del destete modifican el metabolismo de lípidos y la expresión génica de proteínas adipogénicas en el tejido adiposo, la administración de una dieta suplementada con biotina durante los períodos de gestación y lactancia modifica el desarrollo de este tejido en las crías macho.

OBJETIVO

Analizar los efectos de la suplementación con biotina durante la gestación y lactancia en la morfología y expresión de genes en el tejido adiposo de crías.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el efecto de la suplementación con biotina en el tejido adiposo durante la gestación y lactancia analizando:

1. Peso de los diferentes depósitos de tejido adiposo extraídos.
2. Morfología del tejido adiposo mediante tinción con Eosina-Hematoxilina.
3. La expresión del RNAm de proteínas reguladoras de la adipogénesis como: el receptor gama activado por proliferador de peroxisomas (PPAR γ) y el factor de preadipocitos 1 (Pref-1). Proteínas de funcionalidad del tejido adiposo blanco como leptina (Lep) y adiponectina (Adipoq) y, la proteína desacoplante 1 (Ucp-1), característica de adipocitos marrón y beige.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo animal

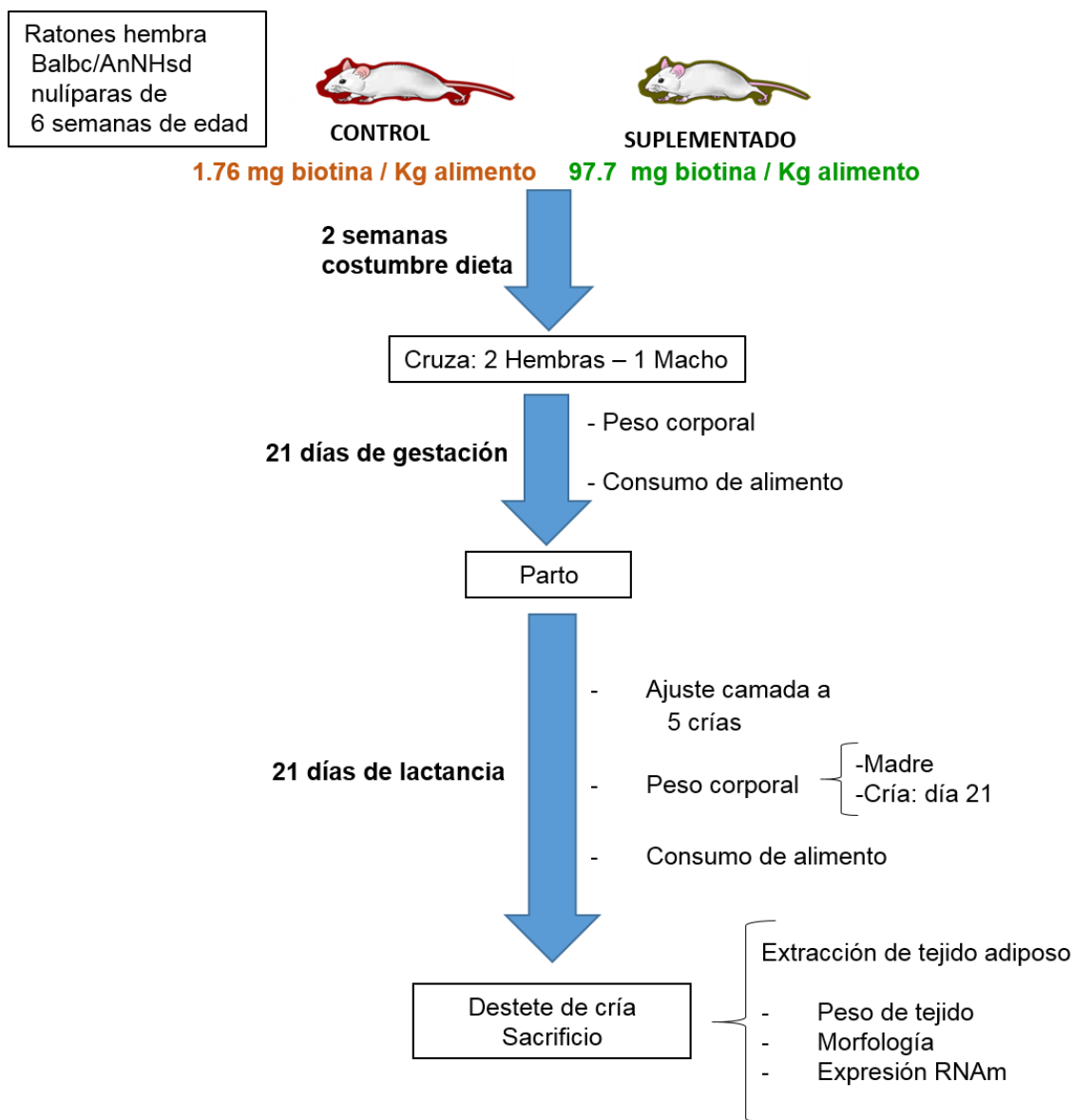


Figura 8. Diseño experimental.

Ratones de la cepa Balbc/AnNHsd de 6 semanas de edad se dividieron en dos grupos: el primero se alimentó con una dieta control (HarlanTeklad TD-01362, con 1.76 mg de biotina/kg alimento), el segundo grupo se alimentó con una dieta suplementada con biotina (HarlanTeklad TD-01363, con 97.7 mg de biotina/kg de alimento). Dos semanas después se cruzaron dos hembras con un macho por jaula, a los tres días fueron separados. Durante el período de gestación se realizaron mediciones de peso corporal y consumo de dieta día de por medio. Al

momento del nacimiento se ajustaron las camadas a cinco crías por madre; peso de la madre y consumo de dieta fue registrado día de por medio. Al día 21 de vida (destete) las crías fueron sacrificadas con un ayuno de 8 horas previa anestesia con Sevofluorane y se extrajeron los depósitos de tejido adiposo perigonadal, inguinal, blanco interescapular y marrón interescapular. Los depósitos fueron pesados y se relacionó el peso de tejido con el peso del animal. Ver figura 8.

Los ratones utilizados en el presente proyecto fueron manejados de acuerdo con el procedimiento estándar establecido por el Comité Ético de Experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Análisis morfológico de tejido adiposo

Los diferentes depósitos de tejido adiposo extraído fueron fijados en formalina amortiguada al 10%, deshidratados en una serie de concentraciones crecientes de etanol y xilol (etanol 50%, 70%, 90%, 96%, etanol 100%/xilol y xilol 100%, una hora en cada uno), luego de estos los tejidos fueron embebidos en paraplast (SherwoodMedical Co.), dos baños de una hora cada uno. Los tejidos se montaron en cassetes, se incluyeron en paraplast y se realizaron cortes de 5 um de grueso. Los cortes se montaron en laminillas tratadas con Poly-L-lisina. (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA).

Los cortes en las laminillas se desparafinaron y rehidrataron en una serie de xilol-etanol en orden inverso a la serie de deshidratación, 3 minutos para xilol y 4 minutos para el etanol. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y se tomaron 6 o 9 fotografías a 40x por cada ratón (dependiendo del tamaño del corte) en un microscopio Olympus BX51-WI DSU acoplado a una cámara Hamamatsu C9100 EM-CCD. El área de las gotas de grasa fue cuantificada usando el software libre Image J 1.40 (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD).

El tejido adiposo perigonadal extraído se seccionó en tres partes iguales (proximal, mediano y distal) al momento de tomar las fotografías, teniendo como referencia de origen el epidídimo.

Análisis de abundancia relativa de mRNA

Los tejidos extraídos fueron almacenados en 1 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y homogenizados usando un equipo Polytron (PT-1035, POLYTRON) durante un minuto en ciclos de 20 segundos, manteniendo los tubos en baño de hielo. El RNA total fue extraído usando Trizol siguiendo el protocolo del fabricante. Todo el material usado en la extracción fue previamente esterilizado y tratado con dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma-Aldrich). La pureza y cuantificación del RNA se realizó por espectrofotometría a 260 y 280 nm en un equipo lector de microplacas Sinergy HT (BioTeck Instruments, Inc), teniendo como índice de pureza la relación RNA/proteína (relación de absorbancias 260/280 >1,9); la integridad del RNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La síntesis del cDNA se realizó mediante la enzima retrotranscriptasa SuperScript III (Invitrogen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Fue usado un equipo termociclador GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems). Se obtuvieron muestras de cDNA con una concentración de 25 ng/uL. Se utilizaron los siguientes componentes para 20 uL de reacción de retrotranscripción para cada muestra.

Tabla 1. Componentes de reacción de retrotranscripción.

Reactivo	Cantidad
10 mM dNTP Mix (Invitrogen)	1
3 ug/uL Random Primer (Invitrogen)	0.5
Agua DEPC 0.1 % + muestra RNA	12.5
Buffer RT 5X (Invitrogen)	4
0.1 M DTT (Invitrogen)	1
SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)	1

La reacción de PCR se realizó usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y oligonucleótidos sintetizados en la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Adicionalmente, se usaron algunas sondas Taqman (Thermo Fisher Scientific) para la medición de la expresión de genes diferentes para los que se usó TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para 10 uL de reacción se usaron 5 uL de SYBR, 0.5 uL de oligonucleótido delantero, 0.5 uL de oligonucleótido reverso, 3 uL de agua desionizada estéril 0.1% DEPC y 1 uL del cDNA sintetizado. Para 12 uL de reacción se usaron 6 uL TaqMan Mix, 1 uL de sonda TaqMan, 4 uL de agua desionizada estéril 0.1% DEPC y 1 uL de cDNA sintetizado. Se utilizó un equipo ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) con capacidad para leer placas de 96 pozos y se obtuvo el valor de ciclo umbral Ct. Cada muestra fue analizada por triplicado y la expresión relativa de los genes se determinó mediante el método $\Delta \Delta Ct$, usando como control interno de expresión el gen Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT). En la tabla 2 se muestran los oligonucleótidos diseñados mediante la herramienta “Primer-BLAST” de la base de datos PubMed.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados

RNAm	Iniciadores	Secuencia 5' → 3'
HPRT	Sentido	GTT GGG CTT ACC TCA CTG CT
	Anti sentido	TAA TCA CGA CGC TGG GAC TG
UCP-1	Sentido	GGA TGG TGA ACC CGA CAA CT
	Anti sentido	GCT GAA ACT CCG GCT GAG AA
Lep	Sentido	CCA GGA TGA CAC CAA AAC CCT
	Anti sentido	GAT ACC GAC TGC GTG TGT GA
Pref-1	Sentido	CCC TGC GTG ATC AAT GGG TAA
	Anti sentido	CCT CTG GGT TAG GCT GGA AG

Tabla 3. Sondas TaqMan utilizadas

RNAm GenBank	Sonda TaqMan
HPRT	Mm00446968_m1
Ppar γ	Rn00440945_m1
Dlk1 (Pref-1)	Mm00x94477_m1
Adipoq	Mm00456425_m1

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc. USA). Los datos de gráficas y tablas se presentan como la media \pm error estándar (EE) y se analizaron con la Prueba t-Student para datos paramétricos y la prueba u de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Se consideró una significancia estadística con un valor de p menor o igual a 0.05 (* $p \leq 0.05$).

RESULTADOS

Efecto de la dieta suplementada con biotina durante la gestación y la lactancia sobre la cantidad de tejido adiposo de las crías

En la figura 9 se indica la cantidad de diferentes depósitos de tejido adiposo. Se observó una disminución significativa en la cantidad de los depósitos de tejido adiposo blanco inguinal e interescapular respecto al peso corporal del animal. En los depósitos de tejido adiposo blanco perigonadal y en el tejido adiposo marrón interescapular no se presentaron cambios significativos.

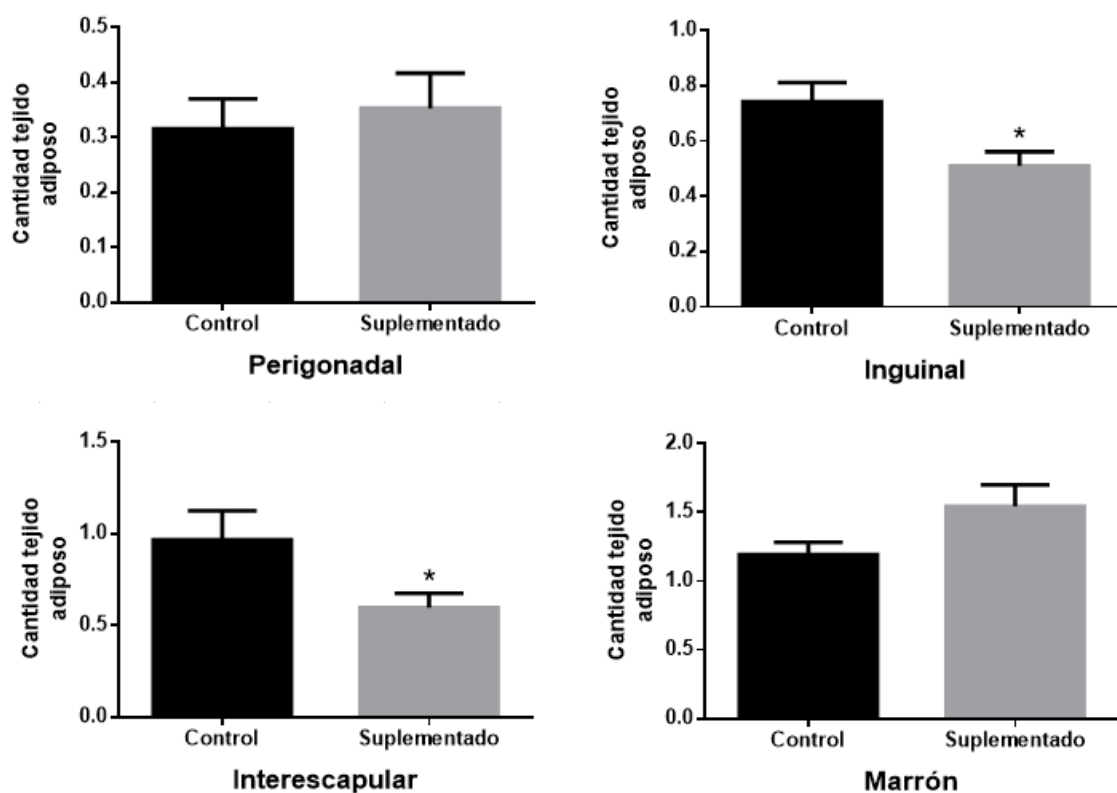


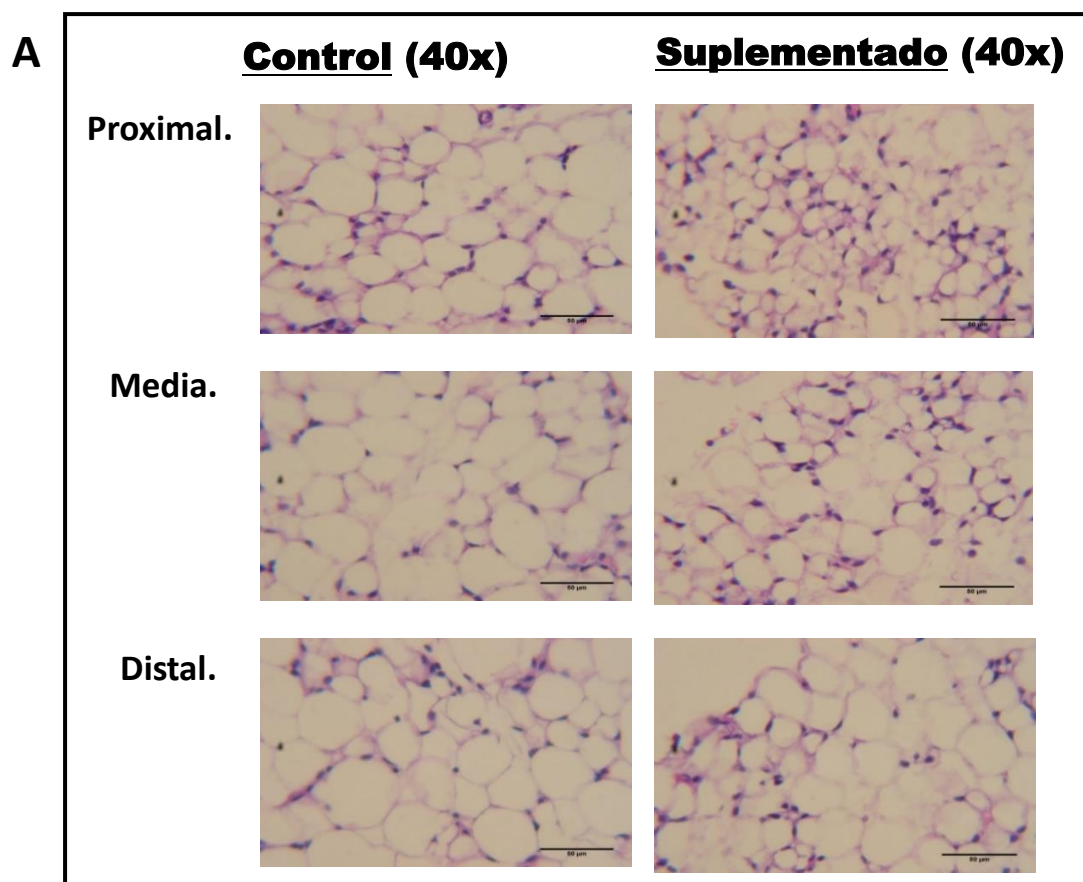
Figura 9. Porcentaje del peso corporal de los depósitos de tejido adiposo. Control en negro (n = 9), suplementado en gris (n = 16). Los datos representan la media \pm EE. * $p < 0.05$ comparado con el control. Prueba T-student.

Efecto de la dieta suplementada con biotina durante la gestación y la lactancia sobre el tejido adiposo perigonadal

Efecto en la morfología del tejido adiposo perigonadal

En la figura 10 se observa la comparación del área de los adipocitos blancos del tejido adiposo perigonadal en las tres partes seccionadas del grupo suplementado respecto al grupo control. Se observa que en la distancia próxima y mediana al epidídimo los adipocitos blancos del grupo suplementado tienen

menor área respecto a los adipocitos blancos de las mismas secciones del tejido extraído de los ratones del grupo control. En la distancia próxima al epidídimo los adipocitos tienen un área promedio de $325.2 \pm 14.16 \text{ um}^2$ en el grupo control y $282.9 \pm 10.40 \text{ um}^2$ en el suplementado. En la distancia media $407.2 \pm 16.84 \text{ um}^2$ en el control y $350.3 \pm 18.89 \text{ um}^2$ en el suplementado. En la distancia distal $396.7 \pm 19.30 \text{ um}^2$ en el control y $406.5 \pm 19.98 \text{ um}^2$ en el suplementado. Es interesante mencionar que este depósito no presentó cambio en la cantidad en los ratones del grupo suplementado, sin embargo, sí se observa un cambio morfológico.



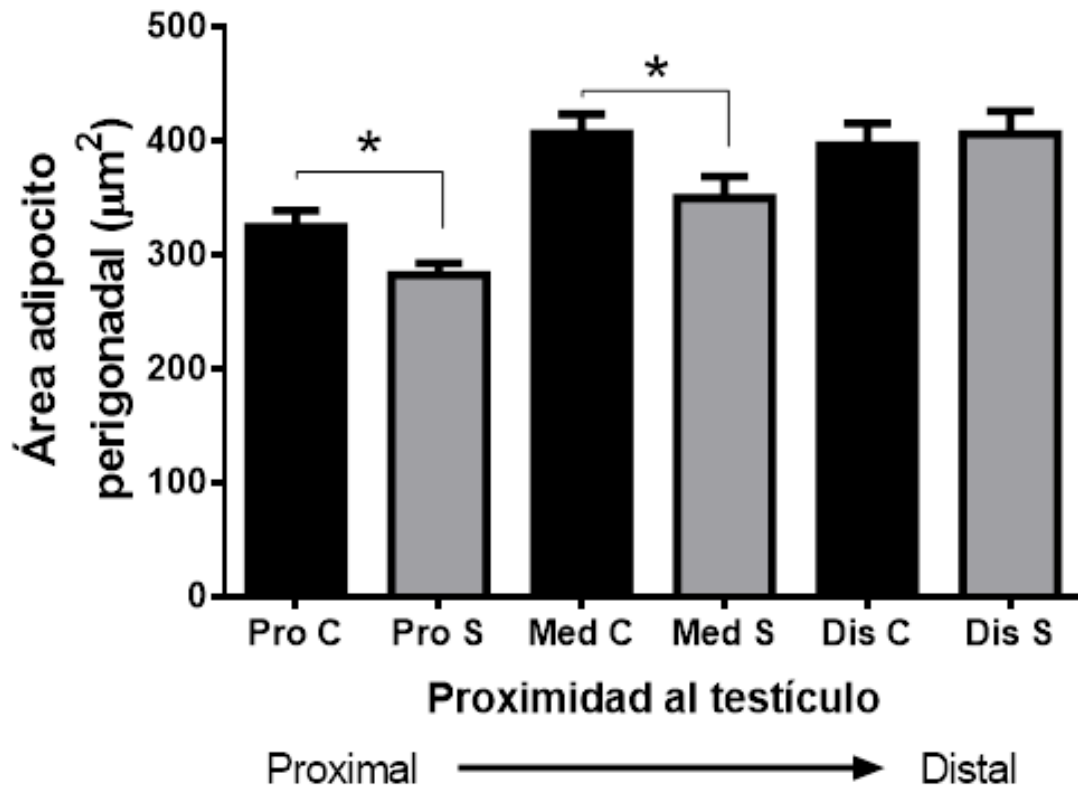


Figura 10. Comparación de área de adipocitos blancos por secciones del tejido adiposo perigonadal. **A)** Imagen representativa de la tinción con Hematoxilina & eosina del tejido adiposo perigonadal dividido por secciones respecto a la distancia del epidídimo. **B)** Área adipocito blanco en tejido adiposo perigonadal. Control en negro, suplementado en gris. n = 3 ratones por grupo; distancia proximal 425 células contadas en el grupo control, 594 en el suplementado; distancia medial 392 células contadas en el grupo control, 497 en el suplementado; distancia distal 395 células contadas en el grupo control, 443 en el suplementado. Los datos representan la media \pm EE. * $p < 0.05$ comparado con el control. Prueba T-student.

Efecto en la expresión génica en el tejido adiposo perigonadal

En la figura 11 se indica la comparación en la expresión los genes Ucp-1, Ppar γ , Pref-1 y Lep entre el grupo control y el grupo suplementado. No se observó

cambio en la expresión de alguno de los genes producto de la suplementación con biotina.

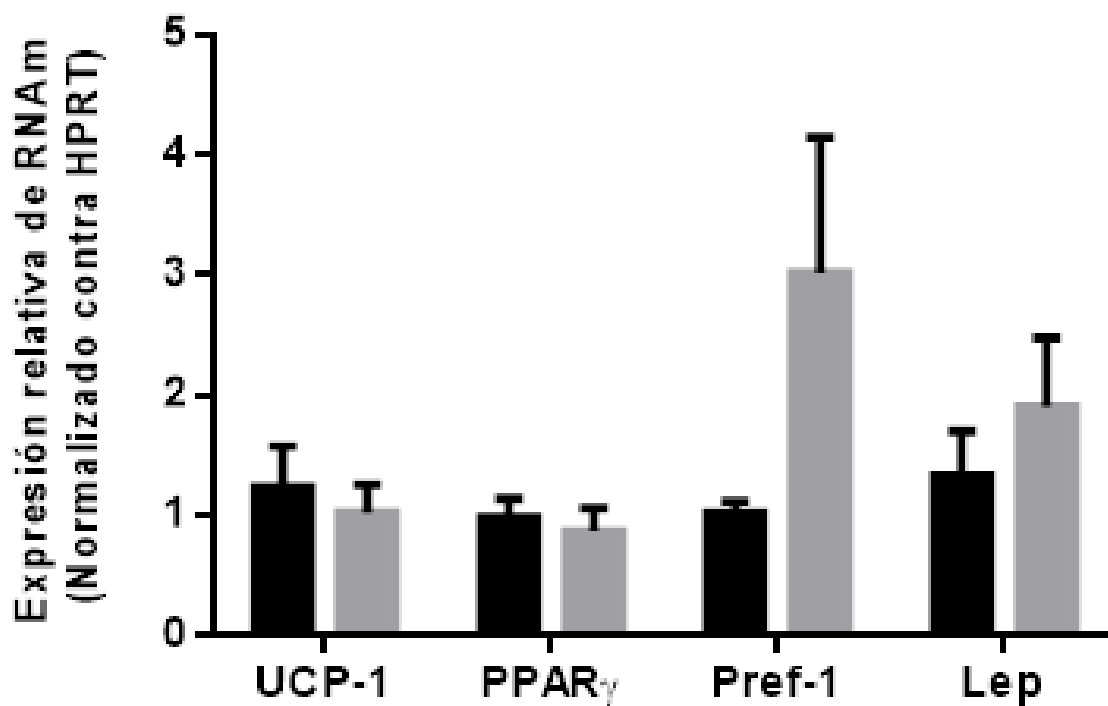


Figura 11. Expresión relativa de RNAm de diferentes genes en el tejido adiposo perigonadal. Control en negro, suplementado en gris. Ucp-1 n = 5 control, 7 suplementado; Ppary n = 7 control, n = 8 suplementado; Pref-1 n = 6 control, n = 5 suplementado; Lep n = 7 control, n = 7 suplementado. Los datos representan la media \pm EE del grupo control. *p<0.05 comparado con el control. Prueba T-student.

Efecto de la dieta suplementada con biotina durante la gestación y la lactancia sobre el tejido adiposo inguinal

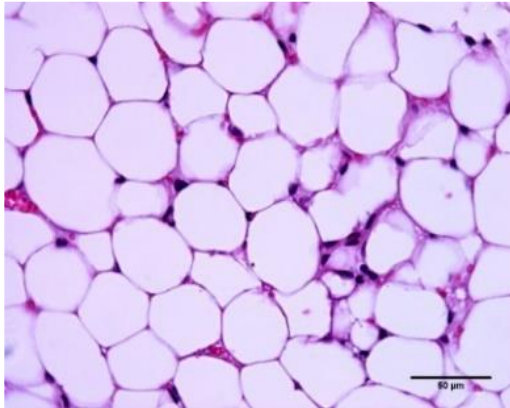
Efecto en la morfología del tejido adiposo inguinal

La figura 12 muestra el análisis histológico comparando el área de los adipocitos blancos. Se observa una menor área en los adipocitos del grupo suplementado

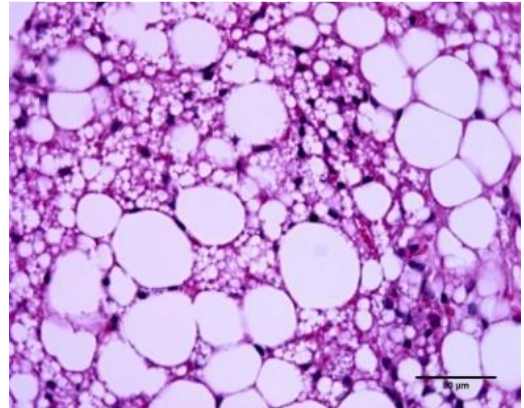
respecto al grupo control. Los adipocitos de las crías del grupo control presentan un área promedio de $982.2 \pm 23.49 \mu\text{m}^2$, los del grupo suplementado $751.4 \pm 16.75 \mu\text{m}^2$. Adicionalmente, se observa en la imagen representativa de la morfología del tejido adiposo inguinal del grupo suplementado áreas que se asemejan más a la morfología del tejido adiposo marrón que a la del tejido adiposo blanco.

A

CONTROL (40x)



SUPLEMENTADO (40x)



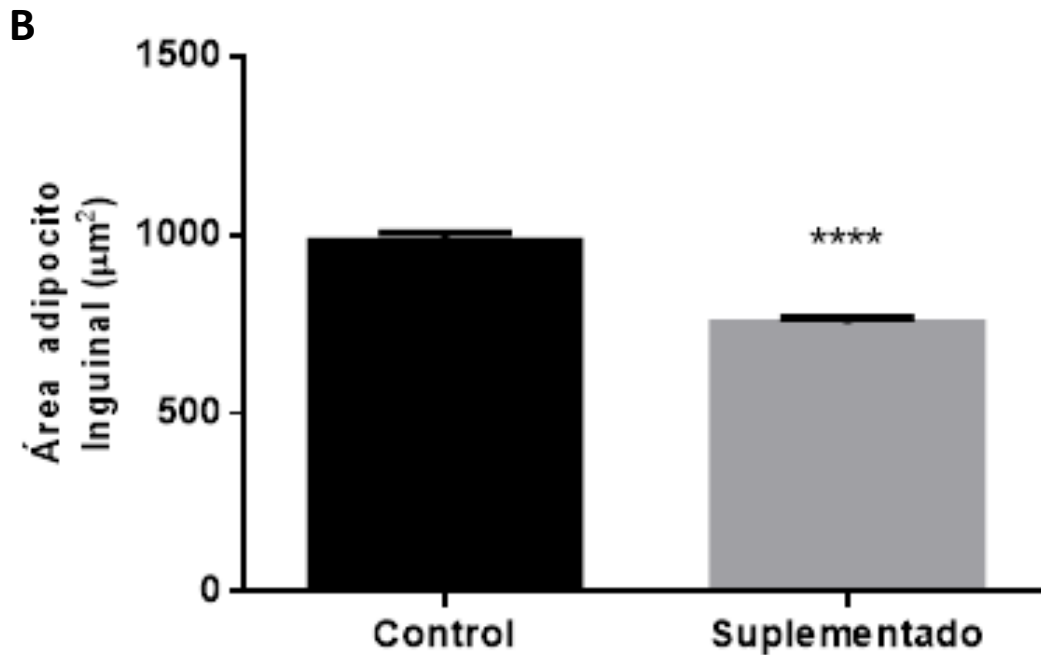


Figura 12. Comparación de áreas de adipocitos blancos de tejido adiposo inguinal. **A)** Imagen representativa de la tinción con Hematoxilina-eosina del tejido adiposo inguinal. **B)** Área adipocito blanco en tejido adiposo inguinal. Control en negro, suplementado en gris. n = 4 ratones por grupo, 1400 células contadas en el grupo control, 1260 en el suplementado. Los datos representan la media \pm EE. Prueba U de Mann-Whitney. ****p<0.0001 comparado con el control.

El análisis de la distribución de frecuencias evidenció mayor frecuencia de adipocitos con áreas de 500 a 1000 μm^2 en el grupo suplementado respecto al grupo control. Ver figura 13.

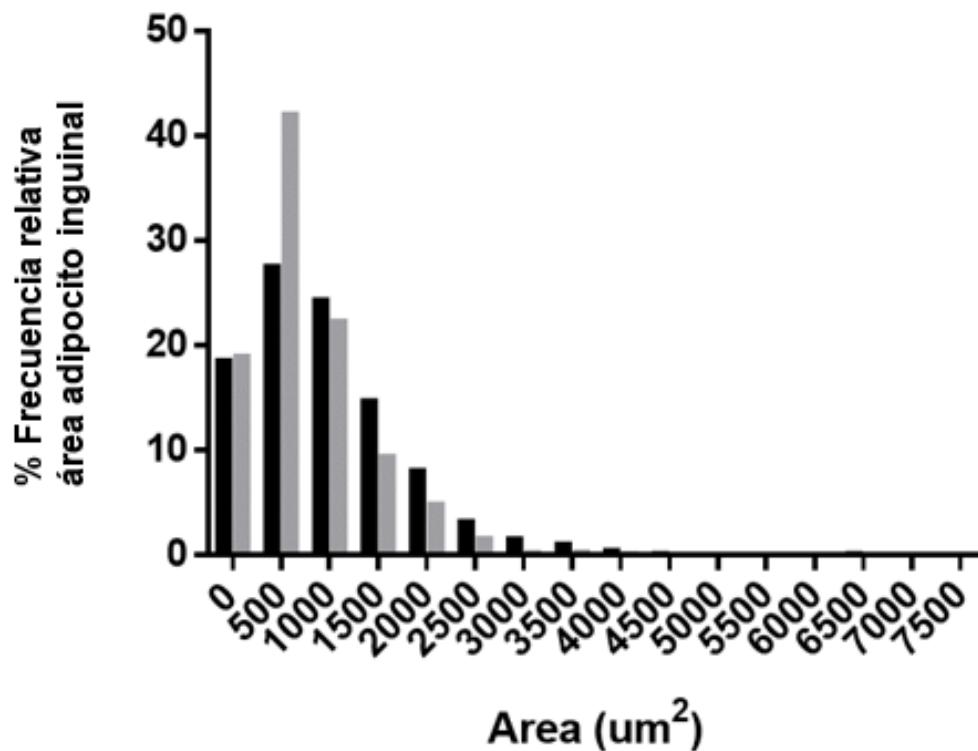


Figura 13. Distribución de frecuencias relativas de área de adipocitos blancos en tejido adiposo inguinal. Control en negro, suplementado en gris, n = 4 ratones por grupo.

Efecto en la expresión génica en el tejido adiposo inguinal

La figura 14 indica la comparación en la expresión los genes Ucp-1, Ppar γ , Pref-1, Lep y Adipo q entre el grupo control y el grupo suplementado. No se observó cambio en la expresión de alguno de los genes producto de la suplementación con biotina.

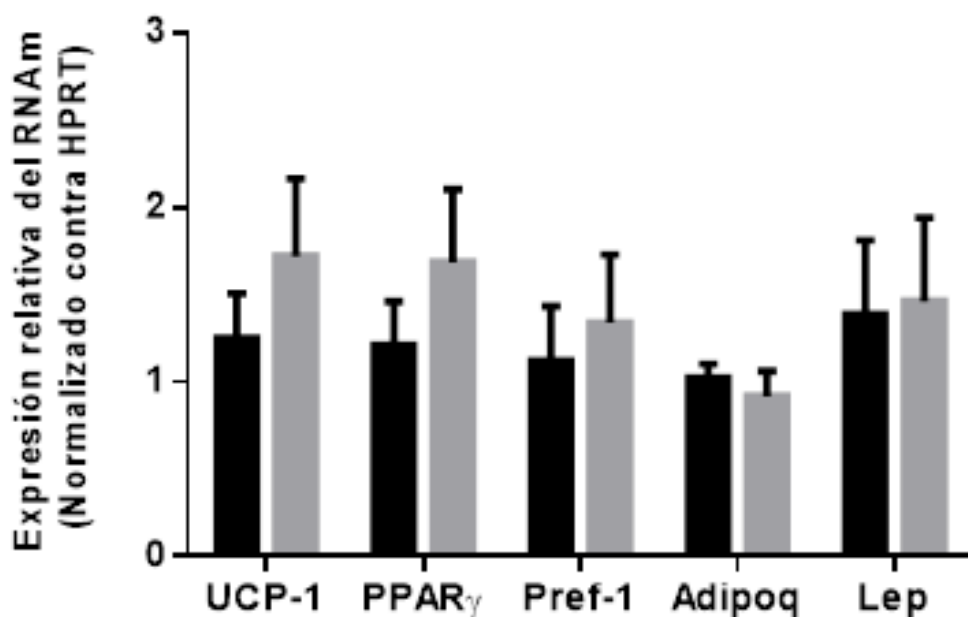


Figura 14. Expresión relativa de mRNA de diferentes genes en el tejido adiposo inguinal. Control en negro, suplementado en gris. Ucp-1 n = 8 control, 7 suplementado; Ppar γ n = 8 control, n = 7 suplementado; Pref-1 n = 5 control, n = 7 suplementado; Adipoq n = 8 control, n = 8 suplementado; Lep n = 8 control, n = 7 suplementado. Los datos representan la media \pm EE. *p<0.05 comparado con el control. Prueba T-student.

Efecto de la dieta suplementada con biotina durante la gestación y la lactancia en la morfología del tejido adiposo blanco interescapular

En la figura 15 se indica el análisis morfológico del tejido adiposo interescapular. Se observó de nuevo una disminución significativa en el área de adipocitos blancos en el tejido de las crías del grupo suplementado respecto al grupo control ($1016 \pm 31.65 \text{ um}^2$ control y $706 \pm 17.82 \text{ um}^2$ suplementado).

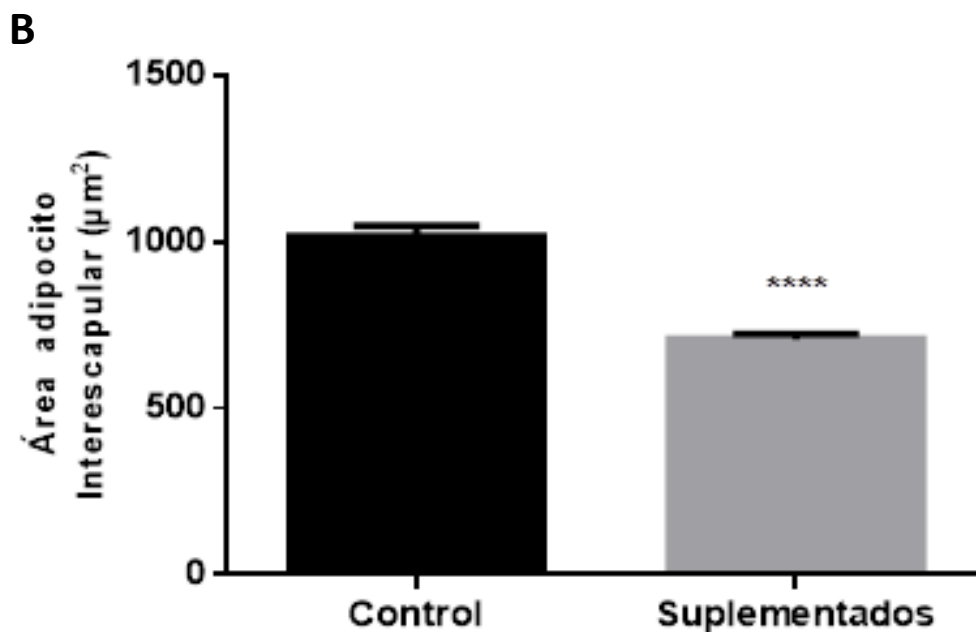
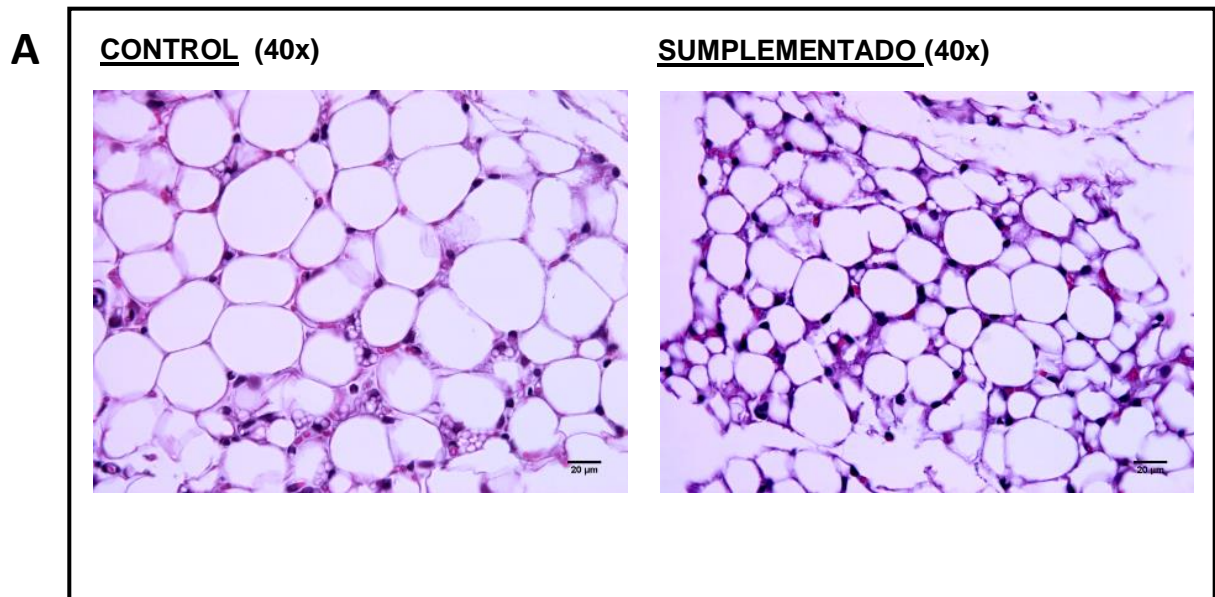


Figura 15. Comparación de áreas de adipocitos blancos de tejido adiposo interescapular. **A)** Imagen representativa de la tinción con Hematoxilina & eosina del tejido adiposo interescapular. **B)** Área adipocito blanco en tejido adiposo interescapular. Control en negro, suplementado en gris. n = 3 ratones por grupo, 551 células contadas en el grupo control, 658 en el suplementado. Los datos representan la media \pm EE. Prueba U de Mann-Whitney. ****p<0.0001 comparado con el control.

Una vez más, el análisis de la distribución de frecuencias en este tejido evidenció mayor frecuencia de adipocitos con áreas de 500 a 1000 μm^2 en el grupo suplementado respecto al grupo control, comportamiento similar al observado en el tejido adiposo inguinal. Ver figura 16.

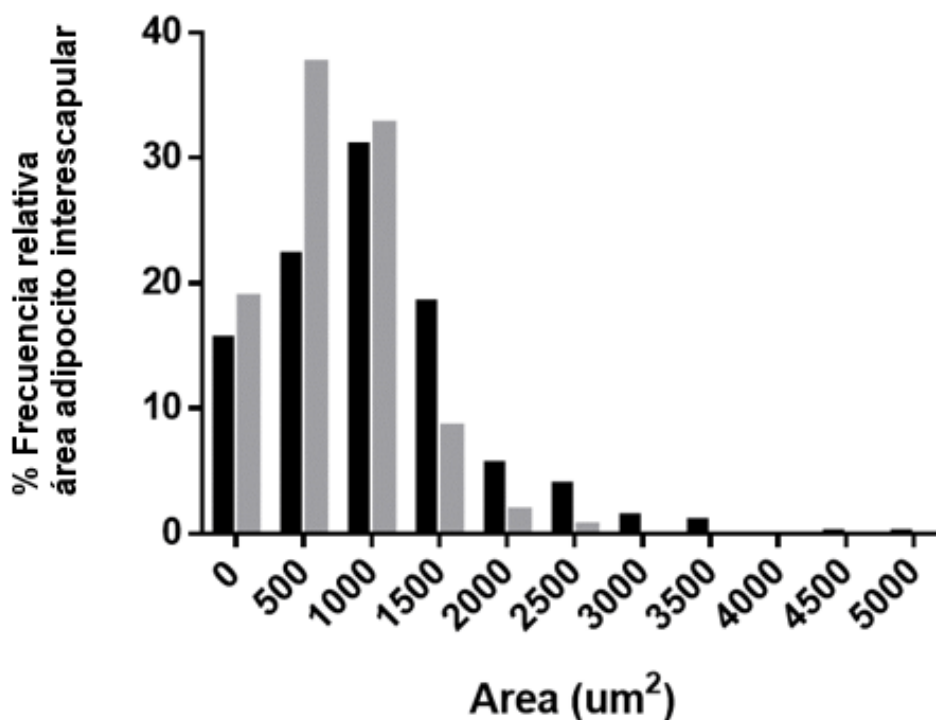


Figura 16. Distribución de frecuencias relativas de área de adipocitos blancos en tejido adiposo interescapular. Control en negro, suplementado en gris. n = 3 ratones por grupo.

Efecto de la dieta suplementada con biotina durante la gestación y la lactancia sobre el tejido adiposo marrón interescapular

Efecto en la morfología del tejido adiposo marrón interescapular

En la figura 17 se indica una fotografía representativa tomada de la tinción de hematoxilina-eosina en cortes histológicos del tejido adiposo marrón

interescapular. No se observaron diferencias apreciables entre el tejido suplementado y el tejido control.

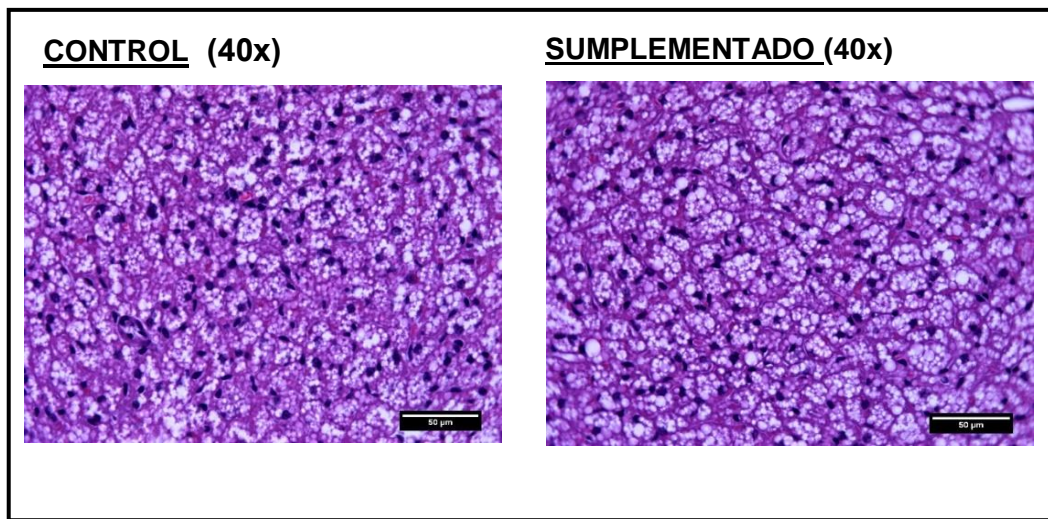


Figura 17. Imagen representativa de la tinción hematoxilina-eosina del tejido adiposo marrón interescapular

Efecto en la expresión génica en el tejido adiposo marrón interescapular

En la figura 18 se indica la comparación de la expresión del gen termogénico Ucp-1 en el tejido adiposo marrón interescapular entre el grupo control y el grupo suplementado. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en la expresión del gen producto de la suplementación con biotina.

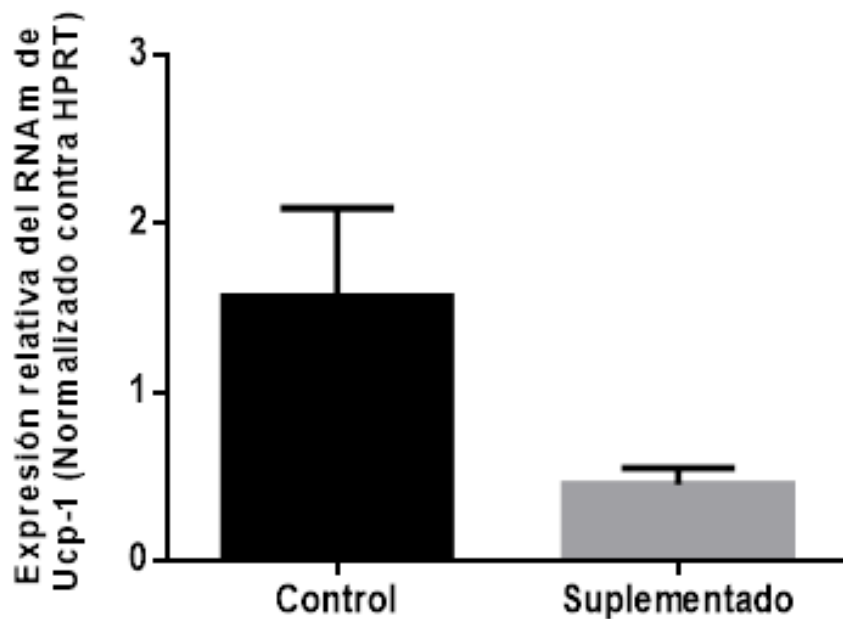


Figura 18. Expresión relativa de RNAm de Ucp1 en el tejido adiposo marrón interescapular. Control en negro (n = 7), suplementado en gris (n = 6). Los datos representan la media \pm EE.

DISCUSION

Actualmente se sabe que en mamíferos la nutrición de la madre durante la gestación y la lactancia es fundamental para el desarrollo de diversos órganos de la descendencia. Estos órganos durante sus etapas de desarrollo y/o maduración son sensibles a la alimentación de la madre, efecto al que se le ha denominado “programación del desarrollo” (Calkins & Devaskar, 2011). Particularmente, en el tejido adiposo se ha estudiado el efecto de cambios en la ingesta calórica de la madre durante la gestación y lactancia sobre el desarrollo del tejido adiposo de la descendencia, así como también el funcionamiento del mismo durante la etapa adulta (Lukaszewski et al., 2013).

Estudios realizados en mujeres durante gestación y lactancia han encontrado alteraciones en biomarcadores del metabolismo de la biotina, revelando que

existe una deficiencia de ésta durante las etapas de gestación y lactancia (Horvath et al., 2011; Perry et al., 2014), por lo que se ha acuñado el término de deficiencia marginal de biotina (Mock et al. 1997). Dicha deficiencia sugiere que es necesario aumentar la ingesta diaria de biotina durante estas dos etapas para suplir la demanda metabólica del micronutriente (Perry et al., 2014). Sin embargo, existen pocas investigaciones orientadas al estudio del efecto de micronutrientes como la biotina en el desarrollo y programación del tejido adiposo. En el presente proyecto se demostró por primera vez que la suplementación con biotina en ratones durante gestación y lactancia modifica el desarrollo del tejido adiposo de las crías.

En este proyecto encontramos que la suplementación con biotina durante la gestación y lactancia causa una disminución en la cantidad de tejido adiposo en los depósitos inguinal e interescapular (depósitos subcutáneos), no siendo así en el depósito perigonadal (depósito visceral) ni en el marrón interescapular. Esta disminución podría evidenciar una mayor sensibilidad al efecto de la vitamina por parte del tejido adiposo blanco subcutáneo al efecto de la suplementación con biotina respecto al tejido adiposo marrón interescapular y el blanco visceral.

Cabe mencionar que en un estudio anterior (Tesis Doctoral Wilma Tixi-Verdugo) no se observaron diferencias en la ganancia de peso corporal y consumo de alimento de ratones hembra durante las etapas de gestación y lactancia. Paralelamente, no hubo cambio en el peso corporal de las cría macho al día 21 de vida y, en concordancia con estos resultados, se observó que el peso de diferentes órganos como el páncreas, hígado y testículos en estas crías tampoco presentó cambios. Por lo tanto, encontrar una disminución en la cantidad de tejido adiposo en crías del grupo suplementado con biotina, es indicio de que el desarrollo del tejido adiposo de las crías es especialmente sensible a la suplementación con la vitamina.

Diferencias tejido-específicas en la sensibilidad del desarrollo de los tejidos se han encontrado también en otros modelos experimentales. Desai y colaboradores encontraron una respuesta selectiva del crecimiento de los

órganos en ratas cuyas madres fueron alimentadas con dietas de restricción de proteínas, siendo el cerebro el órgano menos propenso a variar su peso (Desai et al., 1996). En cuanto a investigaciones con otras vitaminas, un estudio realizado en ratas encontró que la suplementación vía oral con vitamina A durante la etapa de lactancia produce una disminución en el área de adipocitos blancos en el tejido adiposo inguinal, sin afectar el peso del animal, peso del hígado y la cantidad total de tejido adiposo al día 21 de vida (Granados et al., 2013).

Los estudios morfológicos revelaron una disminución en el área de adipocitos blancos de los depósitos de tejido adiposo inguinal e interescapular, lo que podría deberse a una menor adipogénesis. Sin embargo, en el análisis de la expresión de RNAm Ppar γ y Pref-1 en el tejido adiposo inguinal no se observó diferencia significativa. Tampoco hubo diferencia en la expresión del RNAm de los marcadores de adipocitos blancos Adipoq y Lep. Una posible relación entre la diferencia morfológica y la expresión génica podría estar dada sobre la transcripción y/o traducción de las enzimas lipogénicas responsables de la acumulación de grasa del tejido adiposo blanco. En apoyo a esta posibilidad estudios en el laboratorio en ratones adultos que fueron alimentados con esta misma dieta suplementada con biotina a partir del destete se encontró una disminución en genes lipogénicos en el tejido adiposo: SREBP1c, ACC1, FAS y PPAR γ (Larrieta et al., 2010).

Debido a que el estudio histológico realizado reveló semejanzas de la morfología del tejido adiposo blanco con la del tejido adiposo marrón también se analizó la expresión génica de un marcador de estos adipocitos, Ucp-1, cuya expresión no mostró cambios con respecto al grupo control en los depósitos inguinal y perigonadal, lo que sugiere que el cambio morfológico observado en estos tejidos no está relacionado con la aparición de adipocitos beige y/o marrón.

El análisis del tejido perigonadal, cuyo desarrollo ocurre después del nacimiento (Q. A. Wang et al., 2013a), no mostró diferencias en la cantidad del tejido adiposo y la expresión de los genes medidos, Ppar γ , Pref-1, Lep y Ucp-1. Interesantemente, en el análisis histológico se encontró una disminución en el área de adipocitos blancos con respecto a la distancia del epidídimo, desde

donde se comienza a desarrollar el depósito de adipocitos (J. Han et al., 2011), revelando una vez más una disminución en el tamaño de los adipocitos blancos sin relación aparente con la expresión de los genes medidos. Desafortunadamente, la poca cantidad disponible de este depósito impidió el análisis de la expresión génica por segmentos.

La disminución en la cantidad de tejido adiposo se observó en dos depósitos subcutáneos, pero no en el depósito de tejido perigonadal, el cual se clasifica como visceral. Esta diferencia podría deberse a uno o varios factores en conjunto. Uno de estos es el tiempo en que se desarrolla cada depósito: dado que en ratones el tejido adiposo subcutáneo se desarrolla durante la última semana de gestación, en nuestro modelo el desarrollo de los depósitos inguinal e interescapular estuvo todo el tiempo cubierto con la dieta suplementada con biotina. Por otro lado, el tejido perigonadal se desarrolla durante el período posnatal y puede extenderse algunas semanas después del destete (Q. A. Wang et al., 2013b), por lo que es posible que al día que se extrajeron los tejidos el tejido perigonadal no estuviese completamente desarrollado y por esta razón la biotina solo afectara parcialmente su desarrollo.

Otro factor a tener en cuenta es la diferencia génica, de desarrollo, de capacidad y hasta de respuesta a diversas señales tanto internas como externas entre estos depósitos (Berry et al., 2013b; Williams et al., 2014) que pueden hacer un tejido más sensible al efecto de la biotina que otro, dando en este caso los tejidos subcutáneos mayor respuesta que el perigonadal. Ambas posibilidades son apoyadas por el hecho de que la disminución en el área de los adipocitos blancos observada en el tejido inguinal e interescapular es muy marcada, no siendo así en el tejido perigonadal.

A diferencia de los cambios observados en la cantidad y morfología de los otros depósitos de tejido adiposo, en el tejido marrón interescapular no encontramos diferencia entre el grupo control y suplementado en la cantidad de tejido, ni en la expresión de su gen marcador Ucp-1. Lo que evidencia un efecto diferente de la suplementación con biotina entre tejido adiposo blanco y marrón.

Finalmente, se sabe que la biotina también modifica la expresión génica a nivel post-transcripcional (Fernandez-Mejia & Lazo-de-la-Vega-Monroy, 2011). Collins y colaboradores encontraron que la expresión del receptor de asialoglicoproteína se encontraba disminuida en células HepG2 deficientes de biotina. La adición de biotina o biocitina al medio restauraba la expresión de la proteína receptor sin modificar la expresión del RNA mensajero (Collins et al., 1988). En otro estudio se encontró cambios en la expresión de proteínas no es paralelo a cambios en la abundancia de sus RNA mensajero (Rodriguez-Melendez et al., 2005). Esta evidencia sugiere que en el estudio del efecto de la suplementación de biotina durante la gestación y la lactancia en el tejido adiposo de las crías es necesario incluir análisis de la expresión de proteínas con el fin de esclarecer el mecanismo y/o factores involucrados en los cambios observados en el desarrollo del tejido.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente proyecto indican que la de la suplementación con biotina, durante la gestación y la lactancia, afecta de manera diferente el desarrollo de los diferentes depósitos y tipos de tejido adiposo, disminuyendo la cantidad de tejido adiposo blanco subcutáneo pero no de visceral, así como tampoco cambia la cantidad de tejido adiposo marrón. Será interesante estudiar en el futuro cómo influye en la programación y funcionalidad del tejido adiposo en la vida adulta de los ratones.

CONCLUSIONES

1. La suplementación con biotina durante gestación y lactancia disminuye la cantidad de los depósitos de tejido adiposo blanco inguinal e interescapular.
2. La suplementación con biotina durante gestación y lactancia disminuye el tamaño de adipocitos blanco en depósitos de tejido adiposo blanco perigonadal, inguinal e interescapular.

3. La suplementación con biotina durante gestación y lactancia no modifica la expresión de los genes Ucp-1, Ppar- γ , Pref-1, Lep y Adipoq en el tejido adiposo de las crías al día 21 de vida.
4. En el tejido adiposo marrón interescapular no se observaron cambios en la cantidad de tejido, morfología y abundancia relativa del RNA mensajero Ucp-1, lo que sugiere que el efecto de la suplementación con biotina durante gestación y lactancia se da sobre el tejido adiposo blanco únicamente.
5. Nuestros resultados demuestran por primera vez que la suplementación con biotina durante gestación y lactancia afecta el desarrollo del tejido adiposo de las crías.

PERSPECTIVAS

En este proyecto se demostró que la administración de una dieta suplementada con biotina, en un modelo murino, durante las etapas de gestación y lactancia modifica el desarrollo del tejido adiposo de las crías. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para aumentar el entendimiento del efecto observado, algunos de estos son:

- Analizar a nivel de proteínas cuáles son los efectos que tiene la suplementación con biotina en el tejido adiposo y cómo ésta modifica su desarrollo.
- Realizar estudios sobre un modelo de suplementación con biotina durante las etapas de gestación y lactancia por separado.
- Determinar cuáles son los efectos de los cambios observados en el tejido adiposo de las crías durante la etapa adulta de éstas.

REFERENCIAS

- Abu-Elheiga, L., Almarza-Ortega, D. B., Baldini, A., & Wakil, S. J. (1997). Human Acetyl-CoA Carboxylase 2 MOLECULAR CLONING, CHARACTERIZATION, CHROMOSOMAL MAPPING, AND EVIDENCE FOR TWO ISOFORMS. *Journal of Biological Chemistry*, 272(16), 10669-10677. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.16.10669>
- Ahima, R. S. (2006). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Obesity*, 14, 242S-249S. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.317>
- Ashman, L. K., Keech, D. B., Wallace, J. C., & Nielsen, J. (1972). Sheep Kidney Pyruvate Carboxylase STUDIES ON ITS ACTIVATION BY ACETYL COENZYME A AND CHARACTERISTICS OF ITS ACETYL COENZYME A INDEPENDENT REACTION. *Journal of Biological Chemistry*, 247(18), 5818-5824.
- Baglioni, S., Cantini, G., Poli, G., Francalanci, M., Squecco, R., Di Franco, A., ... Luconi, M. (2012). Functional Differences in Visceral and Subcutaneous Fat Pads Originate from Differences in the Adipose Stem Cell. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036569>
- Berry, D. C., Stenesen, D., Zeve, D., & Graff, J. M. (2013a). The developmental origins of adipose tissue. *Development*, 140(19), 3939-3949. <https://doi.org/10.1242/dev.080549>
- Berry, D. C., Stenesen, D., Zeve, D., & Graff, J. M. (2013b). The developmental origins of adipose tissue. *Development*, 140(19), 3939-3949. <https://doi.org/10.1242/dev.080549>
- Biotin status during pregnancy 1.pdf*. (s. f.).
- Björntorp, P., Bengtsson, C., Blohmé, G., Jonsson, A., Sjöström, L., Tibblin, E., ... Wilhelmsen, L. (1971). Adipose tissue fat cell size and number in relation to metabolism in randomly selected middle-aged men and women. *Metabolism*, 20(10), 927-935. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(71\)90013-8](https://doi.org/10.1016/0026-0495(71)90013-8)
- Calkins, K., & Devaskar, S. U. (2011). Fetal Origins of Adult Disease. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 41(6), 158-176. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2011.01.001>
- Cazzulo, J. J., Sundaram, T. K., Dilks, S. N., & Kornberg, H. L. (1971). Synthesis of pyruvate carboxylase from its apoenzyme and (+)-biotin in *Bacillus stearothermophilus*.

- Purification and properties of the apoenzyme and the holoenzyme synthetase. *Biochemical Journal*, 122(5), 653-661.
- Chatterjee, N. S., Kumar, C. K., Ortiz, A., Rubin, S. A., & Said, H. M. (1999). Molecular mechanism of the intestinal biotin transport process. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 277(4), C605-C613. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.277.4.C605>
- Chauhan, J., & Dakshinamurti, K. (1991). Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *Journal of Biological Chemistry*, 266(16), 10035-10038.
- Collins, J. C., Paietta, E., Green, R., Morell, A. G., & Stockert, R. J. (1988). Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2. *Journal of Biological Chemistry*, 263(23), 11280-11283.
- Combs, & McClung. (s.f.). *The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. Westborough, Massachusetts, USA: Academic Press.
- Daberkow, R. L., White, B. R., Cederberg, R. A., Griffin, J. B., & Zemleni, J. (2003). Monocarboxylate Transporter 1 Mediates Biotin Uptake in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2703-2706. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2703>
- Dakshinamurti, K., & Cheah-Tan, C. (1968). Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 127, 17-21. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90195-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90195-1)
- Dakshinamurti, K., & Desjardins, P. R. (1968). Lipogenesis in biotin deficiency. *Canadian Journal of Biochemistry*, 46(10), 1261-1267.
- Dakshinamurti, K., & Ho Chong Hong, null. (1970). Regulation of key hepatic glycolytic enzymes. *Enzymologia Biologica Et Clinica*, 11(5), 423-428.
- Desai, M., Crowther, N. J., Lucas, A., & Nicholas Hales, C. (1996). Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *British Journal of Nutrition*, 76(04), 591. <https://doi.org/10.1079/BJN19960065>
- Desai, M., Guang Han, Ferelli, M., Kallichanda, N., & Lane, R. H. (2008). Programmed Upregulation of Adipogenic Transcription Factors in Intrauterine Growth-Restricted Offspring. *Reproductive Sciences*, 15(8), 785-796. <https://doi.org/10.1177/1933719108318597>

- Desai, M., & Ross, M. (2011). Fetal Programming of Adipose Tissue: Effects of Intrauterine Growth Restriction and Maternal Obesity/High-Fat Diet. *Seminars in Reproductive Medicine*, 29(03), 237-245. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1275517>
- Divoux, A., & Clément, K. (2011). Architecture and the extracellular matrix: The still unappreciated components of the adipose tissue: Extracellular matrix of adipose tissue. *Obesity Reviews*, 12(5), e494-e503. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2010.00811.x>
- Dokusova, O. K., & Krivoruchenko, I. V. (1972). [The effect of biotin on the level of cholesterol in the blood of patients with atherosclerosis and essential hyperlipidemia]. *Kardiologija*, 12(12), 113.
- Fain, J. N. (2006). Release of Interleukins and Other Inflammatory Cytokines by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily due to the Nonfat Cells. En *Vitamins & Hormones* (Vol. 74, pp. 443-477). [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(06\)74018-3](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(06)74018-3)
- Ferland-McCollough, D., Fernandez-Twinn, D. S., Cannell, I. G., David, H., Warner, M., Vaag, A. A., ... Ozanne, S. E. (2012). Programming of adipose tissue miR-483-3p and GDF-3 expression by maternal diet in type 2 diabetes. *Cell Death and Differentiation*, 19(6), 1003-1012. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.183>
- Fernandez-Mejia, C., & Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.-L. (2011). Biological Effects of Pharmacological Concentrations of Biotin. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 16(1), 40-48. <https://doi.org/10.1177/1533210110392947>
- Fliers, E., Kreier, F., Voshol, P. J., Havekes, L. M., Sauerwein, H. P., Kalsbeek, A., ... Romijn, J. A. (2003). White Adipose Tissue: Getting Nervous: White adipose tissue. *Journal of Neuroendocrinology*, 15(11), 1005-1010. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01096.x>
- Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704), 763-770. <https://doi.org/10.1038/27376>
- Fuente-Martín, E., Argente-Arizón, P., Ros, P., Argente, J., & Chowen, J. A. (2013). Sex differences in adipose tissue: It is not only a question of quantity and distribution. *Adipocyte*, 2(3), 128-134. <https://doi.org/10.4161/adip.24075>

- Galic, S., Oakhill, J. S., & Steinberg, G. R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 316(2), 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.08.018>
- Gesta, S., Bluher, M., Yamamoto, Y., Norris, A. W., Berndt, J., Kralisch, S., ... Kahn, C. R. (2006). Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6676-6681. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601752103>
- Gesta, Stephane, Tseng, Y. H., & Kahn, C. R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell*, 131(2), 242-256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.004>
- Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G., & Cint, S. (2014). White, brown and pink adipocytes: The extraordinary plasticity of the adipose organ. *European Journal of Endocrinology*, 170(5). <https://doi.org/10.1530/EJE-13-0945>
- Granados, N., Amengual, J., Ribot, J., Musinovic, H., Ceresi, E., von Lintig, J., ... Bonet, M. L. (2013). Vitamin A supplementation in early life affects later response to an obesogenic diet in rats. *International Journal of Obesity*, 37(9), 1169-1176. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.190>
- Grauer, W. O., Moss, A. A., Cann, C. E., & Goldberg, H. I. (1984). Quantification of body fat distribution in the abdomen using computed tomography. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 39(4), 631-637. <https://doi.org/10.1093/ajcn/39.4.631>
- Greenwood, M. R. C., & Hirsch, J. (1974). Postnatal development of adipocyte cellularity in the normal rat. *Journal of Lipid Research*, 15(5), 474-483.
- Han, J., Lee, J.-E., Jin, J., Lim, J. S., Oh, N., Kim, K., ... Koh, G. Y. (2011). The spatiotemporal development of adipose tissue. *Development*, 138(22), 5027-5037. <https://doi.org/10.1242/dev.067686>
- Han, R., Li, A., Li, L., Kitlinska, J. B., & Zukowska, Z. (2012). Maternal low-protein diet up-regulates the neuropeptide Y system in visceral fat and leads to abdominal obesity and glucose intolerance in a sex- and time-specific manner. *The FASEB Journal*, 26(8), 3528-3536. <https://doi.org/10.1096/fj.12-203943>

- Hegele, R. A., Joy, T. R., Al-Attar, S. A., & Rutt, B. K. (2007). *Thematic review series: Adipocyte Biology*. Lipodystrophies: windows on adipose biology and metabolism. *Journal of Lipid Research*, *48*(7), 1433-1444. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700004-JLR200>
- Horvath, T. D., Matthews, N. I., Stratton, S. L., Mock, D. M., & Boysen, G. (2011). Measurement of 3-hydroxyisovaleric acid in urine from marginally biotin-deficient humans by UPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *401*(9), 2805-2810. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5356-x>
- Innis, S. M., & Allardyce, D. B. (1983). Possible biotin deficiency in adults receiving long-term total parenteral nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *37*(2), 185-187. <https://doi.org/10.1093/ajcn/37.2.185>
- Jernås, M., Palming, J., Sjöholm, K., Jennische, E., Svensson, P.-A., Gabrielsson, B. G., ... Lönn, M. (2006). Separation of human adipocytes by size: Hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *The FASEB Journal*, *20*(9), 1540-1542. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5678fje>
- Jitrapakdee, S., & Wallace, J. C. (1999). Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *The Biochemical Journal*, *340* (Pt 1), 1-16.
- Jitrapakdee, Sarawut, & Wallace, J. (2003). The Biotin Enzyme Family: Conserved Structural Motifs and Domain Rearrangements. *Current Protein & Peptide Science*, *4*(3), 217-229. <https://doi.org/10.2174/1389203033487199>
- Kajimura, S., Spiegelman, B. M., & Seale, P. (2015a). Brown and beige fat: Physiological roles beyond heat generation. *Cell Metabolism*, *22*(4), 546-559. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.007>
- Kajimura, S., Spiegelman, B. M., & Seale, P. (2015b). Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metabolism*, *22*(4), 546-559. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.007>
- Kim, H.-K., Della-Fera, M. A., Hausman, D. B., & Baile, C. A. (2010). Effect of clenbuterol on apoptosis, adipogenesis, and lipolysis in adipocytes. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *66*(3), 197-203. <https://doi.org/10.1007/s13105-010-0024-8>
- Koerner, A., Kratzsch, J., & Kiess, W. (2005). Adipocytokines: Leptin—the classical, resistin—the controversial, adiponectin—the promising, and more to come. *Best Practice & Research*

- Clinical Endocrinology & Metabolism*, 19(4), 525-546.
<https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.07.008>
- Lamhonwah, A.-M., Quan, F., & Gravel, R. A. (1987). Sequence homology around the biotin-binding site of human propionyl-CoA carboxylase and pyruvate carboxylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 254(2), 631-636. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90146-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90146-9)
- Larrieta, E., Velasco, F., Vital, P., López-Aceves, T., Lazo-de-la-Vega-Monroy, M. L., Rojas, A., & Fernandez-Mejia, C. (2010). Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *European Journal of Pharmacology*, 644(1-3), 263-268. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.07.009>
- Lau, E. P., Cochran, B. C., & Fall, R. R. (1980). Isolation of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase from bovine kidney. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 205(2), 352-359. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(80\)90117-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(80)90117-4)
- Lee, M.-J., Wu, Y., & Fried, S. K. (2013). Adipose Tissue Heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for Obesity Complications. *Molecular aspects of medicine*, 34(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.001>
- Lee, Y., Mottillo, E. P., & Granneman, J. G. (2015). *HHS Public Access*. 1842(3), 358-369. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.011>.Adipose
- Lee, Y.-H., Mottillo, E. P., & Granneman, J. G. (2014). Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 358-369. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.011>
- Liang, X., Yang, Q., Fu, X., Rogers, C. J., Wang, B., Pan, H., ... Du, M. (2016). Maternal obesity epigenetically alters visceral fat progenitor cell properties in male offspring mice: Maternal obesity alters adipocyte progenitors in offspring. *The Journal of Physiology*, 594(15), 4453-4466. <https://doi.org/10.1113/JP272123>
- Lukaszewski, M.-A., Eberlé, D., Vieau, D., & Breton, C. (2013). Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 305(10), E1195-E1207. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00231.2013>

- Lukaszewski, M.-A., Mayeur, S., Fajardy, I., Delahaye, F., Dutriez-Casteloot, I., Montel, V., ... Breton, C. (2011). Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 301(3), E548-E559. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00011.2011>
- 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. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 20(1), 41-61. <https://doi.org/10.1159/000175686>
- Masuzaki, H. (2001). A Transgenic Model of Visceral Obesity and the Metabolic Syndrome. *Science*, 294(5549), 2166-2170. <https://doi.org/10.1126/science.1066285>
- McMahon, R. J. (2002). Biotin in Metabolism and Molecular Biology. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 221-239. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.121101.112819>
- Melo, V., Ruiz, V. M., & Cuamatzi, O. (2007). *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Reverte.
- Mock, D. M., Quirk, J. G., & Mock, N. I. (2002). Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *The American journal of clinical nutrition*, 75(2), 295-299.
- Moreno-Navarrete, J. M., & Fernández-Real, J. M. (2012). Adipocyte Differentiation. En M. E. Symonds (Ed.), *Adipose Tissue Biology* (pp. 17-38). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0965-6_2
- Murabayashi, N., Sugiyama, T., Zhang, L., Kamimoto, Y., Umekawa, T., Ma, N., & Sagawa, N. (2013). Maternal high-fat diets cause insulin resistance through inflammatory changes in fetal adipose tissue. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 169(1), 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.02.003>
- PAOLETTI, R., Kritchevsky, D., & Holmes, W. L. (Eds.). (1987). *Drugs Affecting Lipid Metabolism*. Recuperado de [//www.springer.com/la/book/9783642717048](http://www.springer.com/la/book/9783642717048)
- Pellegrinelli, V., Carobbio, S., & Vidal-Puig, A. (2016). Adipose tissue plasticity: How fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia*, 59(6), 1075-1088. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3933-4>
- Perry, C. A., West, A. A., Gayle, A., Lucas, L. K., Yan, J., Jiang, X., ... Caudill, M. A. (2014). Pregnancy and Lactation Alter Biomarkers of Biotin Metabolism in Women Consuming a

- Controlled Diet. *The Journal of Nutrition*, 144(12), 1977-1984.
<https://doi.org/10.3945/jn.114.194472>
- Peurichard, D., Delebecque, F., Lorsignol, A., Barreau, C., Rouquette, J., Descombes, X., ... Degond, P. (2017). Simple mechanical cues could explain adipose tissue morphology. *Journal of Theoretical Biology*, 429, 61-81. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.06.030>
- Poissonnet, Claude Michéle, Burdi, A. R., & Garn, S. M. (1984). The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Human Development*, 10(1-2), 1-11. [https://doi.org/10.1016/0378-3782\(84\)90106-3](https://doi.org/10.1016/0378-3782(84)90106-3)
- Poissonnet, C.M., Burdi, A. R., & Bookstein, F. L. (1983). Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Human Development*, 8(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/0378-3782\(83\)90028-2](https://doi.org/10.1016/0378-3782(83)90028-2)
- 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 & Pharmacotherapy*, 60(4), 182-185. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.03.005>
- Riveron-Negrete, L., & Fernandez-Mejia, C. (2017). Pharmacological Effects of Biotin in Animals. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 17(6), 529-540. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160923132611>
- Rodriguez-Melendez, R., Griffin, J. B., Sarath, G., & Zemleni, J. (2005). High-throughput Immunoblotting Identifies Biotin-dependent Signaling Proteins in HepG2 Hepatocarcinoma Cells. *The Journal of nutrition*, 135(7), 1659-1666.
- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2014). What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell*, 156(1-2), 20-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>
- Saely, C. H., Geiger, K., & Drexel, H. (2012). Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review. *Gerontology*, 58(1), 15-23. <https://doi.org/10.1159/000321319>
- Said, H. M. (2012). Biotin: Biochemical, Physiological and Clinical Aspects. En O. Stanger (Ed.), *Water Soluble Vitamins* (Vol. 56, pp. 1-19). https://doi.org/10.1007/978-94-007-2199-9_1

- Salans, L. B., Cushman, S. W., & Weismann, R. E. (1973). Studies of Human Adipose Tissue ADIPOSE CELL SIZE AND NUMBER IN NONOBESE AND OBESE PATIENTS. *Journal of Clinical Investigation*, 52(4), 929-941. <https://doi.org/10.1172/JC1107258>
- Serrano, A., Asnani-Kishnani, M., Rodríguez, A. M., Palou, A., Ribot, J., & Bonet, M. L. (2018). Programming of the Beige Phenotype in White Adipose Tissue of Adult Mice by Mild Resveratrol and Nicotinamide Riboside Supplementations in Early Postnatal Life. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(21), 1800463. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800463>
- Shi, H., & Clegg, D. J. (2009). Sex differences in the regulation of body weight. *Physiology & Behavior*, 97(2), 199-204. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.017>
- Snijder, M. B., Dekker, J. M., Visser, M., Bouter, L. M., Stehouwer, C. D., Kostense, P. J., ... Seidell, J. C. (2003). Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: The Hoorn Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(5), 1192-1197. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.5.1192>
- Snijder, M. B., Dekker, J. M., Visser, M., Yudkin, J. S., Stehouwer, C. D. A., Bouter, L. M., ... Seidell, J. C. (2003). Larger Thigh and Hip Circumferences Are Associated with Better Glucose Tolerance: The Hoorn Study. *Obesity Research*, 11(1), 104-111. <https://doi.org/10.1038/oby.2003.18>
- Solórzano-Vargas, R. S., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 5325-5330. <https://doi.org/10.1073/pnas.082097699>
- Spence, J. T., & Koudelka, A. P. (1984). Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 259(10), 6393-6396.
- Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C., & Sharma, S. (2011). The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(4), 236-240. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.90879>

- Valenciano, A. I., Mayordomo, R., de la Rosa, E. J., & Hallböök, F. (2002). Biotin decreases retinal apoptosis and induces eye malformations in the early chick embryo: *Neuroreport*, *13*(3), 297-299. <https://doi.org/10.1097/00001756-200203040-00010>
- Vargas-Castillo, A., Fuentes-Romero, R., Rodriguez-Lopez, L. A., Torres, N., & Tovar, A. R. (2017). Understanding the Biology of Thermogenic Fat: Is Browning A New Approach to the Treatment of Obesity? *Archives of Medical Research*, *48*(5), 401-413. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.10.002>
- Vesely, D. L. (1982). Biotin enhances guanylate cyclase activity. *Science*, *216*(4552), 1329-1330.
- Vilches-Flores, A., Tovar, A. R., Marin-Hernandez, A., Rojas-Ochoa, A., & Fernandez-Mejia, C. (2010). Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *21*(7), 606-612. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.03.009>
- Wang, M.-Y., Grayburn, P., Chen, S., Ravazzola, M., Orci, L., & Unger, R. H. (s. f.). Adipogenic capacity and the susceptibility to type 2 diabetes and metabolic syndrome. *MEDICAL SCIENCES*, *6*.
- Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K., & Scherer, P. E. (2013a). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine*, *19*(10), 1338-1344. <https://doi.org/10.1038/nm.3324>
- Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K., & Scherer, P. E. (2013b). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine*, *19*(10), 1338-1344. <https://doi.org/10.1038/nm.3324>
- Wang, Y., Hudak, C., & Sul, H. S. (2010). Role of preadipocyte factor 1 in adipocyte differentiation. *Clinical Lipidology*, *5*(1), 109-115. <https://doi.org/10.2217/clp.09.80>
- Watanabe, T. (1996). Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia*, *52*(2), 149-154. <https://doi.org/10.1007/BF01923361>
- Wiedmann, S., Rodriguez-Melendez, R., Ortega-Cuellar, D., & Zemleni, J. (2004). Clusters of biotin-responsive genes in human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *15*(7), 433-439. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2004.02.005>

Williams, L., Seki, Y., Vuguin, P. M., & Charron, M. J. (2014). Animal Models of In Utero Exposure to a High Fat Diet: A Review. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(3), 507-519.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.006>

Zempleni, J. (2005). UPTAKE, LOCALIZATION, AND NONCARBOXYLASE ROLES OF BIOTIN. *Annual Review of Nutrition*, 25(1), 175-196.
<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.25.121304.131724>