



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

**EFFECTO DEL ARSÉNICO EN COMBINACIÓN CON ÁCIDO PALMÍTICO SOBRE
LA REGULACIÓN DE LA LIPÓLISIS Y EL ACÚMULO DE GRASA EN EL ADIPOCITO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALBERTO LÓPEZ DANIEL

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. RUTH GUTIÉRREZ AGUILAR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
Dra. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

**EFFECTO DEL ARSÉNICO EN COMBINACIÓN CON ÁCIDO PALMÍTICO SOBRE
LA REGULACIÓN DE LA LIPÓLISIS Y EL ACÚMULO DE GRASA EN EL ADIPOCITO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALBERTO LÓPEZ DANIEL

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. RUTH GUTIÉRREZ AGUILAR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
Dra. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2019

OFICIO CPCB/598/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM.
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 25 de marzo del 2019, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **LÓPEZ DANIEL ALBERTO** con número de cuenta **307108065** con la tesis titulada **"EFECTO DEL ARSÉNICO EN COMBINACIÓN CON ÁCIDO PALMÍTICO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA LIPÓLISIS Y EL ACÚMULO DE GRASA EN ADIPOCITO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. DÍAZ VILLASEÑOR ANDREA SACHI**:

Presidente: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
Vocal: DRA. RUTH GUTIÉRREZ AGUILAR
Secretario: DRA. CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO
Suplente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Suplente: DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 21 de mayo del 2019.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por la formación y conocimientos adquiridos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (CVU 706197) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM por el financiamiento al proyecto (IA203316).

A mi tutora principal, la Dra. Andrea Díaz-Villaseñor, por la oportunidad y la formación obtenida a lo largo del posgrado y a mi comité tutorial, la Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar y la Dra. Ana María Salazar Martínez, por el apoyo en mi formación y la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi madre, Leticia Daniel; por ser el soporte más grande que tengo, por el apoyo y amor incondicional. Por ser guía, compañera, mi hombro y mi sendero.

A mis hermanos, Marisol, Liliana y Carlos. Por su apoyo y amor. Por las risas y los momentos que vivimos.

A mis sobrinos, Kevin, Lucero, Leonardo y Maximiliano. Por ser la luz de nuestra familia.

A mis amigas Adriana y Gabriela, por ser grandes seres humanos. Por escoger ser mi familia más allá de la sangre.

A las técnicas de laboratorio, la QFB. Monserrat Sordo Cedeño y la Biol. Luz María Chiu Velázquez, por su apoyo durante el trabajo experimental del presente proyecto.

Índice

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.....	5
AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN	12
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
ANTECEDENTES	15
1. Sobrepeso y Obesidad.....	15
2. Factores de riesgo para el desarrollo de obesidad	15
2.1 Factores nutricionales	16
2.1.1 Dieta alta en grasa.....	16
2.1.2 Ácido palmítico.....	16
3. Contaminantes ambientales como disruptores endocrinos químicos.....	17
3.1 Arsénico.....	18
4. Tejido adiposo blanco	20
4.1 Lipogénesis: acúmulo de grasa.....	21
4.2 Lipólisis	22
4.3 Inhibición de lipólisis por insulina	23
4.4 Regulación transcripcional de genes del metabolismo de lípidos en el adipocito	25
5. Interacción entre dieta alta en grasa, arsénico y el metabolismo del adipocito	25
5.1 Arsénico y tejido adiposo	26
5.2. Dieta alta en grasa y tejido adiposo	27
5.3 Interacción entre arsénico y dieta alta en grasa (DAG)	27
DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA	29
1. Cultivos celulares.....	29
2. Tratamientos	30
2.1 Arsenito de sodio	30
2.2 Palmitato de sodio	30
2.3 Pioglitazona	31
2.4 Compuesto C (Dorsomorfina)	31

2.5 Isoproterenol.....	31
2.6 Forskolina	32
2.7 Insulina	33
2.8 H89	33
3. Sobrevida celular por tinción de ADN	33
4. Cuantificación de lípidos intracelulares por Rojo-O-Oleoso (ORO)	34
5. Ensayo de lipólisis.....	35
5.1 Lipólisis basal.....	35
5.2 Lipólisis estimulada	35
6. Inhibición de lipólisis por insulina	36
7. Cuantificación de glicerol liberado al medio	36
8. Extracción y cuantificación de RNA total	37
9. RT-PCR en tiempo real	37
10. Análisis estadístico	39
RESULTADOS	41
1. Sobrevida celular.....	41
2. Lipogénesis	43
3. Lipólisis basal.....	48
4. Lipólisis estimulada	49
5. Inhibición de lipólisis por insulina	53
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES	60
REFERENCIAS.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.1. Esquema representativo de la lipólisis basal y estimulada.

Figura 2. Esquema de diferenciación celular y tratamientos.

Figura 3. Sobrevida celular determinada por fluorometría con tinción con DAPI.

Figura 4. Fotografías del acúmulo de grasa en adipocitos.

Figura 5. Acúmulo de grasa en adipocitos.

Figura 6. Abundancia relativa del mRNA de genes lipogénicos: PPAR γ , SREBP-1c, ACC, DGAT2 y PEPCK.

Figura. 7 Lipólisis basal.

Figura 8. Lipólisis estimulada con isoproterenol o con forskolina.

Figura 9. Abundancia relativa del mRNA de genes lipolíticos: ATGL, CGI-58, HSL, PLN y FABP4.

Figura 10. Inhibición de la lipólisis por insulina.

RESUMEN

Uno de los factores que influyen en el desarrollo de la obesidad es la alimentación inadecuada, la cual puede ser conformada por una dieta alta en grasa (principalmente ácidos grasos saturados, como el palmitato). Existen además otros factores ambientales que influyen en el desarrollo de la diabetes tipo 2 y probablemente en la obesidad, como el arsénico. Se ha reportado la exposición a altas concentraciones de arsénico inorgánico ($>10 \mu\text{g/l}$) en el agua de bebida en 14 países de América Latina, incluyendo México. Sin embargo, se desconoce el efecto del arsénico en combinación con el ácido palmítico, sobre el metabolismo lipídico del tejido adiposo, siendo este tipo de tejido el que participa en el almacenamiento de triglicéridos y en la liberación de energía en forma de ácidos grasos libres.

En el presente proyecto se plantea conocer el efecto de la exposición a arsenito de sodio ($1 \mu\text{M}$) en combinación con el palmitato de sodio ($200 \mu\text{M}$), sobre la lipogénesis y la lipólisis en adipocitos 3T3-L1 a lo largo de su diferenciación celular (11 días desde el inicio de la diferenciación) o en adipocitos maduros (72 h de exposición).

En los adipocitos expuestos a arsenito de sodio, disminuyó el contenido de triglicéridos, debido a una disminución en la expresión de genes relacionados con la adipogénesis y la lipogénesis. La lipólisis basal incrementó con los tratamientos de arsenito y palmitato de sodio, ocurriendo un efecto sinérgico cuando la exposición fue simultánea. El arsenito de sodio disminuyó la lipólisis estimulada por isoproterenol (agonista β -adrenérgico), y por forskolina (activador de la adenilato ciclasa), sin alterar la expresión del ARNm de la lipasa sensible a hormonas, únicamente en los adipocitos que se expusieron una vez maduros. El efecto del arsenito de sodio sobre la lipólisis estimulada fue modulado negativamente por la presencia del palmitato, llegando a los niveles de la condición control. El arsenito solo y en combinación con palmitato, disminuyeron la respuesta antilipolítica de la insulina en adipocitos expuestos (desde el inicio de la diferenciación celular) y estimulados con isoproterenol, más no con forskolina, sugiriendo que la respuesta está mediada por una interacción del arsenito con el receptor β -adrenérgico.

El arsenito y el palmitato de sodio participan activamente sobre el estatus energético del adipocito, afectando la relación entre la lipogénesis y la lipólisis.

ABSTRACT

A factor that influence the obesity development is inadequate nutrition, which can be compound by a high fat diet (mainly saturated fatty acids, such as palmitate). There are also other environmental factors that influence the development of type 2 diabetes and probably obesity, such as arsenic. Exposure to a high inorganic arsenic concentration ($> 10 \mu\text{g/l}$) in drinking water has been reported in 14 countries in Latin America, including Mexico. However, the effect of arsenic in combination with palmitic acid on the lipid metabolism of adipose tissue remains unknown, since this kind of tissue is being involved in the triglycerides storage and the energy release (free fatty acids form).

The present work aim to know sodium arsenite ($1 \mu\text{M}$) effect in combination with sodium palmitate ($200 \mu\text{M}$) exposure, on lipogenesis and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes throughout their cell differentiation (11 days from the start of differentiation) or in mature adipocytes (72 h of exposure).

In adipocytes exposed to sodium arsenite, the lipid content decreased, due to a diminution in the adipogenesis and lipogenesis-genes-related expression. Basal lipolysis increased with sodium arsenite and palmitate treatments, a synergistic effect occurring when the exposure was simultaneous.

Sodium arsenite decreased isoproterenol and forskolin-stimulated lipolysis (β -adrenergic agonist and adenylate cyclase activator, respectively), without altering the expression of hormone-sensitive lipase mRNA, in adipocytes that were exposed once mature. Sodium arsenite effect on stimulated lipolysis was negatively modulated by the presence of palmitate, reaching the control levels.

Arsenite alone and in combination with palmitate, decreased the antilipolytic response of insulin in exposed adipocytes (from the beginning of cell differentiation) and isoproterenol-stimulated, but forskolin-stimulated, suggesting that response is mediated by an arsenite β -adrenergic receptor interaction. Arsenite and sodium palmitate actively participate in the energy status of the adipocyte, affecting the relationship between lipogenesis and lipolysis.

INTRODUCCIÓN

El sobrepeso y la obesidad están definidos como un acúmulo de grasa anormal o excesivo que pueden afectar la salud, de 1980 a 2013, la población adulta con sobrepeso y obesidad (IMC >25 kg/m²) se ha incrementado del 29 % al 37.5 % (Ng, Fleming, Robinson, Thomson, & Graetz, 2014), siendo que al año 2016, a nivel mundial 39 % de las personas mayores de 18 años padecían sobrepeso y 13 % algún grado de obesidad (OMS, 2018). Estas patologías tienen un origen multifactorial y existe evidencia que demuestra que aunado a la mala alimentación (dietas altas en grasas saturadas, principalmente ácido palmítico) y la falta de actividad física, existen factores ambientales determinantes, que pueden influir en el desarrollo de obesidad y/o diabetes, siendo uno de ellos el arsénico (Kuo, Moon, Thayer, & Navas-Acien, 2013; Lee & Kim, 2013; Maull et al., 2012; Thayer, Heindel, Bucher, & Gallo, 2012; You et al., 2011).

La exposición a altas concentraciones de arsénico a través del agua de bebida, se ha reportado en 15 de los 20 países de América Latina, incluyendo varios estados de México (Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Nuevo León, Zacatecas, Coahuila, San Luis Potosí, Hidalgo, Aguascalientes, Puebla, Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Morelos, Guerrero, Oaxaca, Tabasco) (Bundschuh et al., 2012), siendo que al menos 140 millones de individuos en el mundo están expuestos a concentraciones mayores de 10 µg/L de arsénico (States, Barchowsky, Cartwright, Reichard, & Futscher, 2011).

En el control metabólico del peso corporal, así como el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, participan varios órganos como son el tejido adiposo, el hígado, el páncreas, el músculo esquelético y más recientemente descritos, el intestino y el cerebro, órganos alterados durante los procesos de obesidad y diabetes. El tejido adiposo es de suma importancia ya que es el órgano que almacena la mayor fuente de energía en forma de triglicéridos (TG), por medio del proceso de lipogénesis, por lo tanto en el tejido adiposo se lleva a cabo la mayor parte de la hidrólisis de los TG

(lipólisis), para ser utilizados en forma de energía (Galic, Oakhill, & Steinberg, 2010; Nielsen, Jessen, Jorgensen, Moller, & Lund, 2014).

Debido a esto, en el presente proyecto se plantea conocer el efecto del arsénico, en combinación con ácido palmítico, sobre el proceso de la lipólisis y el acúmulo de grasa, con el fin de establecer los mecanismos moleculares de dichos eventos para ayudar a entender y profundizar sobre los efectos del arsénico combinado con el ácido palmítico en la etiología de la obesidad y la diabetes.

La hipótesis del trabajo se basa en que el arsenito de sodio en conjunto con el palmitato de sodio en adipocitos expuestos desde el inicio de su diferenciación celular como en adipocitos maduros, aumenta el acúmulo de grasa y la lipólisis basal y disminuye la lipólisis estimulada y el efecto antilipolítico de la insulina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del arsenito de sodio en conjunto con el palmitato de sodio sobre el acúmulo de grasa y la regulación de la lipólisis en adipocitos maduros y en adipocitos expuestos desde el inicio de su diferenciación celular.

OBJETIVOS PARTICULARES

- A)** Establecer las dosis de arsenito de sodio no citotóxicas y similares a las concentraciones equivalentes de exposición en humanos, así como la dosis no citotóxica de palmitato de sodio, en adipocitos expuestos desde la diferenciación celular, así como en adipocitos maduros.
- B)** Cuantificar la grasa contenida en los adipocitos tratados con arsenito de sodio y en combinación con palmitato de sodio, expuestos desde su proceso de diferenciación y una vez como adipocitos maduros
- C)** Evaluar si la exposición al arsenito de sodio en combinación con palmitato de sodio produce alteraciones en la lipólisis basal y en la lipólisis estimulada por análogos de catecolaminas y activadores de la adenilato ciclasa, en adipocitos maduros y tratados desde el proceso de diferenciación.
- D)** Determinar si la exposición al arsenito de sodio en combinación con palmitato de sodio promueve alteraciones en la inhibición de la lipólisis estimulada, como respuesta a la insulina, en adipocitos maduros y tratados desde el inicio de la diferenciación.
- E)** Evaluar la expresión de genes involucrados en la lipólisis y en la lipogénesis en los adipocitos tratados con arsenito de sodio y en combinación con palmitato de sodio, expuestos desde su proceso de diferenciación y una vez como adipocitos maduros.

ANTECEDENTES

1. Sobrepeso y Obesidad

El sobrepeso y la obesidad son patologías crónicas caracterizadas por un aumento de grasa corporal asociado a un mayor riesgo para la salud, cuya etiología es multifactorial y es determinada por factores genéticos, metabólicos, endocrinológicos y ambientales (Baudrand, Arteaga, & Moreno, 2010). El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos (WHO, 2017), donde un IMC mayor o igual a 25 indica sobrepeso y un IMC mayor o igual a 30 obesidad. El sobrepeso y la obesidad están caracterizadas por un incremento en los depósitos energéticos en forma de grasa en los adipocitos, debido al incremento en la cantidad de energía consumida (Bray, 1999).

Desde 1980 hasta 2014 la obesidad ha duplicado su cifra a nivel mundial, alcanzando el 13 % de la población global (WHO, 2016). Para la población mexicana en el año 2016, se reportó que el 72.5 % de la población mayor a 20 años padece sobrepeso u obesidad, mientras que en los adolescentes (12 a 19 años) esta cifra es del 26.3% y en los niños en edad escolar (5 a 11 años de edad) es del 33.2% (ENSANUT, 2016).

La obesidad tiene como consecuencias clínicas la resistencia a la insulina (Baudrand et al., 2010), la diabetes tipo 2 (DT2), entre otras, ya que a mayor IMC incrementa el riesgo de contraer estas enfermedades no transmisibles (OMS, 2016). La DT2 es la principal comorbilidad de la obesidad que aumenta la mortalidad de la población mexicana (Palloni, Beltrón-Sánchez, Novak, Pinto, & Wong, 2015).

2. Factores de riesgo para el desarrollo de obesidad

Un factor de riesgo importante para el desarrollo de obesidad es el aumento en la ingesta de alimentos con alto contenido calórico, siendo en muchos casos una dieta elevada en grasa (Mina & Campbell, 2014). Sin embargo, actualmente también se

considera que ciertos contaminantes ambientales, a los cuales en muchos casos nos encontramos expuestos de forma involuntaria y desconocida, pueden afectar los mecanismos naturales de control de peso corporal y la homeostasis metabólica, jugando un papel importante en el desarrollo de la obesidad (Baillie-Hamilton, 2002).

2.1 Factores nutricionales

Una de las razones del actual problema de obesidad podría deberse a los cambios de hábitos alimenticios como la tendencia de consumir alimentos ricos en azúcares y grasas (Belahsen, 2014). El consumo diario de alimento *per cápita* para la población mexicana en los últimos 40 años se ha incrementado considerablemente, ya que de consumir 2,500 kcal/día por persona ha aumentado hasta 3,200 kcal/día (FAO, 2013).

2.1.1 Dieta alta en grasa

Desde 1970 existe evidencia, que apunta hacia una asociación entre una alta ingesta de grasa y la obesidad, donde se muestra que el incremento del consumo de grasas está asociado con un incremento en la prevalencia de obesidad en países desarrollados (Larson et al., 1996). El consumo total de energía y la distribución de los macronutrientes en la dieta cambiaron en los últimos 40 años, siendo que las kcal provenientes de la grasa aumentaron un 74.7% (FAO, 2013).

2.1.2 Ácido palmítico

Uno de los principales componentes de los alimentos clasificados con alto contenido de grasa saturada es el ácido palmítico (PAL) (Chen et al., 2017), un ácido graso saturado de 16 carbonos (16:0). El PAL es uno de los ácidos grasos con mayor abundancia en el suero humano, llegando hasta el 25% de la concentración en suero de personas delgadas e incrementando hasta el 40% en personas con obesidad (Newgard et al., 2013).

El PAL forma el 44% de la composición del aceite de palma (Sambanthamurthi, Sundram, & Tan, 2000). A nivel mundial, el aceite de palma es el mayormente producido (5.5×10^7 toneladas/año) (FAO, 2013), y su consumo global aumentó de 1995 al año 2015 de 14.6 a 61.1 millones de toneladas, convirtiéndolo también en el aceite más consumido a nivel mundial (European palm oil Alliance, 2016).

Algunos efectos del consumo de dietas altas en PAL (16.8% del total de la energía consumida) en individuos adultos después de 28 días, es la disminución de la oxidación de los lípidos, incrementando el riesgo de padecer obesidad (Kien, Bunn, & Ugrasbul, 2005). Adicionalmente se sabe que a nivel del sistema nervioso central, el PAL incrementa la ganancia de peso, y afecta la sensibilidad a la leptina (L. Cheng et al., 2015), una hormona secretada por el tejido adiposo que participa en la regulación de la ingesta de alimentos (Galic, Oakhill, & Steinberg, 2010).

3. Contaminantes ambientales como disruptores endocrinos químicos

Los contaminantes ambientales han ganado interés recientemente como participantes en el desarrollo de la obesidad, además de los factores ya mencionados. La evidencia de que la exposición a químicos ambientales contribuye al desarrollo de dicha enfermedad o patologías relacionadas como la DT2 ha ido en aumento (Holtcamp, 2012). Se ha relacionado el incremento de contaminantes ambientales a la par de la incidencia en los casos de obesidad sugiriendo que estas sustancias participan de forma directa en la ganancia de peso (Baillie-Hamilton, 2002).

Los disruptores endócrinos químicos se definen, por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés “Environmental Protection Agency”), como sustancias presentes en el ambiente, en los alimentos o en los productos en general que intervienen en la biosíntesis, secreción, transporte, metabolismo, acción o degradación de las hormonas y además afectan la homeostasis metabólica. Dentro de éstos disruptores endócrinos, los que promueven adipogénesis y el desbalance energético se denominan obesógenos (Grün & Blumberg, 2006).

Los disruptores endócrinos químicos han sido clasificados según su uso u origen en farmacéuticos (e.g. dietilestilbestrol, estradiol), productos naturales (e.g. fitoestrógenos), fungicidas (e.g. zearalelona), pesticidas organoclorados (e.g. DDT, policlorados difenilos), plásticos y compuestos industriales (e.g. bisfenol A, ftalatos, dioxinas, furanos), miméticos androgénicos (e.g. vinclozolina), hidrocarburos aromáticos (e.g. fenantreno, benzopireno), metales (e.g. arsénico) (Scaglia et al., 2009), y recientemente se han incluido otros factores como los dietéticos (e.g. fructosa, glutamato monosódico) (Holtcamp, 2012).

Estudios *in vivo* han demostrado que los disruptores endócrinos químicos inducen una ganancia de peso y su efecto varía dependiendo del tiempo de exposición, así como la edad de los animales durante las cuales sean expuestos, siendo el tejido adiposo uno de los principales órganos afectados (Gore et al., 2015). A pesar de que la evidencia de los disruptores endocrinos es aún limitada sobre la participación en el desarrollo de la obesidad o la diabetes, resulta importante estudiar su impacto en la etiología de estas enfermedades y su potencial efecto obesogénico (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Muchos de los estudios relacionados a los efectos de los disruptores endócrinos químicos reportan un incremento de peso como efecto colateral; sin embargo, estos estudios no se centran en la obesidad como objetivo principal (Gore et al., 2015).

3.1 Arsénico

La exposición al arsénico inorgánico (iAs) a través del agua de bebida es una problemática a nivel mundial, afectando entre 140 (States, Barchowsky, Cartwright, Reichard, & Futscher, 2011) y 300 millones de personas (Quansah et al., 2015). Además en América Latina se ha reportado ésta exposición en 14 de los 20 países, incluyendo a México (Bundschuh et al., 2012). Las principales especies de iAs presentes en el agua obtenida del subsuelo corresponden principalmente a arsenato (As^{V}) y el arsenito (As^{III}) y sus concentraciones dependen del potencial de óxido-reducción y pH del agua (Abernathy et al., 2003). La toxicidad del iAs depende de su

forma química, siendo la forma trivalente (iAs^{III}) más tóxica que la forma pentavalente (iAs^V) (Ramirez, 2013).

El metabolismo del arsénico juega un papel importante en sus efectos tóxicos. Muchos mamíferos tienen la capacidad de metilar el iAs . El iAs se metaboliza por procesos secuenciales que involucran la reducción de dos electrones del iAs pentavalente al trivalente, por la arseniato reductasa. Sin embargo, esta reducción también puede ocurrir de manera no enzimática en presencia de un grupo tiol como el glutatión. Posteriormente la enzima arsenito metiltransferasa metila al iAs trivalente, convirtiéndolo en ácido monometilarsónico (MMA^V), lo cual es seguido de una segunda reducción, en este caso por la MMA reductasa o en presencia de glutatión para formar ácido monometilarsinoso (MMA^{III}). Finalmente, por medio de una segunda metilación llevada a cabo por la MMA metil transferasa, el MMA^{III} se transforma en ácido dimetilarsínico (DMA^V), el cual a su vez se puede reducir por la DMA reductasa o en presencia de glutatión a ácido dimetilarsinoso (DMA^{III}). Las metilaciones enzimáticas del arsénico son llevadas a cabo en presencia de *S*-adenosilmetiotina (*SAM*) como grupo donador (Goering, *et al.*, 1999).

En poblaciones expuestas a altas concentraciones de arsénico a través del agua de bebida se ha observado una relación con el desarrollo y/o incidencia de diversas patologías como algunas enfermedades broncopulmonares, cardiovasculares, neuropatías (States *et al.*, 2011), cáncer (Rossman, 2003) y DT2 (Kile & Christiani, 2008; Maull *et al.*, 2012). Para el caso de México, en donde se realizó un estudio en una población expuesta a un gradiente de arsénico (20–400 $\mu g/L$) en el agua de bebida, se observó que en los sujetos que se encontraron mayores concentraciones de arsénico en la orina, tuvieron un mayor riesgo (una razón de momios de 2.84) de tener DT2 (Coronado-González, Del Razo, García-Vargas, Sanmiguel-Salazar, & Escobedo-de la Peña, 2007).

El arsénico hoy en día se considera un factor de riesgo para DT2 (OMS, 2017) en base a diversos estudios epidemiológicos (Kuo *et al.*, 2013; Maull *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014), estudios experimentales del laboratorio donde se realizó éste estudio (Diaz-Villasenor *et al.*, 2008; Diaz-Villasenor *et al.*, 2013; Diaz-Villasenor *et al.*, 2006) y de

otros grupos de investigación (Padmaja Divya et al., 2015; Paul et al., 2007; Walton et al., 2004; Xue et al., 2011). En años previos, se aportó evidencia que la exposición crónica a dicho metaloide, disminuye la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células beta del páncreas de rata (Diaz-Villasenor et al., 2008; Diaz-Villasenor et al., 2013; Diaz-Villasenor et al., 2006). Adicionalmente, se sabe que el arsénico también genera daño oxidativo en el páncreas (Izquierdo- Vega et al., 2006) y disminuye la captura de glucosa estimulada por insulina en adipocitos de roedor (Paul et al., 2007). Además, se ha encontrado mayor concentración de arsénico en el cabello de personas con síndrome metabólico que en personas sanas (Choi et al., 2014).

A pesar de que el arsénico no ha sido catalogado como un obesógeno, se ha observado de manera indirecta en una población en Taiwan, que las personas que estuvieron expuestas a un mayor tiempo al arsénico (exposición crónica acumulativa) presentaron mayor incidencia de sobrepeso y obesidad (IMC \geq 25) (Tseng et al., 2000).

Dadas estas evidencias en conjunto, resulta de gran interés estudiar el posible papel del arsénico como obesógeno.

4. Tejido adiposo blanco

El tejido adiposo (TA) es un tejido especializado en el acúmulo de grasa, involucrado en la homeostasis energética de todo el organismo (Birsoy, Festuccia, & Laplante, 2013). Se divide principalmente en tres tipos: TA blanco, TA pardo y recientemente descrito el TA beige (Choe, Huh, Hwang, Kim, & Kim, 2016). El TA pardo funciona como fuente termogénica como respuesta adaptativa a bajas temperaturas, incrementando el gasto energético por la disipación de energía química en forma de calor (Cohen & Spiegelman, 2015). El TA blanco funciona como la principal reserva energética en forma de triglicéridos (TAG), que en respuesta a la demanda energética, lleva a cabo un proceso denominado lipólisis, en donde hidroliza estos TAG y los libera al torrente sanguíneo en forma de ácidos grasos no esterificados y glicerol, para ser

utilizados por otros órganos como fuente energética (Duncan, Ahmadian, Jaworski, Sarkadi-Nagy, & Sul, 2007).

Otra función del TA blanco es la secreción de hormonas, citocinas y las adipocinas, que regulan el balance energético tanto por la activación de señales de saciedad, como regulando la actividad metabólica de otros órganos (Chen et al., 2017).

Cambios en el TA, como los que suceden durante el desarrollo de la obesidad, provocan alteraciones en la secreción de adipocinas, la expresión de hormonas, el acúmulo de grasa, así como la composición de las poblaciones de células del sistema inmunológico relacionadas al TA (Makki, Froguel, & Wolowczuk, 2013). También, la obesidad induce al remodelamiento del TA, como son cambios en el número y tamaño de los adipocitos, acompañado de muerte de los adipocitos, hipoxia local y alteraciones en los flujos de ácidos grasos (Chen et al., 2017).

4.1 Lipogénesis: acúmulo de grasa

El almacenamiento de lípidos es un proceso evolutivo altamente conservado que existe en todos los organismos y este acúmulo se restringe a un tipo específico de células especializadas (adipocitos). Solamente en los vertebrados existe un tejido especializado para el acúmulo de grasa (tejido adiposo) (Birsoy et al., 2013). En un estado de ingesta calórica excesiva, la grasa se acumula principalmente en forma de TAG como reserva energética que pueda utilizarse posteriormente (Saponaro, Gaggini, Carli, & Gastaldelli, 2015). Esta capacidad de acumular lípidos evolucionó como una ventaja de supervivencia en hábitats pobres en nutrientes (Wältermann, Steinbüchel, Wa, & Steinbu, 2005).

Se denomina lipogénesis a la síntesis de TAG tanto *de novo* (a partir de precursores como la glucosa o aminoácidos como la glutamina (Collins et al., 2011)) o a la esterificación de los ácidos grasos obtenidos de la dieta. La síntesis de TAG puede ser a partir de la transformación del ácido cítrico a acetil-CoA por la ATP-citrato liasa, y subsecuentemente en malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa (ACC) (Saponaro et al., 2015). Los ácidos grasos no esterificados se activan en acil-CoA, por medio de la

acil-CoA sintetasa, posteriormente se forma un complejo con Glicerol-3-fosfato, por medio de una acilación realizada por la glicerol-3-fosfato aciltransferasa, resultando en la formación del ácido fosfatídico, seguido de una defosforilación por una fosfohidrolasa, lo que forma finalmente el diacilglicérido. La diacilglicerol aciltransferasa cataliza la conversión de diglicéridos en TAG.

4.2 Lipólisis

Una de las principales funciones del TA blanco es la lipólisis, la cual se define como el catabolismo de los TAG almacenados en los adipocitos, por medio del proceso de hidrólisis, transformándolos en tres moléculas de ácidos grasos libres y una molécula de glicerol durante periodos de demanda energética (Young & Zechner, 2013). Este catabolismo es regulado principalmente por tres enzimas: la lipasa de triglicéridos (ATGL), la cual cataliza la primera reacción, convirtiendo los TAG en diglicéridos, siendo esta reacción un paso limitante para las subsecuentes reacciones.

La lipólisis basal se regula principalmente por la ATGL y la lipasa sensible a hormonas (HSL) es la responsable principal de la hidrólisis de diglicéridos en monoglicéridos (MAG) en la lipólisis estimulada (activada canónicamente por un estímulo catecolaminérgico (Frühbeck, Méndez-Giménez, Fernández-Formoso, Fernández, & Rodríguez, 2014)). Finalmente, la lipasa de monoglicéridos (MGL) es la encargada de hidrolizar el último ácido graso y el glicerol (Schweiger et al., 2006; Zechner et al., 2012). En el tejido adiposo la ATGL y la HSL son las responsables de más del 95% de la hidrólisis de TAG (Schweiger et al., 2006).

Los mecanismos más importantes en la regulación de la lipólisis incluyen la activación de ATGL (por su coactivador CGI-58), ante un estímulo lipolítico (Lass et al., 2006; Oberer, Boeszoermyi, Nagy, & Zechner, 2011) y la fosforilación de dos proteínas: la HSL y la perilipina-1 (PLN). La PLN es una proteína asociada a la superficie de la gota lipídica, que regula la lipólisis por la unión de CGI-58, evitando su interacción con ATGL, además de bloquear el acceso de la HSL a la gota lipídica (Hashimoto, Segawa, Okuno, Kano, & Hamaguchi, 2010).

Las fosforilaciones de HSL y PLN, son mediadas por la proteína cinasa A (PKA) (Schweiger, Eichmann, Taschler, & Zimmermann, 2014). Durante la lipólisis basal (fig. 1a), la cual ocurre de manera continua y en bajo grado a lo largo del día, CGI-58 se encuentra unido a la PLN, de esta forma no puede coactivar a la ATGL, siendo esta enzima la que hidroliza los TAG y diglicéridos con una tasa de actividad baja. Por el contrario, posterior a un estímulo hormonal (e.g. adrenérgico, fig. 1b), la HSL que se encuentra en el citosol, así como la PLN, son fosforiladas por la PKA, lo que permite que la HSL sea translocada a la superficie de la gota lipídica (Brasaemle, Levin, Adler-Wailes, & Londos, 2000), mediante la formación de un complejo con la proteína de unión a ácidos grasos (FABP4) (Frühbeck, Méndez-Giménez, Fernández-Formoso, Fernández, & Rodríguez, 2014), acción que se requiere para incrementar la tasa lipolítica (Clifford, Londos, Kraemer, Vernon, & Yeaman, 2000). Esta fosforilación de PLN por la PKA permite la liberación de CGI-58, lo que la dispone para unirse y activar a la ATGL, incrementando su actividad (Granneman et al., 2007).

Finalmente, la FABP4 también participa acarreando a los ácidos grasos hacia las gotas lipídicas para su almacenamiento, así como hacia las mitocondrias y peroxisomas para su oxidación, o bien hacia la membrana celular para su transporte extracelular (Gan, Liu, Cao, Zhang, & Sun, 2015).

4.3 Inhibición de lipólisis por insulina

Una de las principales funciones de la insulina es inhibir la lipólisis en los adipocitos (Chakrabarti et al., 2013). Posterior a la ingesta de alimento, la insulina suprime la lipólisis a través de la activación de Akt, lo que resulta en la inhibición de la PKA (Choi et al., 2010), por la degradación de su segundo mensajero cAMP por la fosfodiesterasa 3B (PDE3B) (DiPilato et al., 2015; Duncan et al., 2007).

Una alta tasa de lipólisis contribuye a una alta concentración de ácidos grasos libres en circulación, lo cual resulta en que sean depositados en otros órganos generando lipotoxicidad y resistencia a la insulina, características en la DT2 y obesidad (Frayn, 2002). Esta resistencia a la insulina, a su vez, altera la capacidad de la insulina de

inhibir la lipólisis en el adipocito, deteriorando aún más la acción de la insulina (Choi et al., 2010).

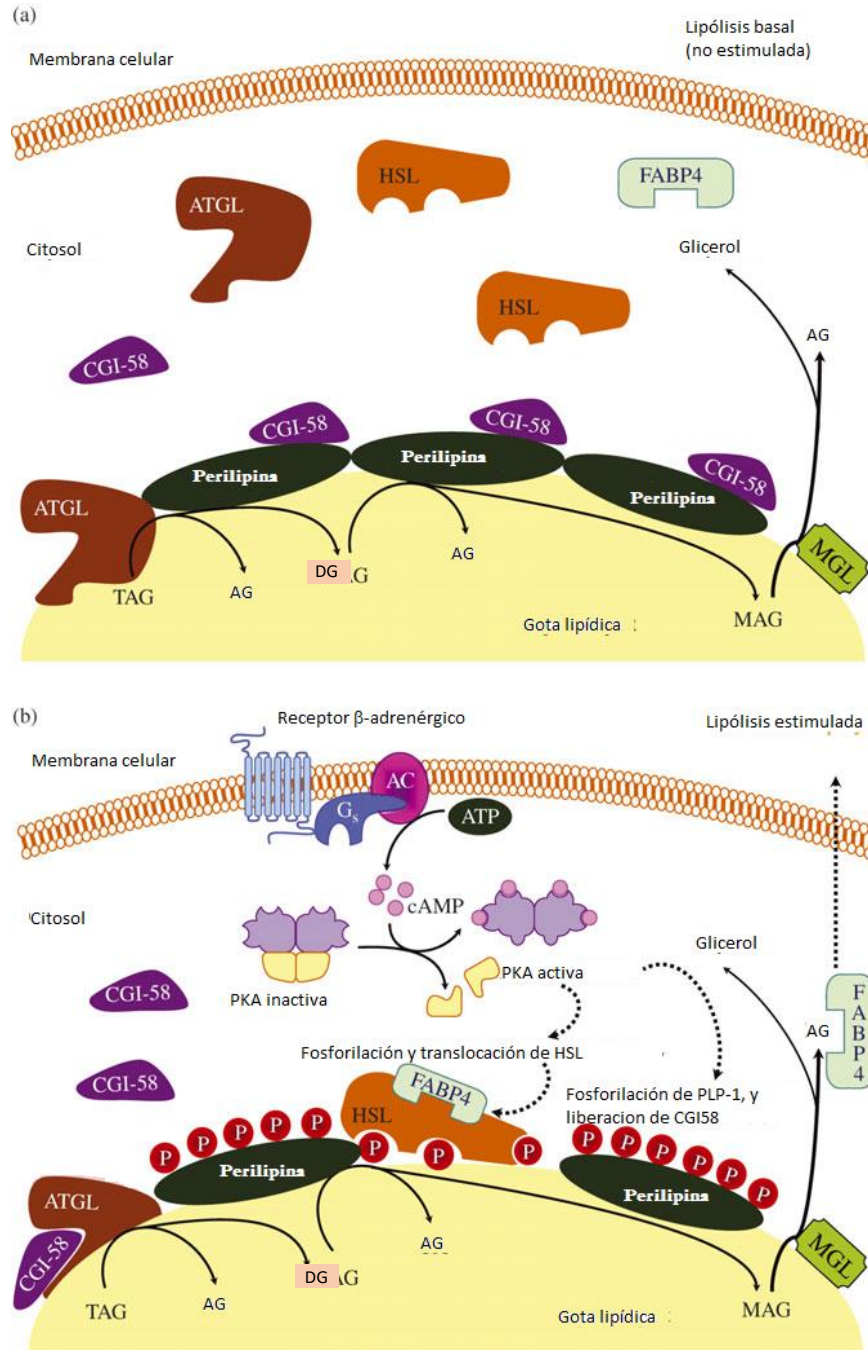


Figura.1. Esquema representativo de la lipólisis basal (a) y estimulada (b). AG, Ácidos grasos; AC, adenilato ciclasa; ATGL, lipasa de triglicéridos; cAMP, AMP cíclico; CGI-58, gen comparativo de identificación-58; TAG, triglicéridos; DG, diglicéridos; FABP4,

Proteína de unión a ácidos grasos 4; Gs, Proteína G estimuladora; *HSL*, lipasa sensible a la hormona; MAG, monolícido; MGL, lipasa de monoglicéridos; P, fosfato; PKA, Proteína cinasa A. Modificado de Frühbeck et al., 2014.

4.4 Regulación transcripcional de genes del metabolismo de lípidos en el adipocito

Como se ha mencionado, el metabolismo del adipocito es regulado por diversos factores, como enzimas, proteínas, receptores nucleares, etc., en donde su expresión juega un papel importante en esta regulación metabólica. Dentro de los más relevantes que se regulan transcripcionalmente se encuentra: 1) Receptor gama activado por proliferadores de peroxisomas (*PPAR γ* , por sus siglas en inglés), el cual es uno de los factores transcripcionales principales en la regulación de la adipogénesis y el acúmulo de grasa (Janesick & Blumberg, 2012), 2) AcetilCoA Carboxilasa (*ACC*) promoviendo la síntesis *de novo* de los lípidos (Zang et al., 2005), 3) Proteína de unión al elemento de respuesta los esteroides (*SREBP-1c*), un factor de transcripción relacionado con la biosíntesis de ácidos grasos (Adebayo et al., 2016), 4) Diacilglicerol aciltransferasa (*DGAT2*), enzima que cataliza el paso final en la síntesis de triglicéridos (esterificación) en los mamíferos (Suzuki et al., 2005) y 5) Fosfoenolpiruvato carboxicinasa (*PEPCK*), enzima que cataliza la conversión de oxalacetato a fosfoenolpiruvato, siendo el paso limitante en la síntesis de glicerol (Tontonoz, Hu, Devine, Beale, & Spiegelman, 1995).

Por otra parte, algunas de las proteínas que intervienen en la lipólisis también se pueden regular a nivel transcripcional como son las lipasas *ATGL* y *HSL* (Langin et al., 2005), el coactivador CGI-58 y la proteína de unión a ácidos grasos *FABP4* (Jaworski, Sarkadi-Nagy, Duncan, Ahmadian, & Sul, 2007).

5. Interacción entre dieta alta en grasa, arsénico y el metabolismo del adipocito

En la actualidad, no hay estudios en la literatura que exploren la interacción entre la dieta alta en grasa (DAG) y el arsénico sobre el metabolismo del adipocito, teniendo

como enfoque principal que pudieran llegar a interactuar como factores que desarrollen obesidad en los individuos expuestos a estos componentes.

5.1 Arsénico y tejido adiposo

Uno de los tejidos afectados por el arsénico es el tejido adiposo, influyendo en el proceso de crecimiento y diferenciación celular, síntesis y secreción de adipocinas, y en el metabolismo de lípidos y glucosa (Ceja-Galicia et al., 2017), sin embargo, los estudios realizados son muy aislados y en prácticamente en ninguno de ellos el objetivo es determinar su papel obesogénico.

En ratones expuestos durante cinco semanas a una dosis de 100 µg/L de arsénico, se observó que se incrementa el tamaño de los adipocitos de estos ratones. Adicionalmente, en adipocitos diferenciados de células mesenquimales humanas, tratados con una dosis de 1 µM de AsIII durante 24 - 72 horas, se observó un incremento en la lipólisis basal (Garciafigueroa, Klei, Ambrosio, & Barchowsky, 2013).

Además, se ha visto que el arsénico puede alterar los mecanismos del proceso de adipogénesis, durante el cual las células preadipocitas (como los fibroblastos) se diferencian en adipocitos comenzando el almacenamiento de lípidos. Factores de transcripción como *PPAR γ* (Lowe, O'Rahilly, & Rochford, 2011; Symonds, 2012) son los reguladores de este proceso, siendo estos mecanismos alterados en presencia de niveles no citotóxicos de diferentes especies de arsénico (≤ 5 µM de arsenito, ≤ 20 µM de arsenato o ≤ 1 µM del metabolito MMA^{III}) lo que reduce la adipogénesis. El efecto antiadipogénico se da a través de la respuesta del estrés de retículo endoplásmico, disminuyendo la actividad transcripcional de *PPAR γ* , habiendo una exposición en las primeras 48 h de inducción de la diferenciación celular (Hou et al., 2013)

Otro efecto del arsénico es una disminución de la captación de glucosa inducida por insulina, la cual se observa en ratones silvestres C57BL/6 expuestos durante 8 semanas a arsénico (25 µM y 50 µM) en el agua de bebida (Paul et al., 2007). Este hallazgo es relevante, indica la presencia de resistencia a la insulina e incrementa el riesgo de desarrollar DT2 (Abel et al., 2001).

5.2. Dieta alta en grasa y tejido adiposo

El tipo de ácido graso contenido en la dieta, así como la cantidad de grasa que la compone, tienen la capacidad de modular diversos aspectos del metabolismo del tejido adiposo. En particular, la morfología y tamaño de los adipocitos, la composición de los ácidos grasos esterificados dentro de los adipocitos y los liberados al suero, la expresión de genes y proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, la síntesis y secreción de adipocinas, así como la regulación de la lipólisis y la re-esterificación de los ácidos grasos (Díaz-Villaseñor et al., 2013; Olivares-García et al., 2015; Tovar et al., 2011). Adicionalmente, el tipo de grasa dietaria modula el efecto sobre el aumento en el reciclaje del receptor a glucagón en el tejido adiposo (Velázquez-Villegas et al., 2017), lo que pudiera tener un efecto sobre la lipólisis estimulada en el adipocito.

5.3 Interacción entre arsénico y dieta alta en grasa (DAG)

Existe cada vez más evidencia que apunta a que la dieta funciona también como un modulador, ya sea, positivo o negativo, de los efectos de los contaminantes ambientales (Hennig et al., 2012).

Como se ha mencionado, no se ha caracterizado al arsénico como obesógeno, sin embargo, estudios como los de Paul *et al.* (2011) intentan descifrar el papel de éste en el desarrollo de la obesidad y DT2, sumado a otro de los factores más importantes como lo es la DAG. Se observó en ratones alimentados con una DAG durante 20 semanas, que los niveles de glucosa en ayuno eran mayores, además de que eran más resistentes a la insulina que los ratones tratados con una dieta baja en grasa. Además, cuando a los animales con DAG se trataron con iAs en el agua de bebida (25 y 50 ppm) incrementaron su intolerancia a la glucosa de manera dosis dependiente, proponiendo que el iAs actúa sinérgicamente con la DAG (Paul et al., 2011).

Además, existe evidencia en roedores que el arsénico en el agua de bebida (25 y 50 ppm) durante 20 semanas, es sinérgico en presencia de una dieta alta en grasa

reduciendo los niveles séricos de las hormonas tiroideas T3 y T4 (Ahangarpour & Alboghobeish, 2017), induciendo estrés oxidante en el pulmón (Hemmati, Alboghobeish, & Ahangarpour, 2018), así como cardiotoxicidad (Ahangarpour et al., 2018).

DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

1. Cultivos celulares

La línea celular de fibroblastos de ratón, 3T3-L1, se siembra en placas de cultivo de 24 pozos (área por pozo 1.9 cm²), a una densidad de 25x10³ células por pozo y se mantienen en cultivo a 37 °C, 5% CO₂ con medio de Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) alto en glucosa (25 mM) (Gibco, cat. 12800017), piruvato de sodio (1 mM), bicarbonato de sodio (44.04 mM) (Sigma, cat. S5761), 1 % de antibiótico/antimicótico (BioWest, cat. L0010-100) y enriquecido con 10 % de suero de ternera recién nacida (STRN, BioWest, cat. S0750-500 ML) durante 48 horas hasta su confluencia y durante 48 horas extras para la inducción del arresto celular. Posteriormente, se induce la diferenciación celular (Día 0) con medio de diferenciación, el cual se compone de medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) alto en glucosa (25 mM), piruvato de sodio (1 mM), bicarbonato de sodio (44.04 mM) 1 % de antibiótico/antimicótico y enriquecido con 10 % de suero fetal bovino (SFB, BYproductos, Guadalajara, México) más el suplemento hormonal de 0.25 µM de dexametasona (Sigma, cat. D4902), 0.5 mM de 3-Isobutil-1-Metilxantina (IBMX, Sigma, cat I5879) y 1 µM de insulina glargina Lantus (Sanofi, México) durante 72 hrs (hasta el día 3). En el día 3 y hasta el día 11 se realiza cambio del mismo medio de diferenciación (sin suplemento hormonal) cada 48 horas (figura 2).

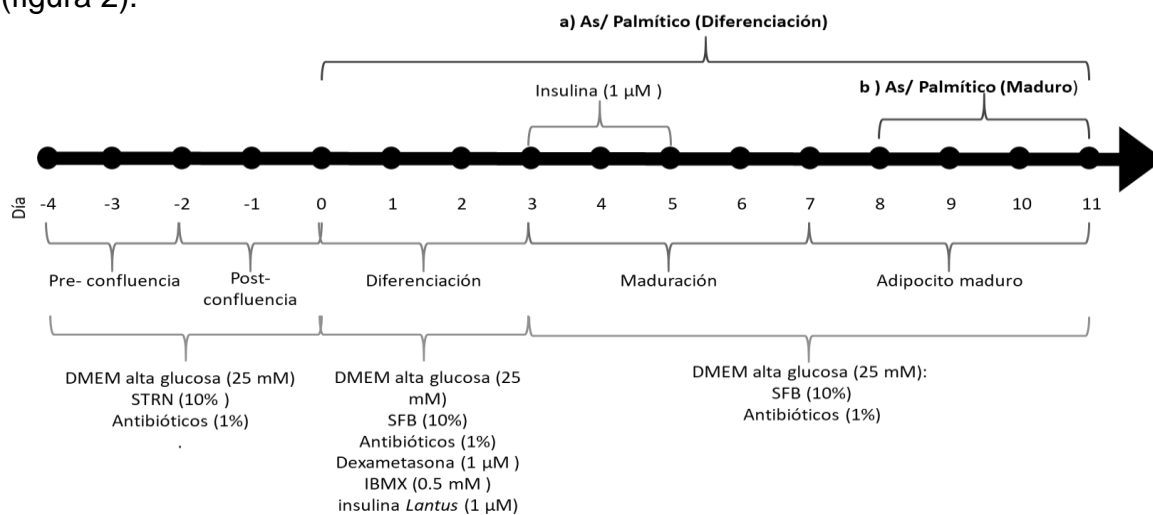


Figura 2. Estrategia de diferenciación celular y tratamientos.

2. Tratamientos

2.1 Arsenito de sodio

Para poder evaluar el efecto de la exposición al arsénico en el tejido adiposo se utilizó una preparación de arsenito de sodio. A partir de una solución stock de arsenito de sodio 1 M (Sigma, cat. 7784-46-5) preparada en condiciones estériles en 1 mL de agua destilada desionizada estéril (H₂O_{dd}) y filtrada con malla de PVDF de 0.22 micras, se prepara un segundo stock con una concentración 10 mM, diluyendo 10 µL de la solución 1 M en 990 µL de H₂O_{dd}. A partir de esta solución 10 mM, se preparan las soluciones de trabajo en concentraciones de 100, 200, 400, 1000 y 2000 µM, para que al volumen final de los pozos de las placas de cultivo celular (2 mL) se añadan 10 µL de estas soluciones de trabajo por pozo, quedando su concentración final de 0.5, 1, 2, 5 y 10 µM, respectivamente. Las soluciones preparadas se almacenan en tubos cónicos para microcentrifuga de color ambar a -20°C. Al grupo control se le trata solamente con H₂O_{dd} como control del vehículo.

2.2 Palmitato de sodio

Para probar el efecto del ácido graso saturado palmítico en el adipocito, como componente principal de las dietas altas en grasa, se utilizó una solución stock 100 mM de palmitato de sodio (Sigma, cat. P9767) en condiciones estériles, diluyendo 0.0556 g de palmitato de sodio en 2 mL de H₂O_{dd} y calentando a 65°C para que se disuelva. Se mantiene esta temperatura para preparar las soluciones de trabajo en concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 80 mM, para que las concentraciones finales en las placas de cultivo sean de 50, 100, 150, 200 y 400 µM, respectivamente. Las soluciones preparadas se almacenan en tubos cónicos para microcentrifuga de color ámbar a -20°C. Al momento de dar el tratamiento en las placas de cultivo, la solución se calienta a 60°C para que el palmitato se diluya de forma correcta en el medio de cultivo. Al grupo control se le trata solamente con H₂O_{dd} a 60°C como control del

vehículo.

2.3 Pioglitazona

Para el control positivo de acúmulo de grasa, basados en *Kletzien, 1991* (Kletzien, Clarke, & Ulrich, 1991), se prepara una solución stock de pioglitazona a 25.45 mM (agonista selectivo del receptor nuclear *PPAR γ* , Sigma, cat. E6910) disolviendo el contenido del frasco (0.01 g) en 1 mL de Dimetil sulfoxido (DMSO) estéril. De este stock se diluyen 392 μ L para un volumen final de 1 mL en DMSO, para obtener la solución de trabajo 10 mM de la solución de trabajo 10 mM se añaden 2.5 μ L por cada mL de medio, para una concentración final en las placas de cultivo de 25 μ M. Las soluciones de trabajo preparadas se almacenan en tubos cónicos para microcentrífuga de color ámbar a -20°C. Se utiliza DMSO estéril como control de vehículo.

2.4 Compuesto C (Dorsomorfina)

Como control negativo de acúmulo de grasa se utiliza un inhibidor selectivo y reversible de la cinasa de AMP, Compuesto C (Sigma, cat. P5499), para lo cual se prepara una solución stock 12.5 mM diluyendo el contenido del frasco (0.005 g) en 1 mL de DMSO estéril. Se calienta a 55°C hasta disolverse completamente y se deja enfriar. Se prepara la solución de trabajo 3 mM, tomando 240 μ L del stock 12.5 mM más 760 μ L de DMSO estéril. La concentración final por pozo es de 10 μ M y el tratamiento sólo se da durante la diferenciación celular. Se utiliza DMSO estéril como control de vehículo.

2.5 Isoproterenol

Para activar la lipólisis de las células en cultivo, se utiliza un agonista no selectivo de los receptores β -adrenérgicos, isoproterenol (Sigma, cat. CDS021593). Se prepara una solución stock 1 M, disolviendo 0.2 g de isoproterenol en 807 μ L de DMSO estéril. Se preparan soluciones stock de la siguiente manera:

Para preparar la solución stock 2 mM se toman 10 μ L del Stock 1 M y se diluyen en 4.99 mL de DMSO estéril.

Para preparar la solución stock 1 mM se toman 2.5 mL de la solución de trabajo 2 mM y se diluyen en 2.5 mL de DMSO estéril.

Para preparar la solución de trabajo 0.2 mM se toma 1 mL de la solución de trabajo 1 mM y se diluye en 4 mL de DMSO estéril.

Las concentraciones finales por cada ml de medio son: 1 μ M en el ensayo de activación de la lipólisis, y en el caso del ensayo de inhibición de la lipólisis se utiliza una dosis de 1 nM.

2.6 Forskolina

Como activador de la lipólisis de las células en cultivo, se utiliza un activador de la adenilato ciclasa, forskolina (Sigma, cat. F6886), preparando una solución stock 100 mM, diluyendo el contenido del frasco (0.025 g) en 610 μ L de DMSO estéril. Se preparan soluciones stock de la siguiente manera:

Para preparar la solución de stock 4 mM se toman 200 μ L del stock 100 mM y se diluyen en 4.8 mL de DMSO estéril.

Para preparar la solución stock 2 mM se toman 2.5 mL de la solución de trabajo 4 mM y se diluyen en 2.5 mL de DMSO estéril.

Para preparar la solución de trabajo 1 mM se toma 1 mL de la solución de trabajo 1 mM y se diluye en 4 mL de DMSO estéril.

Las concentraciones finales por pozo por cada mL de medio son: 5 μ M en el ensayo de activación de la lipólisis, y en el caso del ensayo de inhibición de la lipólisis se utiliza una dosis de 0.35 μ M.

2.7 Insulina

Para la inhibición de la lipólisis estimulada se utiliza insulina (Sigma, cat. I0516), Se prepara un stock 20 μM , diluyendo 11.5 μL del frasco original (1.74 μM) en 988.5 μL de buffer KRP (Krebs Ringer Buffer) (NaCl 136 mM, NaPO_4 (pH 7.4) 10 mM, MgSO_4 0.9 mM, CaCl_2 0.9 mM). Se prepara la solución de trabajo 5 μM , diluyendo 250 μL del stock 20 μM en 750 μL de buffer KRP. La concentración final por pozo por cada mL de medio para el ensayo es de 50 nM.

2.8 H89

Como control positivo de la inhibición de la lipólisis estimulada, se utiliza un inhibidor potente y selectivo de AMPK, H89 (Sigma, cat. B1427). Se prepara una solución stock 9.6 mM, diluyendo el contenido del frasco (0.005 g) en 1 mL de H_2O . La solución de trabajo 2 mM se prepara diluyendo 208 μL del Stock 9.6 mM en 792 μL de H_2O estéril. La concentración final por pozo por cada mL de medio para el ensayo es de 10 μM .

3. Sobrevida celular por tinción de ADN

Para evaluar el porcentaje de sobrevida celular directamente en los pozos al término del tratamiento, las células se fijan con paraformaldehído al 3.7 %. En el día 11 del experimento se remueve el medio con vacío y se enjuagan las células tres veces con PBS. Se añade la solución de paraformaldehído al 3.7 % y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se retira esta solución y se agrega paraformaldehído al 3.7 % fresco y se incuba por al menos una hora y hasta la tinción.

Una vez fijadas las células se retira el paraformaldehído al 3.7 % y se lavan las células con PBS, tres veces, durante 5 minutos cada vez. Posteriormente, se permeabilizan las células con PBS-Tritón al 0.1 % durante 5 minutos. Enseguida, se retira el PBS-Tritón con vacío y se lavan las células nuevamente con PBS, tres veces, durante 5 minutos cada vez.

Para la tinción de ADN, se añade diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI 1 µg/mL) (Sigma, cat. D9542) y se incuba durante 5 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente (TA). Se retira el DAPI con vacío y se enjuaga tres veces con PBS. Para realizar la lectura en fluorómetro de placas Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Vantaa Finland), las células se mantienen hidratadas con PBS. Se cuantifica la fluorescencia generada utilizando filtros de 360 nm (excitación) y 460 nm (emisión). Para el análisis, se toman las unidades relativas de fluorescencia de la condición control como el 100% de sobrevivencia celular.

4. Cuantificación de lípidos intracelulares por Rojo-O-Oleoso (ORO)

Para la tinción con ORO se utiliza una solución stock de ORO (8.565 mM, Sigma, cat. O0625) en isopropanol al 100 % la cual se diluye, utilizando por cada 1.5 mL de Stock ORO, 1 mL de H₂O. Se mezclan y se incuban por 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, esta solución se filtra con una membrana de acetato de celulosa con una apertura de malla de 0.22 µm.

Las células en los pozos de las placas celulares se fijan con paraformaldehído al 3.7 % en el día 11 del experimento, removiendo el medio con vacío y enjuagando las células tres veces con PBS, se añade la solución de paraformaldehído al 3.7 % y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se retira esta solución y se agrega paraformaldehído al 3.7 % fresco y se incuba por al menos una hora y hasta la tinción.

Una vez fijadas las células, se retira la solución de paraformaldehído al 3.7 %, y se lavan los pozos con isopropanol al 60%. Se deja secar completamente el alcohol, se agregan 500 µL de la solución de tinción de ORO, y se incuba por 30 minutos a TA. Posteriormente, se remueve la solución de ORO y las células se lavan inmediatamente cuatro veces con agua desionizada. Posteriormente, se retira toda el agua con vacío y se deja secar.

Para la determinación cuantitativa de grasa acumulada por medio de la tinción con ORO, a las células ya teñidas y secas se les trata con isopropanol al 100% por 20

minutos a TA en agitación constante, hasta que se eluye completamente el colorante. Se toma una alícuota de este eluido (100 μ L) y se determina su absorbancia en placas de 96 pozos utilizando espectrofotómetro de placa a una densidad óptica (DO) de 520 nm, utilizando como blanco isopropanol al 100%. Los datos se expresen relativos a la condición control del experimento.

5. Ensayo de lipólisis

5.1 Lipólisis basal

Una vez diferenciados los adipocitos 3T3-L1, se cambia el medio celular en el día 10 de diferenciación por DMEM alto en glucosa (25 mM) libre de suero, adicionado con piruvato de sodio (1 mM), bicarbonato de sodio (44.04 mM) (Gibco, NY, U.S.A), y con 2% de albúmina libre de ácidos grasos, durante 24 horas. Al finalizar se toma una alícuota del medio (manteniéndolo en frío) y se almacena en ultracongelador hasta la determinación de la cantidad de glicerol liberado al medio (véase punto 7). La concentración de glicerol para cada muestra se normaliza con respecto a la condición control de cada experimento, tomando este como el 100%.

5.2 Lipólisis estimulada

Los experimentos se realizaron una vez diferenciadas las células, en el día 11. Las células se lavan tres veces con PBS y para inducir un estado de metabolismo basal con una concentración de glucosa equivalente a la del ayuno, las células se incuban durante dos horas con 1 mL de buffer KRH (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ 2 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, Hepes 25 mM y glucosa 5.5 mM), libre de suero, adicionado con 2% de albúmina libre de ácidos grasos (ROCHE, cat. 10 775 835 001). Posterior a este periodo, se realizan tres lavados más con buffer KRH.

Para estimular la lipólisis las células se incuban con 1 μ M (final) de isoproterenol o 5 μ M (final) (Sigma, cat. I6504) de forskolina (Sigma, F6886) en 1 mL de buffer KRH (5.5 mM de glucosa) y 2% de albúmina libre de ácidos grasos, durante dos horas a 37 °C,

5% CO₂. L. Al transcurrir las dos horas, se toman alícuotas del medio, manteniendo las muestras en frío y almacenándolas en ultracongelador hasta la determinación de la cantidad de glicerol liberada al medio.

La concentración de glicerol para cada muestra se normaliza con respecto a la condición control de cada experimento, tomando éste como el 100% (véase punto 7).

6. Inhibición de lipólisis por insulina

Las células se lavan tres veces con PBS y para inducir el proceso de reseteo metabólico, las células se incuban durante 3 horas en buffer KRP (NaCl 136 mM, NaPO₄ 10 mM (pH 7.4), MgSO₄ 0.9 mM, CaCl₂ 0.9 mM), libre de suero, adicionado con 0.2 % de albúmina bovina fracción V (Sigma, cat. A-9647). Al término, se realizan tres lavados más con buffer KRP.

El experimento se realiza incubando a las células durante dos horas a 37 °C, 5% CO₂ con 1 mL de buffer KRP con 4% de albúmina libre de ácidos grasos, con el estímulo lipolítico (1 nM de isoproterenol o 0.35 µM de forskolina) más la insulina como inhibidor (50 nM). Al término de las dos horas, se toman alícuotas del medio, manteniendo las muestras en frío almacenándolas en ultracongelador hasta la determinación de la cantidad de glicerol liberada al medio.

La concentración de glicerol para cada muestra se normaliza con respecto a la condición control de cada experimento, tomando este como el 100% (véase punto 7).

7. Cuantificación de glicerol liberado al medio

La cantidad de glicerol liberado al medio en los diferentes ensayos lipolíticos (basal, estimulada e inhibida por insulina), se realiza mediante el ensayo enzimático colorimétrico con reactivo libre de glicerol (Sigma, F6428), reconstituido en 40 mL de H₂O, a temperatura ambiente. Las reacciones se llevan a cabo en en placa de 96 pozos (Costar, cat. 3590) y para el blanco se utilizan 200 µL de H₂O. Para la medición de las muestras se utilizan 2.5 µL de medio más 200 µL del reactivo libre de

glicerol. Adicionalmente, para el cálculo también se evalúa 2.5 µL de la solución estándar (Sigma, cat. G7793; 25 mg/mL) o de H₂Odd como blanco de referencia de la lectura basal ocasionado por las propias placas y el líquido (blc Ref), ambos con 200 µL del reactivo libre de glicerol, siguiendo las recomendaciones del proveedor. La reacción se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se obtiene en espectrofotómetro de placa a 540 nm, marcando como blanco para el equipo el pozo con agua, y los demás pozos como muestra. Todas las condiciones (blancos, estándares y muestras) se realizaron por duplicado.

A partir de la absorbancia obtenida se calcula la concentración de glicerol en el medio a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Glicerol (mg/mL)} = (\text{Abs muestra} - \text{Abs blc Ref}) / (\text{Abs ST} - \text{Abs blc Ref}) * 0.25$$

8. Extracción y cuantificación de RNA total

Para la extracción de ARN total se recolecta y se lisan las células con 500 µL de Trizol Reagent (Ambion cat. 15596018). Las muestras se incuban a temperatura ambiente por cinco minutos, se añade cloroformo y se agita manualmente. Las muestras se centrifugan a 12,000 g por 10 min a 4°C. Se recupera la fase acuosa y se añade isopropanol al 100% para precipitar al ARN. Se incuban las muestras por 10 min y se centrifugan nuevamente a 12,000 g por 10 min a 4°C para precipitar el ARN. Se elimina el isopropanol, se añade etanol al 75% (preparado con agua con dietil pirocarbonato (DEPC)) y se centrifuga a 7,500 g por cinco minutos a 4°C. Se elimina el etanol por decantación, se deja secar el precipitado y se resuspende en 20 µL de agua DEPC libre de RNAsas. La cuantificación del ARN total de cada muestra se realiza en NanoDrop (ThermoFisher) y las muestras se almacenan en ultracongelador hasta su utilización.

9. RT-PCR en tiempo real

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc), se realiza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcriptasa reversa. Se toman 3 µg de ARN total, considerando y que la capacidad máxima de la enzima es de 5 µg por reacción (Invitrogen, kit cat. 28025-013), y se diluyen con agua-DEPC a un volumen final de 9 µL en tubos para PCR. Se añaden 2 µL de Oligo dT (Invitrogen, cat. 18418-020) y 1 µL de dNTP Mix (Promega, cat. U1515) y se incuban en el termociclador a 65°C por 5 min. Posteriormente, se adicionan 4 µL de 5X First-standar Buffer, 2 µL de DTT 0.1 M (Invitrogen, kit cat. 28025-013), 0.5 µL de inhibidor de ribonucleasas (Recombinant RNasin-Promega, cat. N2511) y 0.5 µL de agua. Las muestras se incuban en termociclador a 37°C por 2 min. Posteriormente, se añade 1 µL de la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen, cat. 28025-013) y se incuba en termociclador a 25°C por 10 min, 37°C por 50 min y por último a 70°C por 10 min. Inmediatamente después, se dejan a 4°C dentro del equipo o se ponen en hielo.

Posteriormente, se evalúan los rangos dinámicos de las muestras para determinar la eficiencia de los oligos o Sondas Taqman y la concentración de cDNA adecuada para realizar el PCR-TR, mediante un pool de las muestras. Se obtiene un pool de muestras de cDNA a una concentración de 150 ng/µL y posteriormente se realizan diluciones seriadas 1:2 con agua desionizada, para obtener las siguientes concentraciones: 75, 37.5, 18.75, 9.375, 4.6875, 2.34375 ng/µL. La reacción se lleva a cabo con 1.4 µL de cDNA teniendo 105, 52.5, 26.5, 13.25, 6.56, 3.28 ng totales en cada punto para el caso de los genes que se evaluaron con sonda Taqman, y de 112.5, 56.25, 28.12, 14.05, 7.02 ng totales para los evaluados con SYBR Green (Applied Biosystems, cat. 4472908).

La cuantificación relativa del ARNm de *HSL* (cat. Mm00495359_m1), *FABP4* (cat. Mm00445878_m1) y *PPAR γ* (cat. Mm00440940_m1) y de los genes de expresión consitutiva ciclofilina (cat. Mm02342429) y HPRT (cat. Mm01545399), se realiza por PCR en tiempo real con el uso de sondas Taqman (Life Technologies®).

Se diseñaron los oligos para cuantificar con SYBR green *ATGL* (Forward (F) GAGGAATGGCCTACTGAACCAA, Reverse (R) AGGCTGCAATTGATCCTCCTC); *ACC* (F: AGAGCCAGGTTAGGGGGAAT, R: CCGGCCTGCTGGATTATCTT); *PEPCK*

(F: GTTTGATGCCCAAGGCAACTT, R: TGCCTTCCCAGTAAACACCC), Perilipina (F: GGCTGTCTGAGACTGAGGTG, R: TCTCCTGCTCAGGGAGGTC), *DGAT2* (F: AAGAAAGGTGGCAGGAGATCG, R: GCAGGTTGTGTGTCTTCACC), CGI58 (F: ACAGGGTGGCTTCCTACCT, R: TGTAAGTGCAGGGGACACATTTTA) y SREBP1 (F: ACTTTTCCTTAACGTGGGCCT, R: TGAGCTGGAGCATGTCTTCG),.

La eficiencia de las sondas se calculó con la siguiente fórmula (M. W. Pfaffl, 2001):

$$Ef = 10^{(-\frac{1}{m})}$$

Donde “m” es la pendiente de la recta obtenida a partir del rango dinámico. Las eficiencias para cada gen fueron las siguientes: *FABP4* (1.64), *PPAR γ* (1.65), *ATGL* (1.86), *HSL* (1.73), *ACC* (2.57), *PEPCK* (2.23), Perilipina (2.14), *DGAT2*(1.89), CGI58 (2.33), SREBP1 (2.53), HPRT (1.78) y ciclofilina (1.75).

El análisis de la expresión relativa de los genes se realizó con el método de Pfaffl (Michael Walter Pfaffl, Tichopad, Prgomet, & Neuvians, 2004) para dos genes constitutivos con la siguiente formula:

$$Abundancia\ Relativa = \frac{EfGi^{(Ct\ CbGi - Ct\ UkGi)}}{\sqrt{EfRef1^{(Ct\ CbRef1 - Ct\ UkRef1)} * EfRef2^{(Ct\ CbRef2 - Ct\ UkRef2)}}$$

Donde “Ef” es la eficiencia de la sonda Taqman u oligos, “Gi” se refiere al gen de interés, “Ct” es el valor que corresponde al ciclo donde se alcanzó el umbral, “Cb” es el promedio del control biológico, “Uk” hace referencia al valor de la muestra que se está evaluando y “Ref” a los genes de expresión constitutiva que se están tomando de referencia.

10. Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm el error estándar de la media. Para la

comparación de los grupos, los resultados de los experimentos fueron evaluados por análisis de varianza de una vía (ANOVA). Para las comparaciones estadísticas entre los grupos, se utilizó una prueba de comparación múltiple *post hoc* Fisher's LSD. El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico y de graficación *GraphPad Prism*, versión 6.

RESULTADOS

1. Sobrevida celular

Se evaluó el porcentaje de sobrevida celular al término de los tratamientos, con el objetivo de identificar las dosis no citotóxicas de arsenito de sodio, de palmitato de sodio y la mezcla de ambos en los dos esquemas de exposición. Para el arsenito de sodio se probaron las dosis de 0.5, 1, 2, 5 y 10 μM , mientras que para palmitato de sodio las dosis evaluadas fueron de 50, 100, 150, 200 y 400 μM , las cuales fueron decididas con base a la literatura (Díaz-Villaseñor, Sánchez-Soto, Cebrián, Ostrosky-Wegman, & Hiriart, 2006; Langin et al., 2005).

Los resultados indicaron que la sobrevida celular de los adipocitos disminuyó estadísticamente ($p < 0.0001$) sólo cuando las células fueron tratadas con 10 μM de arsenito de sodio (figura 3A) y con 400 μM de palmitato de sodio (figura 3B) desde el inicio de la diferenciación celular. Con base en estos datos también se probó la combinación de 200 μM de palmitato de sodio, por ser la dosis más alta sin citotoxicidad, con las diferentes dosis de arsenito de sodio, encontrando que únicamente con 10 μM de arsenito de sodio hubo una disminución significativa en la sobrevida celular durante la diferenciación de los adipocitos (figura 3C).

Por el contrario, cuando los adipocitos maduros se expusieron por 72 h, no se observó disminución en la sobrevida celular con los tratamientos de arsenito de sodio (figura 3D), palmitato de sodio (figura 3E) o su combinación (figura 3F).

A partir de estos resultados de sobrevida celular, se decidió que el resto de los experimentos se realizaran con las dosis de 1 μM para arsenito de sodio y 200 μM para palmitato de sodio.

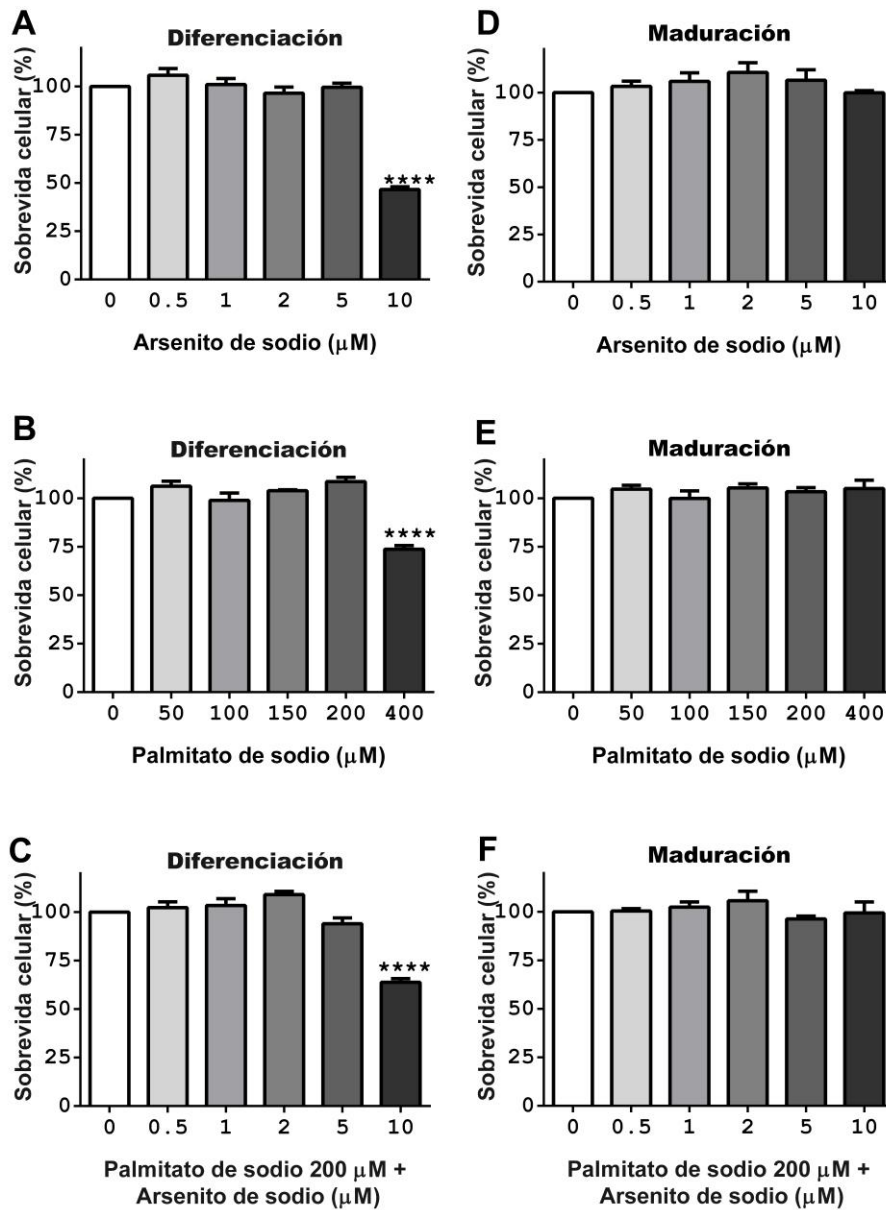
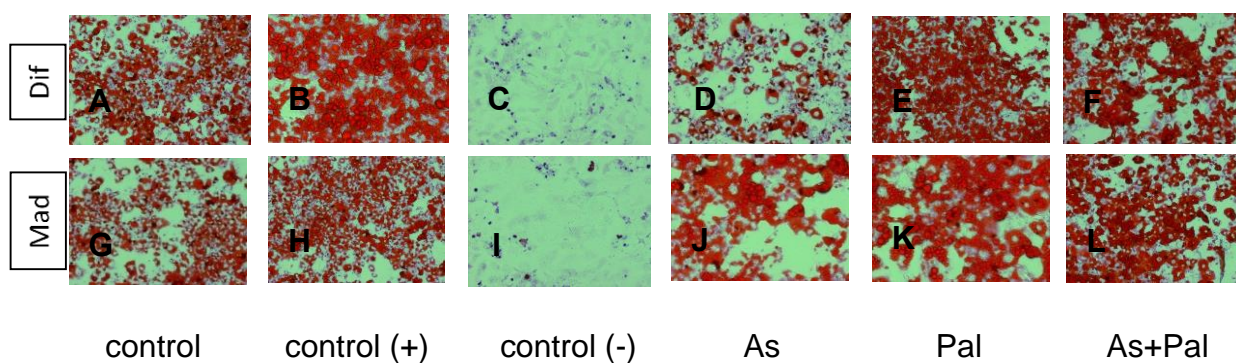


Figura 3. Sobrevida celular determinada por fluorimetría con tinción con DAPI. Exposición a arsenito de sodio 0-10 μM (A y D), palmitato de sodio de 0-400 μM (B y E) y la combinación de palmitato de sodio 200 μM + arsenito de sodio 0-10 μM (C y F) en diferenciación (A-C) y maduración (D-F). Datos presentados en media \pm error estándar de la media. Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno por duplicado. Análisis estadístico ANOVA de una vía, post hoc Fisher LSD. Diferencias significativas **** $p < 0.0001$ vs. control.

2. Lipogénesis

El adipocito puede acumular grasa mediante la esterificación de ácidos grasos adquiridos del medio o mediante lipogénesis *de novo*, la cual puede ocurrir en adipocitos maduros o a través de la adipogénesis a partir de preadipocitos. En ambos esquemas de exposición (diferenciación y maduración) el acúmulo de grasa en los adipocitos fue determinado por la tinción con Rojo-O-Oleoso (figura 4) y posteriormente el colorante se eluyó para cuantificar la cantidad de lípidos acumulados (figura 5). Como control positivo de la adipogénesis, las células fueron tratadas con pioglitazona e insulina (figura 4B y 4H) aumentando un 10% el acúmulo de grasa en comparación de la condición control. Como control negativo, las células se expusieron



a Compuesto C (figura 4C y 4I), en el cual se observó una disminución del acúmulo de grasa en un 75%.

Figura 4. Fotografías del acúmulo de grasa en adipocitos en condición control (A y G). Control positivo (B y H): tratamiento con Pioglitazona (25 μM) e insulina (150 nM) post-diferenciación. Control negativo (C e I): tratamiento con Compuesto C (10 μM) durante la diferenciación celular. Adipocitos expuestos desde la diferenciación celular a dosis de 1 μM de arsenito de sodio (D), 200 μM de palmitato de sodio (E) y combinados (F), o adipocitos maduros expuestos a dosis de 1 μM de arsenito de sodio (J), 200 μM de palmitato de sodio (K) y combinados (L). Microscopio invertido de campo claro, aumento 10X.

Con base en las observaciones en el microscopio y los datos cuantitativos, se obtuvo que, en los adipocitos tratados con arsenito de sodio, la cantidad de lípidos acumulados disminuyó 24 % en la condición de diferenciación y 9 % en la condición de maduración (figura 4D, 4J, 5A y 5B). Por el contrario, la cantidad de lípidos acumulados en los adipocitos tratados con el palmitato de sodio se incrementó en ambos casos de manera significativa con respecto al control, entre un 15 y 8 % en la condición de diferenciación y maduración, respectivamente (figura 4E, 4K, 5A y 5B). En el caso del tratamiento combinado de arsenito y palmitato de sodio, el efecto dependió del esquema de tratamiento; en los adipocitos maduros el acúmulo de grasa tuvo un ligero, pero significativo aumento con respecto al control (11 %) (figura 4L y 5B). Mientras que en los adipocitos expuestos desde el inicio de la diferenciación no se observaron cambios (figura 4F y 5A).

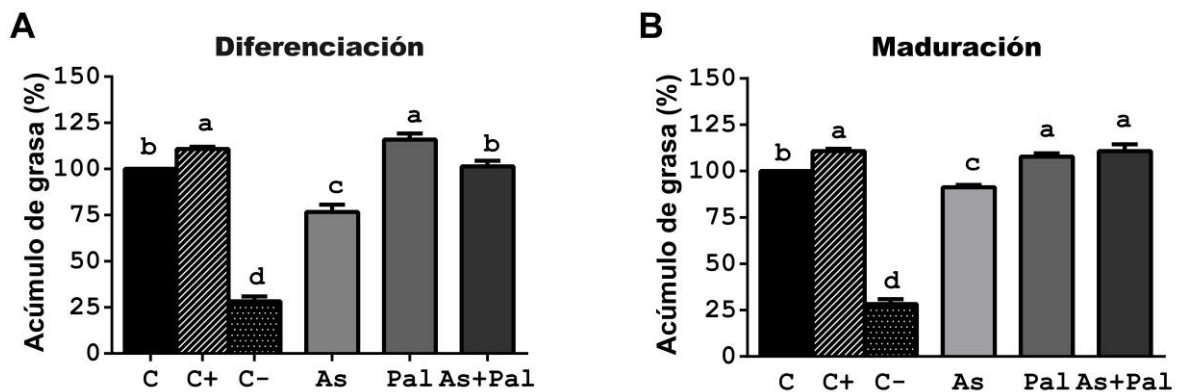


Figura 5. Acúmulo de grasa en adipocitos en condición control (C), Control positivo (C+): tratamiento con Pioglitazona (25 μ M) e insulina (150 nM) post-diferenciación y control negativo (C-): tratamiento con Compuesto C (10 μ M) durante la diferenciación celular expuestos a dosis de 1 μ M de arsenito de sodio (As), 200 μ M de palmitato de sodio (Pal) y combinados (As+Pal), desde su diferenciación (A) o una vez maduros (B). Datos presentados en media \pm error estándar de la media de seis experimentos independientes realizados por duplicado. Análisis estadístico ANOVA de una vía *post hoc* Fisher LSD, en donde letras diferentes denotan diferencias estadísticamente

significativas (a>b>c>d), p<0.05.

Con el fin de determinar el origen del aumento en el acúmulo de grasa se evaluó la expresión de genes que se regulan transcripcionalmente y están involucrados en el proceso de adipogénesis.

PPAR γ

El tratamiento combinado de arsenito de sodio con palmitato de sodio disminuyó en los adipocitos en un 30 % (diferenciación) y 13 % (maduración) la expresión del ARN mensajero (ARNm) del gen *PPAR γ* con respecto al grupo control (p<0.05). Por el contrario, el tratamiento con arsénico solo únicamente desde el inicio de la diferenciación disminuyó la expresión de *PPAR γ* de forma significativa en un 36 % con respecto al grupo control (figura 6A y 6F).

SREBP-1c

La expresión del ARNm de *SREBP-1c* en los adipocitos tuvo una disminución del 32 % que fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control (p<0.05), en los adipocitos maduros tratados solamente con palmitato de sodio y en combinación con el arsenito de sodio (figura 6B). En los adipocitos tratados desde el inicio de la diferenciación celular no se observó ningún efecto (figura 6G).

ACC

La expresión del ARNm de *ACC* en los adipocitos disminuyó entre el 40 y 61 % en presencia del tratamiento de arsenito de sodio y en combinación con palmitato de sodio, respectivamente, cuando la exposición ocurrió solamente desde el inicio de la diferenciación celular (figura 6C), sin ningún efecto en los adipocitos maduros (figura 6H).

DGAT2

El tratamiento combinado de arsenito y palmitato de sodio disminuyó en un 18 % la abundancia del ARNm de *DGAT2* en los adipocitos expuestos desde el inicio de la

diferenciación celular, así como en los adipocitos expuestos siendo una vez maduros, con respecto al grupo control ($p < 0.05$) (figura 6D y 6I). El tratamiento de arsenito de sodio solo, disminuyó de igual forma en un 21 % la expresión de este ARNm, pero únicamente en los adipocitos expuestos desde el inicio de la diferenciación celular (figura 6D).

PEPCK

La expresión del ARNm de *PEPCK* mostró un comportamiento muy similar al de *DGAT2* y *ACC*. En particular, la expresión en ambos esquemas de exposición (desde el inicio de la diferenciación o como adipocitos maduros) disminuyó entre un 50 y 78 % con el tratamiento únicamente de arsenito de sodio ó en combinación con palmitato, mientras que el tratamiento únicamente con palmitato de sodio no tuvo efecto (figura 6E y 6J).

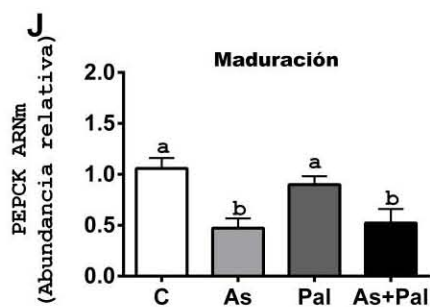
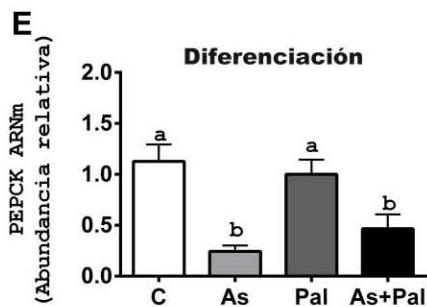
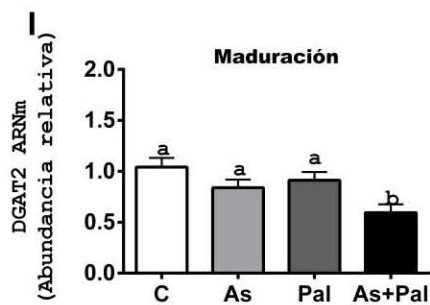
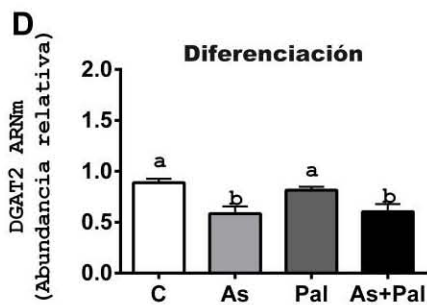
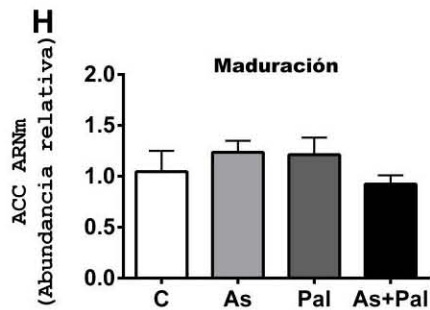
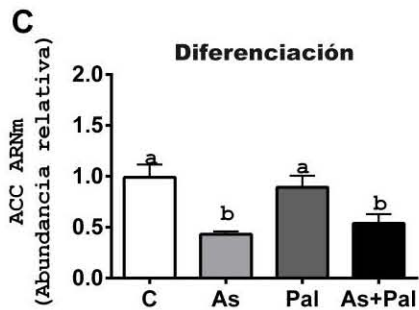
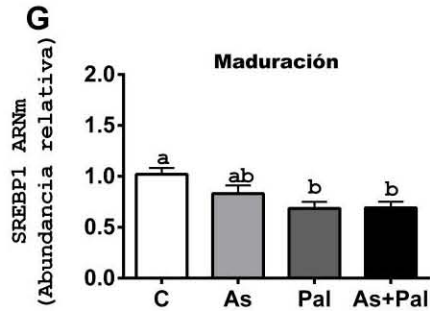
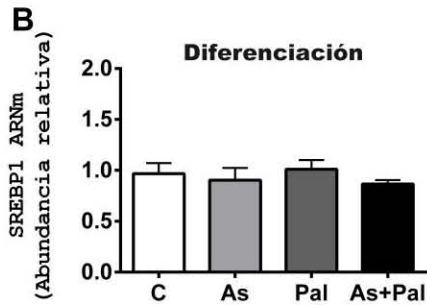
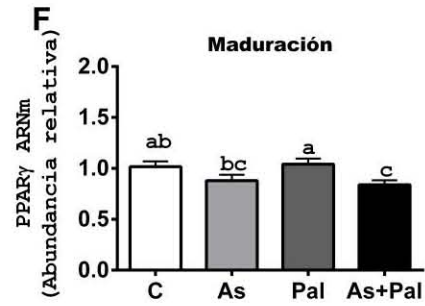
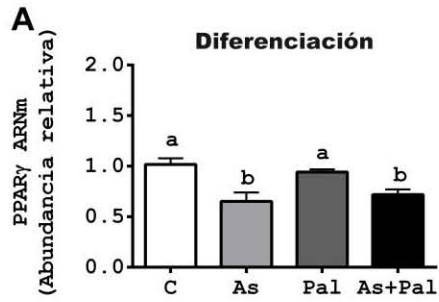


Figura 6. Abundancia relativa del mRNA de *PPAR* γ (A y F), *SREBP1* (B y G), *ACC* (C y H), *DGAT2* (D y I) y *PEPCK* (D y J), analizados con respecto a los genes de expresión constitutiva *ciclofilina* y *HPRT*, en ambos esquemas de exposición (diferenciación y maduración). Datos presentados en media \pm EEM. N= 3 por duplicado. Análisis estadístico ANOVA de una vía *post hoc* Fisher LSD. En donde letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas (a>b>c), p<0.05.

3. Lipólisis basal

Al evaluar el porcentaje de lipólisis basal en los adipocitos, se observó que cuando se tratan desde el inicio de la diferenciación (figura 7A) con arsenito de sodio, palmitato de sodio la cantidad de glicerol liberada al medio incrementa cerca de un 40% y la combinación de ambos, alrededor de un 200%. Cuando las células son tratadas una vez maduras (figura 7B) el incremento en la cantidad de glicerol liberada al medio aumenta de manera significativa sólo con el tratamiento de arsenito de sodio (60 %) y con la combinación de arsenito de sodio y palmitato de sodio (200 %) (p<0.05).

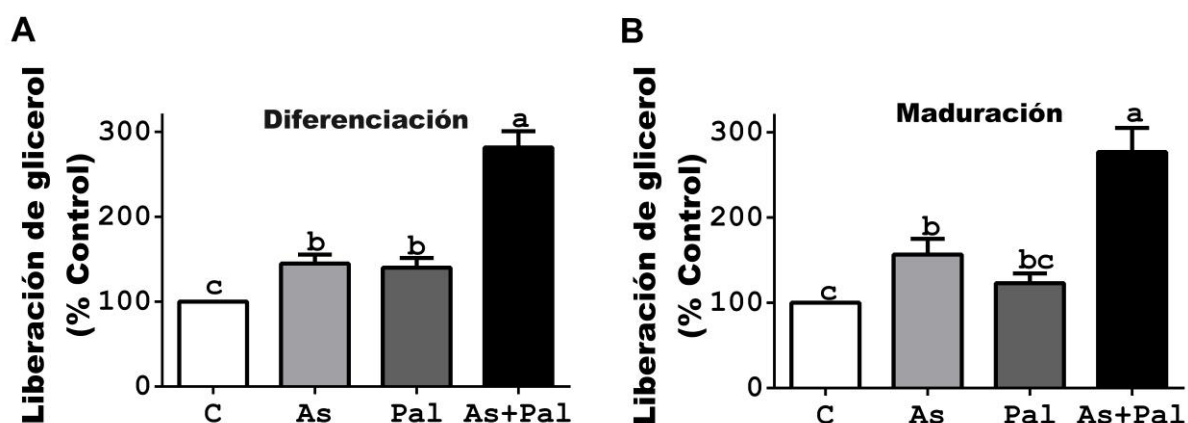


Figura. 7 Lipólisis basal, determinada por la cuantificación de glicerol liberado al medio por adipocitos 3T3-L1 en 24 h, tras ser expuestos a dosis de 1 μ M de arsenito de sodio (As), 200 μ M de palmitato de sodio (Pal) y combinados (As+Pal), desde el inicio de su diferenciación (A) y una vez siendo adipocitos maduros (B). Datos presentados en media \pm error estándar de la media. Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno por duplicado. Análisis estadístico ANOVA de una vía *post hoc* Fisher LSD.

En donde letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ($a>b>c$), $p<0.05$.

4. Lipólisis estimulada

Una vez concluidos los tratamientos con arsenito y/o palmitato de sodio en ambos esquemas de tratamiento, se estimuló la lipólisis con isoproterenol (agonista β -adrenérgico) o con forskolina (activador de la adenilato ciclasa). En todas las condiciones se observó un incremento en la lipólisis, determinada por la cantidad de glicerol liberada al medio en 120 min, con respecto a su condición basal sin estimulación ($p<0.05$). Sin embargo, con el tratamiento de arsenito de sodio en los adipocitos maduros se observa que el efecto lipolítico inducido por isoproterenol así como de la Forskolina, fue significativamente menor aproximadamente en un 30 a 40 %, al ser comparados con la misma condición de estímulo del grupo control ($p<0.05$) (figura 8A y 8B).

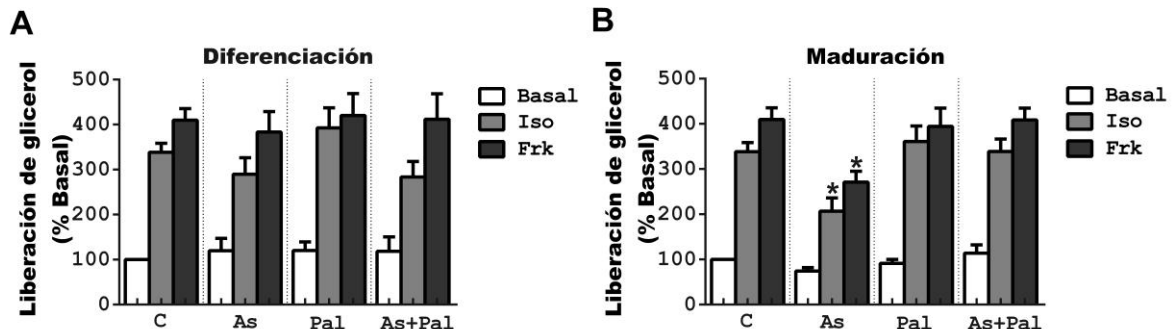


Figura 8. Lipólisis estimulada con Isoproterenol (Iso: 1 μ M) o con Forskolina (Frk: 5 μ M) durante 120 min al término de los tratamientos: 1 μ M de arsenito de sodio (As), 200 μ M de palmitato de sodio (Pal) y combinados (As+Pal), desde el inicio de su diferenciación (A) o una vez como adipocitos maduros (B). Glicerol liberado al medio por adipocitos 3T3-L1 como marcador de lipólisis. Datos presentados en media \pm error estándar de la media. Se realizaron cinco experimentos independientes, cada uno por duplicado. Análisis estadístico ANOVA de una vía *post hoc* Fisher LSD. Diferencias estadísticamente significativas * vs la condición Control (C) del mismo estímulo

lipolítico respectivamente (Basal, Iso ó Frk), $p < 0.05$.

Con el fin de entender los cambios observados en la lipólisis estimulada, se evaluó la expresión de genes que intervienen en el proceso, como son las lipasas *HSL*, *ATGL* y su co-activador *CGI-58*, la *perilipina* y *FABP4* encargada del transporte de ácidos grasos, así como de la translocación de *HSL* a la vacuola lipídica.

ATGL

La expresión del ARNm de la lipasa *ATGL* disminuyó de manera significativa entre el 15 y 30 % en los adipocitos tratados desde el inicio de la diferenciación con el arsenito y/o con el palmitato de sodio, (figura 9A). De igual forma, la expresión de este ARNm disminuyó únicamente con la exposición al tratamiento combinado de arsenito y palmitato de sodio en los adipocitos maduros, comparados con los del grupo control ($p < 0.05$) (figura 9F).

CGI-58

Los tres tratamientos disminuyeron la expresión del ARNm de *CGI-58* en los adipocitos expuestos desde el inicio de la diferenciación celular (figura 9B). Además, el tratamiento combinado (As+Pal) en los adipocitos expuestos una vez maduros, disminuyó la expresión de *CGI-58* 21 % (figura 9G), en todos los casos siendo estadísticamente significativo con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

HSL

El tratamiento con arsenito de sodio o en combinación con el palmitato (As+Pal) disminuyó un 33 % la expresión del ARNm de la lipasa *HSL* en los adipocitos expuestos desde el inicio de la diferenciación celular (figura 9C), mientras que en los adipocitos expuestos una vez maduros, el efecto sólo se observó con el tratamiento combinado (figura 9C y 9H), con respecto al grupo control, disminuyendo su expresión en un 35 % ($p < 0.05$).

PLN

La expresión del ARNm de perilipina (PLN) disminuyó entre 42 y 47 % en los adipocitos expuestos desde el inicio de la diferenciación celular tratados con arsenito de sodio o bien con el tratamiento combinado (As+Pal) (figura 9D), ambos con respecto al grupo control ($p < 0.05$). En el caso de los adipocitos maduros expuestos a los tratamientos, sólo se observó una tendencia a disminuir la expresión de este ARNm en el tratamiento combinado (figura 9I).

FABP4

El tratamiento de arsenito de sodio, así como la combinación de arsenito de sodio con palmitato de sodio, disminuyeron la expresión del ARNm de *FABP4* en los adipocitos expuestos desde el inicio de la diferenciación celular entre 31 y 43 % (figura 9E), así como los adipocitos expuestos una vez maduros, disminuyendo entre el 20 y 25 % (figura 9J) con respecto a los adipocitos del grupo control ($p < 0.05$).

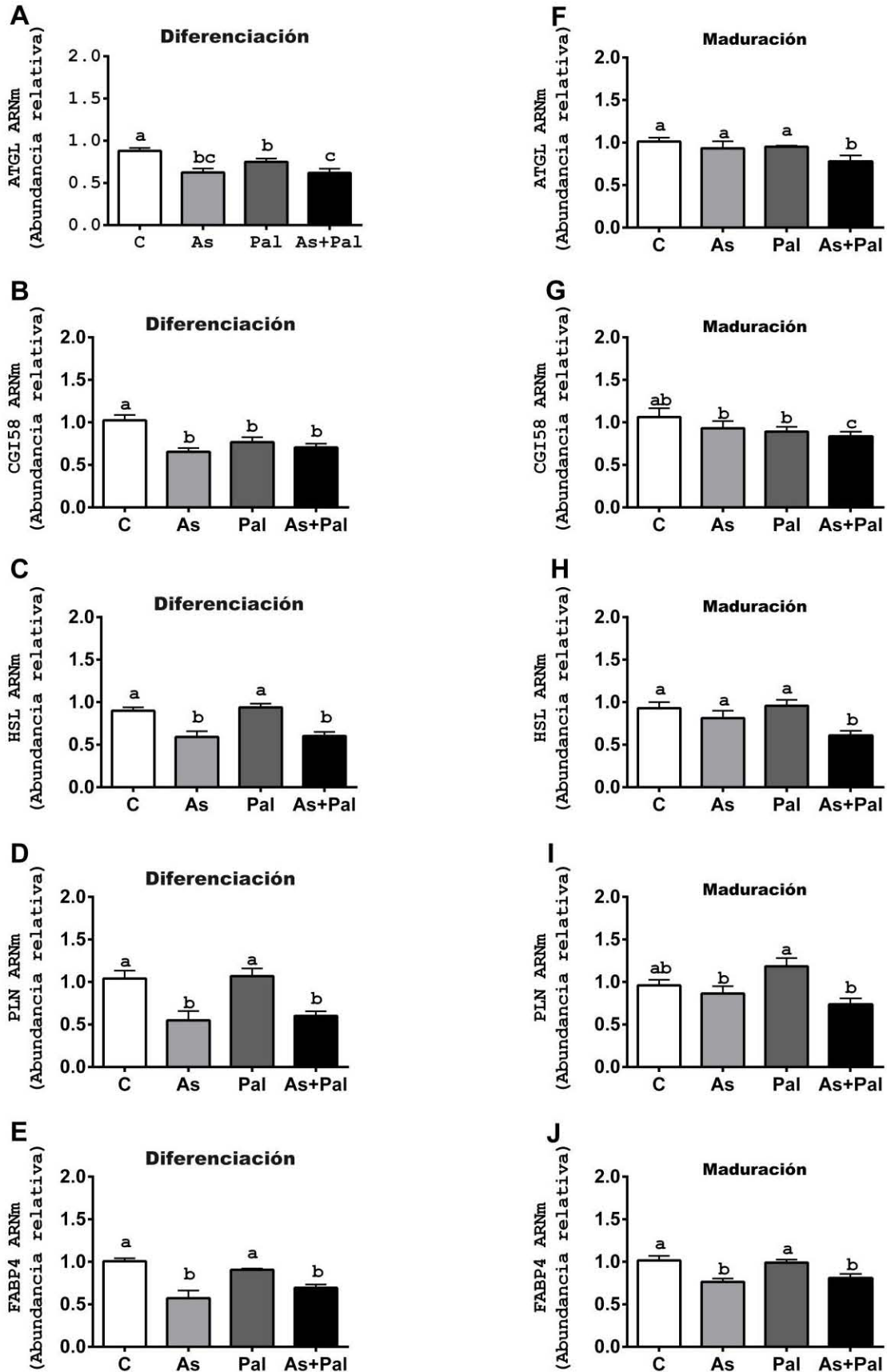


Figura 9. Abundancia relativa del mRNA de *ATGL* (A y F), *CGI-58* (B y G), *HSL* (C y H) y *FABP4* (E y J) en adipocitos durante la diferenciación y maduración en presencia de control (C), ácido ascórbico (As), ácido palmítico (Pal) o una combinación de ácido ascórbico y ácido palmítico (As+Pal).

H), *PLN* (D y I) y *FABP4* (D y J) con respecto a los genes de expresión constitutiva *ciclofilina* y *HPRT*, en ambos esquemas de exposición (diferenciación y maduración). Datos presentados en media \pm EEM. N= 3 por duplicado. Análisis estadístico ANOVA de una vía *post hoc* Fisher LSD. En donde letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ($a>b>c$), $p<0.05$.

5. Inhibición de lipólisis por insulina

Otros de los puntos críticos en la regulación de la lipólisis es su inhibición por insulina, la cual es una de las principales funciones de esta hormona en el adipocito. En la condición control observamos que la insulina es capaz de ejercer su efecto antilipolítico reduciendo significativamente la liberación de glicerol con respecto al estímulo lipolítico con el agonista β -adrenérgico, Isoproterenol (figuras 10A y 10B), tanto como con el activador de la adenilato ciclasa, Forskolina (figuras 10C y 10D), ya sea en las condiciones de tratamiento desde la diferenciación celular (figuras 10A y 10C) así como en los adipocitos tratados una vez siendo maduros (figuras 10B y 10D).

Por el contrario, los tratamientos únicamente con arsenito de sodio y el combinado con palmitato de sodio desde el inicio de la diferenciación, disminuyen la respuesta antilipolítica de la insulina en presencia de Isoproterenol de forma significativa (Figura 10A), ya que, en presencia de isoproterenol e insulina, la cantidad de glicerol liberado es similar a la del estímulo lipolítico (isoproterenol) sin insulina. En el caso de los adipocitos maduros, la insulina ejerció su efecto antilipolítico en todos los tratamientos ya que la liberación de glicerol fue significativamente menor en presencia de insulina (figura 10B).

Con el estímulo lipolítico con forskolina desde el inicio de la diferenciación (figura 10C), o cuando los adipocitos son tratados una vez maduros con los dos estímulos lipolíticos (figura 10C y 10D), la insulina sí es capaz de reducir la cantidad de glicerol liberado al medio a valores cercanos a la condición basal o incluso menor.

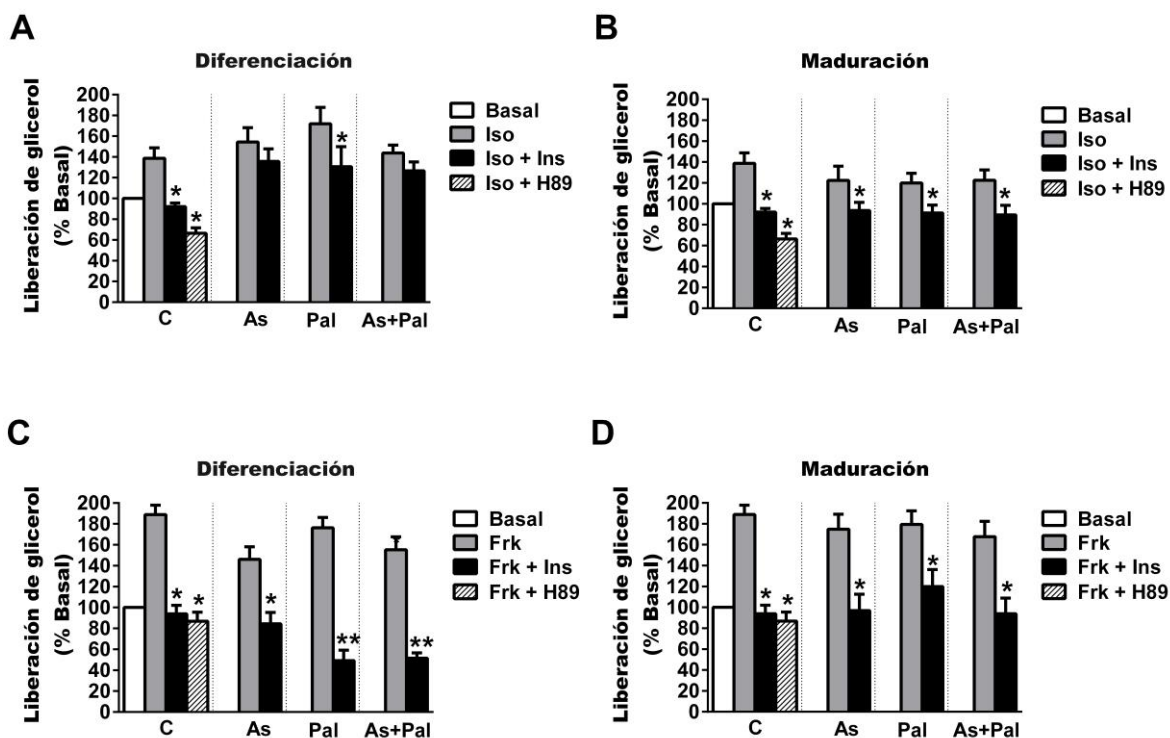


Figura 10. Inhibición de la lipólisis por insulina (100 nM) en combinación con estímulo c/s Isoproterenol (Iso: 1 nM) (10A y 10B) o Forskolina (Frk: 0.35 μ M) (10C y 10D) durante 120 min al término del tratamiento, determinada por la cuantificación de glicerol liberada por adipocitos 3T3-L1, al ser expuestos a dosis de 1 μ M de arsenito de sodio (As), 200 μ M de palmitato de sodio (Pal) y combinados (As+Pal), desde su diferenciación (10A y 10C) o una vez maduros (10B y 10D). Análisis estadístico ANOVA de una vía *post hoc* Fisher LSD. Datos presentados en media \pm error estándar de la media. Se realizaron cinco experimentos independientes, cada uno por duplicado. Diferencias estadísticamente significativas * vs. estímulo lipolítico (Isoproterenol o Forskolina) de cada tratamiento, * p <0.05, ** p <0.01.

DISCUSIÓN

La regulación entre la lipogénesis y la lipólisis en el adipocito es crucial para un buen funcionamiento metabólico y se sabe que estos se alteran en el proceso de la obesidad. Uno de los potenciales mecanismos de acción del arsénico como obesógeno a través de su efecto sobre el tejido adiposo, es posiblemente alterando dichos procesos metabólicos.

La sobrevivencia celular de los adipocitos no fue afectada por ninguna de las concentraciones probadas con los tratamientos con arsenito de sodio o con el palmitato de sodio con respecto a la condición control, tanto en la exposición por 72 h en adipocitos maduros, como en las células que fueron tratadas por un periodo de 11 días desde el inicio de la diferenciación celular, ya que se quería evitar el efecto citotóxico de ambos compuestos en este estudio. Hou et al., describe de forma similar, que el tratamiento con arsenito de sodio a preadipocitos por 48 h de exposición, sólo resulta citotóxico de forma significativa con dosis de 20 μM , mientras que con una dosis de 10 μM , sólo hay una ligera tendencia de menor viabilidad celular (Hou, 2012).

En el trabajo aquí presentado, la dosis que mostró efecto citotóxico de forma significativa fue la concentración de 10 μM , únicamente durante el periodo de exposición de 11 días, cuando las células se expusieron desde el inicio de la diferenciación celular (preadipocitos). Por el contrario, cuando la exposición duró únicamente 72 h en adipocitos maduros, la dosis de 10 μM no fue citotóxica. Ya que los tiempos de exposición en ambos esquemas probados en este trabajo no fueron los mismos (11 vs 3 días) no se puede determinar si la diferencia encontrada se debe a los diferentes tiempos de exposición o a una sensibilidad diferente de las células dada por el estadio celular en el que se encontraban durante el tiempo que duraron los tratamientos (diferenciación vs maduración celular).

En relación al acúmulo de grasa, cuando el tratamiento ocurre desde el inicio de la diferenciación celular, se observa menor cantidad de grasa intracelular, sobre todo con el tratamiento de arsenito de sodio, junto con una menor abundancia de los genes con regulación transcripcional que codifican para *PPAR γ* (Adebayo et al., 2016), *ACC*

(Suzuki et al., 2005), *DGAT2* (Tontonoz et al., 1995) y *PEPCK* (Zang et al., 2005), sugiriendo menor grado de adipogénesis, menor lipogénesis *de novo* y menor esterificación de ácidos grasos libres, respectivamente. Por el contrario, cuando los adipocitos fueron tratados con arsenito ya en su estadio de maduración, el aumento en el acúmulo de grasa no se vio reflejado con un aumento en la expresión transcripcional de los genes *PPAR γ* , *SREBP-1c*, *ACC*, *DGAT2* y *PEPCK*, involucrados en la adipogénesis, lipogénesis *de novo* y esterificación de ácidos grasos, ya que su expresión se mantuvo o incluso disminuyó en comparación a la condición control.

El receptor nuclear *PPAR γ* es uno de los factores de transcripción necesarios para inducir el proceso de adipogénesis (Rosen, Walkey, Puigserver, & Spiegelman, 2000). En estudio previos, se ha observado que la exposición al arsénico disminuye la expresión de mRNA de *PPAR γ* (H. Cheng et al., 2011; Hou et al., 2013; Klei, Yesica Garciafigueroa, & Barchowsky, 2013; Wauson, Langan, & Vorce, 2002), por lo que esto pudiera explicar el menor acúmulo de grasa observada en este trabajo con el tratamiento de arsenito de sodio.

En el caso del tratamiento con palmitato de sodio, se ha descrito que en adipocitos diferenciados de fibroblastos 3T3-L1, el acúmulo de grasa incrementa tras un tratamiento de 200 μ M de ácido palmítico durante 24 h (Bolsoni-lopes et al., 2013), como sucede en el presente trabajo. Con relación a los datos obtenidos, a pesar de este ligero aumento en el acúmulo de grasa por efecto del palmitato de sodio, la expresión del mRNA de los genes involucrados en la adipogénesis y la lipogénesis, son similares a los del grupo control. Al respecto, se ha descrito que concentraciones mayores de palmitato de sodio (500 μ M) por 24 h durante la diferenciación celular, incrementan la expresión del mRNA de *PPAR γ* en adipocitos diferenciados de fibroblastos 3T3-L1 (Guo, Wong, Xie, Lei, & Luo, 2007). Sin embargo, por los tiempos de exposición establecidos en el diseño experimental del presente trabajo, dosis mayores a 400 μ M, resultaron citotóxicas para las células.

En el caso del tratamiento combinado de arsenito y palmitato de sodio, a pesar de la disminución en la expresión en la mayoría de los genes evaluados que están relacionados con la adipogénesis y lipogénesis en ambos esquemas de tratamiento,

el acúmulo de grasa permanece similar al del grupo control o con un ligero aumento, no observándose una disminución. Este efecto combinado del arsenito con el palmitato de sodio sobre el acúmulo de grasa sugiere una regulación compensatoria entre los mecanismos reprimidos por el arsenito y activados por el palmitato de sodio.

El efecto metabólico contrarregulador al proceso de lipogénesis en los adipocitos, es la lipólisis, los cuales deben de estar ampliamente coordinados y regulados para un adecuado funcionamiento celular (Luo & Liu, 2016). Previamente, GarciaFiguroa *et al.* (2013) habían mostrado que la liberación de glicerol al medio extracelular sin estímulo lipolítico, como marcador de la lipólisis basal en adipocitos *in vitro*, se incrementa por la presencia de arsenito de sodio (1 μ M de 24 a 72 h) (GarciaFiguroa *et al.*, 2013). En el presente trabajo, se observó el mismo fenómeno, y así igual con el palmitato de sodio, el cual, al igual que el arsenito, también incrementa la lipólisis basal en comparación a la condición control. Sin embargo, al conjuntar el tratamiento del arsenito con el del palmitato de sodio, el efecto fue sinérgico en ambos esquemas de exposición (diferenciación y maduración celular), exacerbando fuertemente el efecto del arsenito.

Al evaluar la lipólisis estimulada, mediante la activación del receptor β -adrenérgico con isoproterenol o la activación de la adenilato ciclasa con forskolina, se observó que la actividad lipolítica disminuye solamente en el caso de la exposición al arsenito de sodio en los adipocitos maduros. Sin embargo, la expresión del ARNm de la lipasa *HSL*, la cual participa con una de las funciones más relevante en este proceso metabólico de lipólisis (Bézaire, Mairal, Anesia, Lefort, & Langin, 2009; Frühbeck, Méndez-Giménez, Fernández-Formoso, Fernández, & Rodríguez, 2014) no fue afectada en esta condición en particular. Este hecho indica que el efecto inhibitorio del arsénico sobre la lipólisis estimulada no ocurre a nivel transcripcional de la HSL.

El hecho de que la abundancia de los ARNm de *ATGL* y de su co-activador *CGI-58*, tampoco fuera afectada por el tratamiento con arsenito de sodio, apoya la idea que la regulación podría ocurrir por modificaciones post-traduccionales. En particular, la lipasa HSL sufre varias fosforilaciones por la PKA, particularmente en los residuos Ser563, Ser659 y Ser660, generando su activación y translocación hacia la membrana

lipídica para dar lugar a la lipólisis estimulada (Frühbeck et al., 2014). sin embargo, no existen trabajos aún en la literatura que soporten la idea de que el arsenito reduzca el nivel de fosforilación de la lipasa HSL en dichos residuos. Sin embargo, uno de los mecanismos generales clásico del arsénico es sustituir los grupos fosfatos, disminuyendo la producción de ATP, hecho que afectaría directamente los procesos de fosforilación. En particular el arsenito, inhibe varias enzimas involucradas en el metabolismo de glucosa, como son la succinil Co-A sintasa, la piruvato deshidrogenasa y la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, contribuyendo a su disfunción (Kulshrestha, 2014).

Existen diversos mecanismos por los cuales la insulina ejerce su efecto anti-lipolítico, siendo el más estudiado la fosforilación de la fosfodiesterasa (PDE3B) por la cinasa AKT involucrada en la vía de señalización de la insulina. PDE3B en su estado fosforilado acelera la degradación del AMPc intracelular (DiPilato et al., 2015), (Ali, Mundi, Koutsari, Bernlohr, & Jensen, 2015), apagando así la señalización lipolítica iniciado en el receptor β -adrenérgico (Zhang, Hupfeld, Taylor, Olefsky, & Tsien, 2005).

En el trabajo, una vez estimulada la lipólisis, las células fueron incubadas posteriormente con insulina, con la finalidad de determinar la sensibilidad a sus efectos anti-lipolíticos. La exposición al arsenito de sodio únicamente desde el inicio de la diferenciación celular, tanto solo como combinado con palmitato, disminuye la respuesta antilipolítica de la insulina. Sin embargo, este fenómeno ocurre únicamente cuando la lipólisis se estimula a través de la activación del receptor β -adrenérgico mediante el Isoproterenol, más no cuando se estimula cascada abajo activando a la adenilato ciclasa con Forskolina.

Existe evidencia de la afinidad del arsénico por receptores membranales acoplados a proteínas G (Klei, 2012; Garciafigueroa et al., 2013), específicamente el receptor de endotelina-1A/B, mostrando un efecto inhibitorio sobre la diferenciación celular de adipocitos (Klei, 2012) y la lipólisis (Garciafigueroa et al., 2013). Con dicho antecedente y la evidencia experimental del trabajo, se puede sugerir que uno de los blancos con el que interactúa el arsenito de sodio es el receptor β -adrenérgico, el cual es también un receptor acoplado a proteínas G, no permitiendo que la insulina ejerza su efecto

inhibitorio sobre la vía lipolítica (degradación de AMPc). Esta hipótesis se puede explicar de acuerdo con los datos de estimulación de la vía de la lipólisis sobre la adenilato ciclasa, que se encuentra cascada abajo del receptor β -adrenérgico y es el blanco inmediato de la proteína Gs acoplada al receptor, situación en la que la insulina sí es capaz de ejercer su efecto inhibitorio. Incluso, con base en los datos obtenidos en este trabajo, se podría proponer que el arsenito de sodio sea un agonista no competitivo del receptor β -adrenérgico, ya que sí permite su estimulación por el isoproterenol pero mantiene la vía activa aún en presencia de insulina y aumenta la lipólisis basal.

Adicionalmente, se ha observado una asociación positiva entre dos polimorfismos en el gen de este receptor para endotelina B (EDNRB) y riesgo de obesidad, particularmente en individuos con elevados niveles plasmáticos de arsénico (Martínez-Barquero et al., 2015). Lo que sugiere, esta posible interacción con el receptor para endotelina y el arsénico.

Se ha descrito que *PPAR γ* es un regulador a nivel transcripcional de la expresión de FABP4, pudiendo ser la razón de la similitud en la expresión de éstos genes (Rodríguez-Calvo et al., 2017). Además en el caso de PLN se ha demostrado que la exposición al arsénico (100 $\mu\text{g/L}$) en el agua de bebida disminuye la expresión de PLN en adipocitos de ratones (Garciafigueroa et al., 2013), lo que puede participar también el estado lipolítico basal hiperactivo en este trabajo.

Por último, los resultados de lipólisis obtenidos en el estudio reflejan la disfuncionalidad lipolítica observada en los adipocitos de personas con obesidad, en donde la lipólisis basal se encuentra aumentada, pero la lipólisis estimulada está disminuida con respecto al metabolismo lipídico de adipocitos de personas delgadas (Langin et al., 2005).

CONCLUSIONES

El arsénico altera funciones del adipocito, en particular la relación entre la lipogénesis y la lipólisis, disminuyendo el acúmulo de grasa, reduciendo la lipólisis estimulada en adipocitos maduros, así como inhibiendo el efecto antilipolítico de la insulina en adipocitos expuestos desde su diferenciación celular.

El efecto del arsénico, depende del estadio de diferenciación celular en el que ocurra la exposición, particularmente en la lipólisis estimulada y sobre el efecto antilipolítico de la insulina.

El efecto del arsénico se modula por el ácido palmítico; el cual antagoniza el efecto inhibitorio del arsénico sobre el acúmulo de grasa en ambos esquemas de tratamiento o en la lipólisis estimulada en adipocitos maduros. Por el contrario, el ácido palmítico, además de aumentar la lipólisis basal, tiene un efecto sinérgico con el arsénico sobre ésta, tanto en adipocitos maduros como en adipocitos tratados desde el inicio de la diferenciación.

Las alteraciones observadas en la lipólisis no se deben a cambios a nivel transcripcional de los genes evaluados, involucrados en dicho proceso metabólico. Mientras que para la adipogénesis/lipogénesis, el efecto del arsénico en células expuestas desde el inicio de su diferenciación celular, sí depende de cambios en la expresión génica de PPAR γ , ACC, DGAT2 y PEPCK.

Se plantea evaluar posteriormente el grado de fosforilación en la lipasa HSL en residuos de serina de activación (563, y 660) como de inhibición (565) en la condición de lipólisis basal, lipólisis estimulada con isoproterenol y en la condición antilipolítica con insulina tras el estímulo lipolítico, todas al término de los tratamientos con arsénico y en combinación con palmítico.

Además, evaluar los efectos lipolíticos y antilipolíticos en presencia de bloqueadores o antagonistas del receptor β -adrenérgico con el fin de determinar si en efecto el arsenito de sodio actúa como un agonista no competitivo del receptor.

Mediante marcadores de activación de la vía de señalización de la insulina, asegurarse que la insulina estimule adecuadamente dicha vía en los adipocitos tratados con

arsenito de sodio y en combinación con el palmitato, estimulando la lipólisis con isoproterenol. Esto con la finalidad de descartar que el efecto observado de inhibición del efecto antilipolítico de la insulina en los adipocitos tratados con arsenito de sodio, no se deba a una alteración en la vía de la insulina.

Para saber con certeza si las diferencias observadas entre ambos esquemas de exposición estudiados se deben exclusivamente al tiempo de tratamiento (3 vs 11 días) y/o a la diferencia en el estadio celular, exponer durante 11 días a los adipocitos maduros y sólo por 3 días a los adipocitos en el momento de su diferenciación.

Finalmente, realizar los experimentos con otros ácidos grasos saturados de interés nutricional, como el ácido láurico, así como con ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados.

REFERENCIAS

- Abel, E. D., Peroni, O., Kim, J. K., Kim, Y. B., Boss, O., Hadro, E., ... Kahn, B. B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, *409*(6821), 729–33. <https://doi.org/10.1038/35055575>
- Adebayo, A. O., Zandbergen, F., Kozul-horvath, C. D., Philip, A., Hamilton, J. W., Biological, M., ... Hospital, R. I. (2016). HHS Public Access, *29*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/jbt.21600.Chronic>
- Ahangarpour, A., & Alboghobeish, S. (2017). Effects of Combined Exposure to Chronic High-Fat Diet and Arsenic on Thyroid Function and Lipid Profile in Male Mouse. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1068-1>
- Ahangarpour, A., Zeidooni, L., Samimi, A., Alboghobeish, S., Khorsandi, L. S., & Moradi, M. (2018). Chronic exposure to arsenic and high fat diet additively induced cardiotoxicity in male mice. *Research in Pharmaceutical Sciences*, *13*(1), 47–56. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.220967>
- Ali, A. H., Mundi, M., Koutsari, C., Bernlohr, D. A., & Jensen, M. D. (2015). Adipose Tissue Free Fatty Acid Storage In Vivo : Effects of Insulin Versus Niacin as a Control for Suppression of Lipolysis, *64*(September 2014), 2828–2835. <https://doi.org/10.2337/db14-1409>
- Baillie-Hamilton, P. F. (2002). Chemical Toxins: A Hypothesis to Explain the Global Obesity Epidemic. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, *8*(2), 185–192. <https://doi.org/10.1089/107555302317371479>
- Baudrand, R., Arteaga, E., & Moreno, M. (2010). El tejido graso como modulador endocrino: Cambios hormonales asociados a la obesidad. *Revista Medica de Chile*, *138*(10), 1294–1301. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872010001100015>
- Belahsen, R. (2014). Nutrition transition and food sustainability. *Proceedings of the Nutrition Society*, *73*(3), 385–388. <https://doi.org/10.1017/S0029665114000135>

- Bézaire, V., Mairal, A., Anesia, R., Lefort, C., & Langin, D. (2009). Chronic TNF α and cAMP pre-treatment of human adipocytes alter HSL, ATGL and perilipin to regulate basal and stimulated lipolysis. *FEBS Letters*, 583(18), 3045–3049. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.08.019>
- Birsoy, K., Festuccia, W. T., & Laplante, M. (2013). A comparative perspective on lipid storage in animals. *Journal of Cell Science*, 126(7), 1541–1552. <https://doi.org/10.1242/jcs.104992>
- Bolsoni-lobes, A., Festuccia, W. T., Farias, T. S. M., Chimin, P., Torres-leal, F. L., Derogis, P. B. M., ... Alonso-vale, M. I. C. (2013). Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocyte lipolysis and lipase content in a *PPAR* α -dependent manner, (3), 1093–1102. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00082.2013>
- Brasaemle, D. L., Levin, D. M., Adler-Wailes, D. C., & Londos, C. (2000). The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1483(2), 251–262. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00179-1](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00179-1)
- Bray, G. A. (1999). Etiology and pathogenesis of obesity. *Clinical Cornerstone*, 2(3), 1–15.
- Bundschuh, J., Litter, M. I., Parvez, F., Román-Ross, G., Nicolli, H. B., Jean, J. S., ... Toujaguez, R. (2012). One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. *Science of the Total Environment*, 429, 2–35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.024>
- Ceja-Galicia, Z. A., Daniel, A., Salazar, A. M., Pánico, P., Ostrosky-Wegman, P., & Díaz-Villaseñor, A. (2017). Effects of arsenic on adipocyte metabolism: Is arsenic an obesogen? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 452, 25–32. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.05.008>
- Chakrabarti, P., English, T., Shi, J., Smas, C. M., & Kandror, K. V. (2010). Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Suppresses, 59(April), 775–781. <https://doi.org/10.2337/db09-1602>.

- Chakrabarti, P., Kim, J. Y., Singh, M., Shin, Y.-K., Kim, J., Kumbrink, J., ... Kandror, K. V. (2013). Insulin inhibits lipolysis in adipocytes via the evolutionarily conserved mTORC1-Egr1-ATGL-mediated pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 33(18), 3659–66. <https://doi.org/10.1128/MCB.01584-12>
- Chen, L., Wang, T., Chen, G., Wang, N., Gui, L., Dai, F., ... Lu, Y. (2017). Influence of resveratrol on endoplasmic reticulum stress and expression of adipokines in adipose tissues/adipocytes induced by high-calorie diet or palmitic acid. *Endocrine*, 55(3), 773–785. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-1212-2>
- Cheng, H., Qiu, L., Zhang, H., Cheng, M., Li, W., Zhao, X., ... Ma, J. (2011). Arsenic trioxide promotes senescence and regulates the balance of adipogenic and osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(3), 204–209. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq130>
- Cheng, L., Yu, Y., Szabo, A., Wu, Y., Wang, H., Camer, D., & Huang, X.-F. (2015). Palmitic acid induces central leptin resistance and impairs hepatic glucose and lipid metabolism in male mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(5), 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.12.011>
- Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 7(APR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>
- Choi, S. M., Tucker, D. F., Gross, D. N., Easton, R. M., DiPilato, L. M., Dean, A. S., ... Birnbaum, M. J. (2010). Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 30(21), 5009–20. <https://doi.org/10.1128/MCB.00797-10>
- Clifford, G. M., Londos, C., Kraemer, F. B., Vernon, R. G., & Yeaman, S. J. (2000). Translocation of Hormone-sensitive Lipase and Perilipin upon Lipolytic Stimulation of Rat Adipocytes Translocation of Hormone-sensitive Lipase and Perilipin upon Lipolytic Stimulation of Rat Adipocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 5011–5015. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.5011>
- Cohen, P., & Spiegelman, B. M. (2015). Brown and beige fat: Molecular parts of a

thermogenic machine. *Diabetes*, 64(7), 2346–2351. <https://doi.org/10.2337/db15-0318>

Collins, J. M., Neville, M. J., Pinnick, K. E., Hodson, L., Ruyter, B., Dijk, T. H. Van, ... Frayn, K. N. (2011). De novo lipogenesis in the differentiating human adipocyte can provide all fatty acids necessary for maturation, 52, 1683–1692. <https://doi.org/10.1194/jlr.M012195>

Coronado-González, J. A., Del Razo, L. M., García-Vargas, G., Sanmiguel-Salazar, F., & Escobedo-de la Peña, J. (2007). Inorganic arsenic exposure and type 2 diabetes mellitus in Mexico. *Environmental Research*, 104(3), 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.03.004>

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., ... Gore, A. C. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>

Díaz-Villaseñor, A., Cruz, L., Cebrián, A., Hernández-Ramírez, R. U., Hiriart, M., García-Vargas, G., ... Ostrosky-Wegman, P. (2013). Arsenic Exposure and Calpain-10 Polymorphisms Impair the Function of Pancreatic Beta-Cells in Humans: A Pilot Study of Risk Factors for T2DM. *PLoS ONE*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051642>

Díaz-Villaseñor, A., Sánchez-Soto, M. C., Cebrián, M. E., Ostrosky-Wegman, P., & Hiriart, M. (2006). Sodium arsenite impairs insulin secretion and transcription in pancreatic β -cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 214(1), 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.11.015>

DiPilato, L. M., Ahmad, F., Harms, M., Seale, P., Manganiello, V., & Birnbaum, M. J. (2015). The role of PDE3B phosphorylation in the inhibition of lipolysis by insulin. *Molecular and Cellular Biology*, 35(16). <https://doi.org/10.1128/MCB.00422-15>

Duncan, R. E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., & Sul, H. S. (2007). Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annual Review of Nutrition*, 27, 79–101. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093734>

- Effects, H., Assessment, R., Abernathy, C. O., Thomas, D. J., Calderon, R. L., Science, O., & Agency, U. S. E. P. (2003). Toxicity and Risk Assessment of Trace Elements, (10), 1536–1538.
- Frayn, K. (2002). Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia*, 45(9), 1201–1210. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-0873-y>
- Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J.-A., Fernández, S., & Rodríguez, A. (2014). *Regulation of adipocyte lipolysis. Nutrition Research Reviews* (Vol. 27). <https://doi.org/10.1017/S095442241400002X>
- 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>
- Gan, L., Liu, Z., Cao, W., Zhang, Z., & Sun, C. (2015). *FABP4* reversed the regulation of leptin on mitochondrial fatty acid oxidation in mice adipocytes. *Nature Publishing Group*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep13588>
- Garciafigueroa, D. Y., Klei, L. R., Ambrosio, F., & Barchowsky, A. (2013). Arsenic-stimulated lipolysis and adipose remodeling is mediated by G-protein-coupled receptors. *Toxicological Sciences*, 134(2), 335–344. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft108>
- Goering, P.L., et al., The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. *Toxicol Sci*, 1999. 49(1): p. 5-14.
- Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., ... Zoeller, R. T. (2015). Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*, 36(6), 593–602. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1093>
- Grün, F., & Blumberg, B. (2006). Environmental obesogens: Organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology*, 147(6), 50–55. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1129>
- Granneman, J. G., Moore, H. P. H., Granneman, R. L., Greenberg, A. S., Obin, M. S.,

- & Zhu, Z. (2007). Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5726–5735.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M610580200>
- Guo, W., Wong, S., Xie, W., Lei, T., & Luo, Z. (2007). Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 293, E576–E586.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00523.2006>
- Hashimoto, T., Segawa, H., Okuno, M., Kano, H., & Hamaguchi, H. (2010). Active involvement of micro-lipid droplets and lipid- droplet-associated proteins in hormone-stimulated lipolysis in adipocytes. <https://doi.org/10.1242/jcs.113084>
- Hemmati, A. A., Alboghobeish, S., & Ahangarpour, A. (2018). Chronic exposure to high fat diet exacerbates arsenic-induced lung damages in male mice: Possible role for oxidative stress, 88, 61–66. <https://doi.org/10.4081/monaldi.2018.903>
- Hennig, B., Ormsbee, L., McClain, C. J., Watkins, B. A., Blumberg, B., Bachas, L. G., ... Suk, W. A. (2012). Nutrition can modulate the toxicity of environmental pollutants: Implications in risk assessment and human health. *Environmental Health Perspectives*, 120(6), 771–774. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104712>
- Holtcamp, W. (2012). Obesogens: An Environmental Link to Obesity. *Environmental Health Perspectives*, 120(2). <https://doi.org/10.1289/ehp.120-a62>
- Hou, Y., Xue, P., Woods, C. G., Wang, X., Fu, J., Yarborough, K., ... Pi, J. (2013). Association between arsenic suppression of adipogenesis and induction of CHOP10 via the endoplasmic reticulum stress response. *Environmental Health Perspectives*, 121(2), 237–243. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205731>
- Janesick, A., & Blumberg, B. (2012). Minireview : PPAR γ as the Target of Obesogens, 127, 4–8. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.01.005>.Minireview
- Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Duncan, R. E., Ahmadian, M., & Sul, H. S. (2007). Regulation of Triglyceride Metabolism. * IV. Hormonal regulation of lipolysis in

- adipose tissue. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293(1), G1–G4.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00554.2006>
- Kien, C. L., Bunn, J. Y., & Ugrasbul, F. (2005). Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82(2), 320–326. <https://doi.org/82/2/320> [pii]
- Kile, M. L., & Christiani, D. C. (2008, August). Environmental arsenic exposure and diabetes. *JAMA*. United States. <https://doi.org/10.1001/jama.300.7.845>
- Klei, L. R., Yesica Garciafigueroa, D., & Barchowsky, A. (2013). Arsenic activates endothelin-1 Gi protein-coupled receptor signaling to inhibit stem cell differentiation in adipogenesis. *Toxicological Sciences*, 131(2), 512–520.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs323>
- Kletzien, R., Clarke, D., & Ulrich, G. (1991). Enhancement of Adipocyte Sensitizing Agent. *MOLECULAR PHARMACOLOGY*, 41, 393–398.
- Kulshrestha, A. (2014). Arsenic-induced abnormalities in glucose metabolism: Biochemical basis and potential therapeutic and nutritional interventions. *World Journal of Translational Medicine*, 3(2), 96. <https://doi.org/10.5528/wjtm.v3.i2.96>
- Kuo, C.-C., Moon, K., Thayer, K. A., & Navas-Acien, A. (2013). Environmental Chemicals and Type 2 Diabetes: An Updated Systematic Review of the Epidemiologic Evidence. *Current Diabetes Reports*, 13(6), 831–849.
<https://doi.org/10.1007/s11892-013-0432-6>
- Langin, D., Dicker, A., Tavernier, G., Hoffstedt, J., Mairal, A., Rydén, M., ... Arner, P. (2005). Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes*, 54(11), 3190–3197. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.11.3190>
- Larson, D. E., Hunter, G. R., Williams, M. J., Kekes-Szabo, T., Nyikos, I., & Goran, M. I. (1996). Dietary fat in relation to body fat and intraabdominal adipose tissue: a cross-sectional analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 64(5), 677–684.
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger,

- M., ... Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by *CGI-58* and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metabolism*, 3(5), 309–319.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.03.005>
- Lee, B.-K., & Kim, Y. (2013). Blood cadmium, mercury, and lead and metabolic syndrome in South Korea: 2005-2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *American Journal of Industrial Medicine*, 56, 682–92.
<https://doi.org/10.1002/ajim.22107>.
- Lowe, C. E., O’Rahilly, S., & Rochford, J. J. (2011). Adipogenesis at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 16), 2681–6. <https://doi.org/10.1242/jcs.079699>
- Luo, L., & Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *Journal of Endocrinology*, 231(3), R77–R99. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0211>
- Makki, K., Froguel, P., & Wolowczuk, I. (2013). Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflammation*, 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/139239>
- Martínez-Barquero, V., De Marco, G., Martínez-Hervas, S., Rentero, P., Galan-Chilet, I., Blesa, S., ... Chaves, F. J. (2015). Polymorphisms in endothelin system genes, arsenic levels and obesity risk. *PLoS ONE*, 10(3), 1–13.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118471>
- Maul, E. A., Ahsan, H., Edwards, J., Longnecker, M. P., Navas-Acien, A., Pi, J., ... Loomis, D. (2012). Evaluation of the association between arsenic and diabetes: A National Toxicology Program workshop review. *Environmental Health Perspectives*, 120(12), 1658–1670. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104579>
- Mina, J., & Campbell, R. (2014). Obesity in Mexico – The Impact on Health Insurance. *Life*, 18(4), 1–6. Retrieved from file:///F:/Walden/Courses/Term 13. Epidemiology Topics Seminar (PUBH - 8540 - 1)/Week 9/Literature/Assignment/Obesity in Mexico.pdf
- Murphy, K. G., & Bloom, S. R. (2006). Gut hormones and the regulation of energy

- homeostasis. *Nature*, *444*(7121), 854–859. <https://doi.org/10.1038/nature05484>
- Newgard, C. B., An, J., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Lien, L. F., ... Laura, P. (2013). NIH Public Access, *9*(4), 311–326.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.002.A>
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., & Graetz, N. (2014). Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis. *Lancet*, *384*(9945), 766–781.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8.Global](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8.Global)
- Nielsen, T. S., Jessen, N., Jorgensen, J. O. L., Moller, N., & Lund, S. (2014). Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *Journal of Molecular Endocrinology*, *52*(3), R199-222.
<https://doi.org/10.1530/JME-13-0277>
- Nielsen, T. S., Jessen, N., Jørgensen, J. O. L., Møller, N., & Lund, S. (2014). Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic disease. *Journal of Molecular Endocrinology*, *52*(3).
<https://doi.org/10.1530/JME-13-0277>
- Oberer, M., Boeszoermenyi, A., Nagy, H. M., & Zechner, R. (2011). Recent insights into the structure and function of comparative gene identification-58. *Current Opinion in Lipidology*, *22*(3), 149–158.
<https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328346230e>
- Olivares-García, V., Torre-Villalvazo, I., Velázquez-Villegas, L., Alemán, G., Lara, N., López-Romero, P., ... Díaz-Villaseñor, A. (2015). Fasting and postprandial regulation of the intracellular localization of adiponectin and of adipokines secretion by dietary fat in rats. *Nutrition and Diabetes*, *5*(11).
<https://doi.org/10.1038/nutd.2015.34>
- Palloni, A., Beltrán-Sánchez, H., Novak, B., Pinto, G., & Wong, R. (2015). Adult obesity, disease and longevity in Mexico. *Salud Publica de Mexico*, *57*(0 1), S22–S30.

- Paul, D. S., Hernandez-Zavala, A., Walton, F. A., Adair, B. M., D Dina, J., Matousek, T., & Styblo, M. (2007). Examination of the Effects of Arsenic on Glucose Homeostasis in Cell Culture and Animal Studies: Development of a Mouse Model for Arsenic-Induced Diabetes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222(3), 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.01.010>.Examination
- Paul, D. S., Walton, F. S., Saunders, R. J., & Stýblo, M. (2011). Characterization of the impaired glucose homeostasis produced in C57BL/6 mice by chronic exposure to arsenic and high-fat diet. *Environmental Health Perspectives*, 119(8), 1104–1109. <https://doi.org/10.1289/ehp.1003324>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e–45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6), 509–15. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>
- Quansah, R., Armah, F. A., Essumang, D. K., Luginaah, I., Clarke, E., Marfoh, K., ... Dzodzomenyo, M. (2015). Association of Arsenic with Adverse Pregnancy Outcomes / Infant Mortality : Enviromental Health Perspectives, 123(5), 412–422. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307894>
- Ramirez, A. (2013). Exposición ocupacional y ambiental al arsénico - Actualización bibliográfica para investigación científica. *Anales de La Facultad de Medicina*, 74(3), 237–247.
- Rodríguez-Calvo, R., Girona, J., Alegret, J. M., Bosquet, A., Ibarretxe, D., & Masana, L. (2017). Role of the fatty acid-binding protein 4 in heart failure and cardiovascular disease. *Journal of Endocrinology*, 233(3), R173–R184. <https://doi.org/10.1530/joe-17-0031>
- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2000).

Transcriptional regulation of adipogenesis Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Development*, 14(Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., Spiegelman, B. M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Development*, 14, 1293–1307. <http://doi.org/10.1101/gad.14.11.1293>, 1293–1307. <https://doi.org/10.1101/gad.14.11.1293>

Rossmann, T. G. (2003). Mechanism of arsenic carcinogenesis: An integrated approach. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1–2), 37–65. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.009>

Sambanthamurthi, R., Sundram, K., & Tan, Y. (2000). Chemistry and biochemistry of palm oil. *Progress in Lipid Research*, 39, 507–558. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7827\(00\)00015-1](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7827(00)00015-1)

Saponaro, C., Gaggini, M., Carli, F., & Gastaldelli, A. (2015). The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: A critical point in metabolic homeostasis. *Nutrients*, 7(11), 9453–9474. <https://doi.org/10.3390/nu7115475>

Scaglia, H., Chichizola, C., Franconi, M. C., Ludueña, B., Mastandrea, C., & Scaglia, J. (2009). Disruptores endocrinos. Composición química, mecanismo de acción y efecto sobre el eje reproductivo. *Reproducción*, 24, 74–86.

Schweiger, M., Eichmann, T. O., Taschler, U., & Zimmermann, R. (2014). Europe PMC Funders Group Measurement of Lipolysis, 171–193. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800280-3.00010-4>.Measurement

Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., ... Zimmermann, R. (2006). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 40236–40241. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608048200>

She, M., Hou, H., Wang, Z., Zhang, C., Laudon, M., & Yin, W. (2014). Melatonin rescues 3T3-L1 adipocytes from FFA-induced insulin resistance by inhibiting phosphorylation of IRS-1 on Ser307. *Biochimie*, 103(1), 126–130.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.05.001>

States, J. C., Barchowsky, A., Cartwright, I. L., Reichard, J. F., & Futscher, B. W. (2011). Review Arsenic Toxicology : Translating between Experimental Models and Human Pathology, (10), 1356–1363.

Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & van Haefen, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet (London, England)*, 365(9467), 1333–1346. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61032-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61032-X)

Sun, Z., & Lazar, M. A. (2013). Dissociating fatty liver and diabetes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(1), 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.09.005>

Suzuki, R., Tobe, K., Aoyama, M., Sakamoto, K., Ohsugi, M., Kamei, N., ... Kadowaki, T. (2005). Expression of *DGAT2* in white adipose tissue is regulated by central leptin action. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3331–3337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410955200>

Symonds, M. E. (2012). Adipose tissue biology. *Adipose Tissue Biology*, 1–413. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0965-6>

Systems, F., & Nutrition, F. O. R. B. (2013). the State of Food and Agriculture. [https://doi.org/ISBN: 978-92-5-107671-2](https://doi.org/ISBN:978-92-5-107671-2) |

Thayer, K. A., Heindel, J. J., Bucher, J. R., & Gallo, M. A. (2012). Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: A national toxicology program workshop review. *Environmental Health Perspectives*, 120(6), 779–789. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104597>

Tontonoz, P., Hu, E., Devine, J., Beale, E. G., & Spiegelman, B. M. (1995). *PPAR* α 2 Regulates Adipose Expression of the Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene, 15(1), 351–357.

Tovar, A. R., Díaz-Villaseñor, A., Cruz-Salazar, N., Ordáz, G., Granados, O., Palacios-González, B., ... Torres, N. (2011). Dietary Type and Amount of Fat Modulate Lipid Metabolism Gene Expression in Liver and in Adipose Tissue in

High-fat Diet-fed Rats. *Archives of Medical Research*, 42(6), 540–553.

<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2011.10.004>

Tseng, C. H., Tai, T. Y., Chong, C. K., Tseng, C. P., Lai, M. S., Lin, B. J., ... Chen, C. J. (2000). Long-term arsenic exposure and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: A cohort study in arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan.

Environmental Health Perspectives, 108(9), 847–851.

<https://doi.org/10.2307/3434992>

Velázquez-Villegas, L. A., Tovar-Palacio, C., Palacios-González, B., Torres, N., Tovar, A. R., & Díaz-Villaseñor, A. (2017). Recycling of glucagon receptor to plasma membrane increases in adipocytes of obese rats by soy protein; implications for glucagon resistance. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(10), 1–9. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700116>

Wältermann, M., Steinbüchel, A., Wa, M., & Steinbu, A. (2005). Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes : Recent Insights into Structure , Formation , and Relationship to Eukaryotic Lipid Depots MINIREVIEW Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes : Recent Insights into Structure , Formation , and Relationship to Eukaryotic Lip. *Journal of Bacteriology*, 187(11), 3607–3619.

<https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3607>

Wauson, E. M., Langan, A. S., & Vorce, R. L. (2002). Sodium arsenite inhibits and reverses expression of adipogenic and fat cell-specific genes during in vitro adipogenesis. *Toxicological Sciences*, 65(2), 211–219.

<https://doi.org/10.1093/toxsci/65.2.211>

World Health Organization. (2018). Obesity and overweight. Retrieved May 20, 2019, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

You, C. H., Kim, B. G., Kim, J. M., Yu, S. Do, Kim, Y. M., Kim, R. B., & Hong, Y. S. (2011). Relationship between blood mercury concentration and waist-to-hip ratio in elderly Korean individuals living in coastal areas. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 44(5), 218–225.

<https://doi.org/10.3961/jpmph.2011.44.5.218>

- Young, S. G., & Zechner, R. (2013). Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes and Development*, 27(5), 459–484. <https://doi.org/10.1101/gad.209296.112>
- Zang, Y., Wang, T., Xie, W., Wang-Fischer, Y.-L., Getty, L., Han, J., ... Guo, W. (2005). Regulation of Acetyl CoA Carboxylase and Carnitine Palmitoyl Transferase-1 in Rat Adipocytes[ast][ast]. *Obesity*, 13(9), 1530–1539. <https://doi.org/10.1038/oby.2005.188>
- Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., Kohlwein, S. D., Haemmerle, G., Lass, A., & Madeo, F. (2012). FAT SIGNALS - Lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metabolism*, 15(3), 279–291. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.018>
- Zhang, J., Hupfeld, C. J., Taylor, S. S., Olefsky, J. M., & Tsien, R. Y. (2005). Insulin disrupts β -adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes, 437(September), 569–573. <https://doi.org/10.1038/nature04140>