



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
SALUD ANIMAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**ALTERACIÓN EN LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LEPTINA Y ADIPONECTINA EN
EL ADIPOCITO POR ARSÉNICO Y ÁCIDO PALMÍTICO**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR..EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y SALUD ANIMAL**

PRESENTA:

MVZ. ZELTZIN ALEJANDRA CEJA GALICIA

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR IIB.

COMITÉ TUTOR:

Dra. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE IIB.

Dr. ISRAEL PÉREZ TORRES INC.

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

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.

DEDICATORIAS

A mis padres por todo el amor y apoyo que me han dado a lo largo de mi vida y por el impulso que me dan para superarme personal y profesionalmente.

A mis hermanos, esperando que esto les sea un ejemplo que seguir de superación y amor a lo que uno hace.

A mis amigos y compañeros que me acompañaron durante este difícil trayecto, porque todos ellos fueron el soporte que me ayudó a seguir siempre hacia adelante y no rendirme nunca.

A mi, para recordarme que debo perseverar para cumplir mis sueños y que a pesar de los altibajos que nos da la vida, se que siempre existe una manera de levantarte si te caes.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores por la asesoría y apoyo durante el desarrollo del proyecto

A las Técnico de laboratorio Luz María Chiu Velázquez y Lourdes Monserrat Sordo Cedeño por su apoyo en el laboratorio con el manejo de reactivos y uso de los equipos durante el proceso experimental.

Al Posgrado en Ciencias de la Producción y Salud Animal por la preparación y conocimiento otorgado.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el apoyo económico en el proyecto IA203316.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para lograr el desarrollo de este proyecto.



ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Tejido adiposo	3
3.1.1. Adipocinas	3
3.1.1.1. Leptina	3
3.1.1.2. Adiponectina	4
3.2. Generalidades del sobrepeso y la obesidad	5
3.2.1. Epidemiología.....	5
3.2.2. Etiología	6
3.2.2.1. Alimentación	6
3.2.2.2. Contaminantes ambientales.....	7
3.3. La grasa en la dieta.....	7
3.3.1. Cambio en la alimentación en México	7
3.3.2. Ácido palmítico y su contenido en los alimentos.....	8
3.3.3. Efecto de dietas altas en grasas y del ácido palmítico sobre leptina y adiponectina	8
3.4. El arsénico	9
3.4.1. Contaminación por arsénico	10
3.4.2. El arsénico como diabetógeno	11
3.4.3. Efectos del arsénico sobre la leptina y la adiponectina	11
3.5. Efecto del arsénico en combinación de dietas altas en grasa	12
4. JUSTIFICACIÓN.....	13
5. OBJETIVO GENERAL	14
6. OBJETIVOS PARTICULARES	14
7. HIPÓTESIS	14
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
8.1. Modelo y diseño experimental	15
8.2. Tratamiento de arsenito de sodio y palmitato de sodio.....	15
8.3. Sobrevida celular	16
8.4. Secreción de leptina y adiponectina	17
8.5. Expresión génica de leptina y adiponectina	17
8.6. Abundancia intracelular de leptina y adiponectina	19



8.7.	Multímeros de adiponectina secretados	20
8.8.	Análisis estadístico	21
9.	RESULTADOS	22
9.1.	Sobrevida celular	22
9.1.	Leptina	24
9.1.1.	Secreción de leptina	24
9.1.2.	Expresión génica de leptina	25
9.1.3.	Abundancia proteica de leptina intracelular	25
9.2.	Adiponectina	27
9.2.1.	Secreción de adiponectina	27
9.2.2.	Expresión génica de adiponectina	27
9.2.3.	Abundancia proteica de adiponectina intracelular	28
9.2.4.	Multímeros de adiponectina secretados	29
10.	DISCUSIÓN.....	32
11.	CONCLUSIONES.....	40
12.	PERSPECTIVAS.....	41
13.	REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de tratamiento y protocolo de cultivo celular.....	16
Figura 2.	Sobrevida celular.....	23
Figura 3.	Leptina secretada al medio en 24 h.....	24
Figura 4.	Abundancia relativa de ARNm de leptina	25
Figura 5.	Abundancia de leptina intracelular.....	26
Figura 6.	Adiponectina secretada al medio en 24 h.....	27
Figura 7.	Abundancia relativa de ARNm de adiponectina.....	28
Figura 8.	Abundancia de adiponectina intracelular.....	29
Figura 9.	Abundancia de multimeros de adiponectina secretados.....	31
Figura 10.	Resumen de resultados obtenidos (A) y probables mecanismo de acción del As y el Pa (B) sobre la síntesis y secreción de leptina y adiponectina en adipocitos.....	39



1. RESUMEN

En la obesidad ocurre una alteración en la producción de leptina y adiponectina por el tejido adiposo. Dietas altas en ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico, son factores de riesgo para el desarrollo de obesidad. En el ambiente existen contaminantes que son disruptores del metabolismo. El arsénico en particular es considerado un diabetógeno, sin embargo, se desconoce su efecto sobre la disfuncionalidad endocrina del tejido adiposo.

El objetivo del estudio fue conocer los efectos del arsenito y su combinación con palmitato sobre la síntesis y secreción de leptina y adiponectina.

En adipocitos 3T3-L1 maduros y en proceso de diferenciación, expuestos a $1\mu\text{M}$ de arsenito de sodio y coexpuestos a $200\mu\text{M}$ de palmitato de sodio, se evaluó la abundancia del ARNm de leptina y adiponectina, la proteína intracelular, la secretada, así como los multímeros de adiponectina secretados.

Los resultados muestran que el arsenito disminuyó ($p<0.05$) la concentración de leptina y adiponectina secretada en ambos modelos celulares y exacerbó ($p<0.05$) el efecto del palmitato sobre la disminución en las adipocinas secretadas, a excepción de leptina en los adipocitos en proceso de diferenciación. Adicionalmente, hubo una disminución en la síntesis de las adipocinas evidenciado por disminución ($p<0.05$) en la abundancia de ARNm y/o proteína intracelular, a excepción de la adiponectina por el palmitato. El arsenito disminuyó ($p<0.05$) la secreción de los 3 multímeros de adiponectina (HMW, MMW y LMW) únicamente en el modelo de diferenciación y exacerbó el efecto del palmitato, reduciendo particularmente la secreción de los multímeros HMW y LMW.

En conclusión, el arsenito disminuyó la síntesis y secreción de leptina y adiponectina en adipocitos *in vitro* y en algunos casos el efecto se exacerbó en presencia de palmitato. La magnitud del efecto de los tratamientos fue dependiente del estadio de diferenciación celular en el que ocurrió la exposición.

Palabras clave: Adipocitos 3T3-L1, preadipocitos 3T3-L1, obesidad, adiponectina, leptina, arsenito, palmitato



2. ABSTRACT

In obesity occurs an alteration in the production of leptin and adiponectin by the adipose tissue. High saturated fatty acids diets, such as palmitic acid, are risk factors for the development of obesity. There are environmental pollutants that are disruptors of metabolism. In particular, arsenic is a diabetogen, however its effect on the endocrine dysfunction of adipose tissue is unknown.

The objective of this study was to determine the effects of arsenite and in combination with palmitate on the synthesis and secretion of leptin and adiponectin.

In mature and maturing 3T3-L1 adipocytes, exposed to 1 μ M sodium arsenite and coexposed to 200 μ M sodium palmitate, leptin and adiponectin mRNA, the intracellular and secreted protein, as well as the secreted adiponectin multimers abundance were evaluated.

Results show that arsenite decreased ($p < 0.05$) the concentration of the secreted leptin and adiponectin in both cell models and exacerbated ($p < 0.05$) the effect of palmitate on the decrease of the secreted adipokines, with the exception of leptin in adipocytes undergoing differentiation. Additionally, a decrease in the adipokines synthesis occurs, evidenced by decrease ($p < 0.05$) in the abundance of mRNA and /or intracellular protein, with the exception of adiponectin by palmitate. Arsenite decreased ($p < 0.05$) the secretion of the 3 adiponectin multimers (HMW, MMW and LMW) only in maturing adipocytes and exacerbated the palmitate effect, particularly reducing the HMW and LMW multimers secretion.

In conclusion, arsenite decreased the synthesis and secretion of leptin and adiponectin in adipocytes *in vitro* and in some cases the effect was exacerbated in presence of palmitate. The magnitude of the effect of the treatments was dependent on the cellular differentiation state in which the exposure occurred, in mature adipocytes or in the differentiation process.

Key words: 3T3-L1 adipocytes, 3T3-L1 preadipocytes, obesity, adiponectin, leptin, arsenite, palmitate



3. INTRODUCCIÓN

3.1. Tejido adiposo

El tejido adiposo es un órgano ampliamente distribuido en el organismo. Se compone de adipocitos, fibroblastos, pre-adipocitos, macrófagos y células del estroma vascular y cumple diversas funciones metabólicas dependiendo del tipo de adipocitos que se traten. Existen 3 tipos de tejido adiposo: 1) El tejido adiposo blanco (TAB), es el de mayor proporción, se localiza de forma subcutánea o visceral, se encarga de la homeostasis energética, sintetizando y liberando ácidos grasos en los procesos lipogénesis y lipólisis, respectivamente, así como de la liberación de diferentes hormonas y citocinas, denominadas adipocinas (Park, 2014), 2) el tejido adiposo pardo, el de menor proporción, es principalmente termogénico por lo que es específico de mamíferos (Dani & Billon, 2012; Esteve Ràfols, 2014) y 3) el tejido adiposo beige, el cual es tejido adiposo blanco con adipocitos pardos y se ha visto que se induce en respuesta al frío y al ejercicio (Lee, Mottillo, & Granneman, 2014).

3.1.1. Adipocinas

Tras el descubrimiento de la leptina en 1994, se reconoció al tejido adiposo blanco como un órgano endocrino capaz de participar en diversos procesos metabólicos por medio de la secreción de hormonas y citocinas, entre las que destacan la leptina, adiponectina, resistina, apelina, visfatina, entre otras hormonas, así como de interleucinas, el factor de necrosis tumoral alfa y prostaglandinas (Fonseca-Alaniz, Takada, Alonso-Vale, & Lima, 2007). La mayoría de las adipocinas se encargan de la regulación de la homeostasis energética, actuando sobre el metabolismo de lípidos, de hidratos de carbono y la sensibilidad a la insulina, principalmente. Las primeras adipocinas en ser caracterizadas fueron la leptina y la adiponectina, las cuales han sido ampliamente estudiadas sobre sus efectos fisiológicos y durante los procesos patológicos como el sobrepeso y obesidad (Antuna-Puente, Fève, Fellahi, & Bastard, 2008; Ronti, Lupattelli, & Mannarino, 2006).

3.1.1.1. Leptina

Del latín *leptos* que significa delgado, fue la primera adipocina en ser descubierta, la descripción de su gen (*ob*) se realizó en 1950 y la proteína como tal fue descrita en 1994. La leptina es un polipéptido de 16 kDa que se expresa y se secreta al torrente sanguíneo por las células del estómago, la placenta, el músculo y principalmente por los adipocitos. Está



relacionada directamente con la cantidad de tejido adiposo del organismo, es decir, mientras más tejido adiposo tenga el organismo, mayor es la secreción de leptina (Waki & Tontonoz, 2007).

La principal función de la leptina es regular el balance energético; actúa sobre las células de proopiomelanocortina en el núcleo arqueado del hipotálamo a través de la interacción con su receptor para generar el estímulo de saciedad y así disminuir la ingesta calórica, junto con otros factores neurotróficos (Xu & Xie, 2016). Por otro lado, se ha descrito la participación de la leptina en la regulación indirecta de la glucemia, actuando sobre las células β -pancreáticas para promover la secreción de insulina (Harris, 2000). Se sabe que las concentraciones de leptina sérica presentan un ritmo circadiano que fluctúa dependiendo de la especie, aumentando cuando hay mayor actividad. Estas fluctuaciones son menores comparadas con el estímulo metabólico ya que pueden aumentar significativamente durante el postprandio como respuesta a la hiperglucemia o disminuir con el ayuno (Caron, Lee, Elmquist, & Gautron, 2018). Durante el proceso de obesidad, las concentraciones de leptina son muy elevadas debido a la cantidad de tejido adiposo, y sin embargo, el estímulo de saciedad se pierde debido a que se genera una resistencia a esta hormona a nivel de hipotálamo (Martin, Qasim, & Reilly, 2008). Uno de los tantos factores en la obesidad que ocasionan esta resistencia es la reducción de la concentración de la hormona de crecimiento, que evita la producción de receptores hipotalámicos de leptina y por consiguiente la resistencia a la misma (Harris, 2000).

3.1.1.2. Adiponectina

La adiponectina, fue identificada en 1995 en el medio de cultivo de adipocitos 3T3-L1 y fue denominada en un principio como adipocyte complement-related protein (Acrap30). Es una proteína de 244 aminoácidos cuyo monómero pesa 30 kDa. Es sintetizada únicamente por los adipocitos y su secreción es abundante, encontrándose en suero de humanos en rango de 1.9 a 17 mg/mL (Shehzad, Iqbal, Shehzad, & Lee, 2012). La adiponectina sufre modificaciones post-traduccionales importantes, como la glicosilación e hidroxilación en el dominio N-terminal, lo cual permite la multimerización del monómero de esta adipocina. Dicha multimerización genera la formación de trímeros que pesan 65 kDa y que son considerados de bajo peso (Low Molecular Weight; LMW); por medio de enlaces no covalentes pueden unirse a otro trímero para formar hexámeros de aproximadamente 60 kDa denominados de mediano peso molecular (Medium Molecular Weight; MMW) (Wang et al., 2006). Adicionalmente, los trímeros se enlazan por medio de puentes disulfuro a la cisteína 39 en



ratones o a la cisteína 36 en humanos, para así formar aglomerados de 12 a 18 monómeros con peso molecular de más de 400 kDa (High Molecular Weight; HMW). Esta última es la que mayor afinidad tiene a los receptores y por lo tanto la de mayor importancia metabólica (Liu & Liu, 2014b; Richards et al., 2006).

Existen dos tipos de receptores para adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2. Adipo R1 se encuentra principalmente en el músculo, propiciando la oxidación de ácidos grasos y la captura de glucosa. AdipoR2 se expresa en las células hepáticas, inhibe la gluconeogénesis y la síntesis de ácidos grasos. Adicionalmente, se sabe que la adiponectina evita la formación de ateromas inhibiendo la acción de moléculas de adhesión (Fisman & Tenenbaum, 2014). La cantidad de adiponectina secretada, se relaciona inversamente con la adiposidad, por ende, durante los procesos de sobrepeso y obesidad su concentración sérica se encuentra disminuida, generando disminución en la sensibilidad a la insulina, aumento en el proceso de inflamación del tejido adiposo e incremento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Li, Cheng, Lam, Vanhoutte, & Xu, 2011).

3.2. Generalidades del sobrepeso y la obesidad

El sobrepeso y la obesidad son patologías que se caracterizan por el incremento desmedido en el peso del individuo, particularmente, en el peso y volumen de tejido adiposo blanco debido a la gran capacidad que tiene para almacenar triglicéridos en los adipocitos. El aumento de la masa grasa puede deberse a la hipertrofia de los adipocitos maduros, o bien a hiperplasia ocasionada por la diferenciación de los preadipocitos y fibroblastos presentes en el tejido adiposo (Esteve Ràfols, 2014). En adultos se considera que un individuo tiene sobrepeso, cuando este posee un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 25 kg/m², y obesidad cuando su IMC es mayor o igual a 30 kg/m² (World Health Organization, 2016).

En estas condiciones, el tejido adiposo sufre una disfuncionalidad caracterizada principalmente por alteración en la secreción de adipocinas, en el proceso de adipogénesis y en de angiogénesis; también se genera resistencia a la insulina, inflamación crónica de bajo grado por el aumento de la secreción de citocinas proinflamatorias, hipoxia e inclusive apoptosis (Trayhurn, 2013).

3.2.1. Epidemiología

El sobrepeso y la obesidad tienen una elevada prevalencia y afectan principalmente a los seres humanos. A nivel mundial en el 2016, el 13 % de las personas mayores de 18 años



presentaban obesidad y el 39% sobrepeso (World Health Organization, 2016). En México se reportó en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición realizada en el 2016, una prevalencia de 39.2% para el sobrepeso y de 33.3% en el caso de obesidad en adultos de 20 a 49 años, siendo las mujeres las más afectadas. En el caso de los adolescentes de 12 a 19 años de edad, la prevalencia combinada fue de 36.3% y en los niños de 5 a 11 años de edad fue de 33.2%. Haciendo un seguimiento desde 1988, en la población mexicana ha habido un incremento en la prevalencia combinada del 37% y la tendencia para años posteriores es que vaya en aumento (ENSANUT, 2016).

3.2.2. Etiología

Adicionalmente a la susceptibilidad genética, existen diferentes factores ambientales que aumentan el riesgo a desarrollar obesidad, algunos de ellos afectando el metabolismo del tejido adiposo. Los factores más estudiados se centran en el estilo de vida y en el consumo de alimento, ya que una persona es más propensa a desarrollar obesidad cuando su nivel de actividad es bajo y sus hábitos alimenticios son malos. Sin embargo, en la actualidad se reconocen otros factores de riesgo que juegan un papel muy importante en el desarrollo de obesidad, tales como la alteración del ciclo circadiano por falta de sueño, la forma de nacimiento (parto o cesárea), la lactancia, efectos transgeneracionales, consumo de ciertos medicamentos, y de manera más reciente se reconoce la exposición a sustancias químicas y contaminantes ambientales (Panuganti & Lenehan, 2017).

3.2.2.1. Alimentación

Desde de los años cincuenta se ha observado aumento en el consumo de kilocalorías (kcal) en la población mundial. Principalmente en los países industrializados, la gente tiende a consumir alimentos energéticamente más densos, altos en grasas y carbohidratos simples, que al consumir dietas con mayor aporte de fibra o carbohidratos complejos (Scully, 2014). El consumo excesivo de este tipo de alimentos (altos en calorías) es uno de los factores más comunes para el desarrollo del sobrepeso y la obesidad, debido a una fácil y rápida absorción y con mayor capacidad lipogénica, ya sea por acúmulo de triglicéridos en el tejido adiposo blanco por ácidos grasos presentes en la dieta o bien por síntesis *de novo* (Herrera, Ramos de Castillo, Roca, & Viana, 2014).



3.2.2.2. Contaminantes ambientales

Recientemente se ha descrito la participación de sustancias químicas como factores de riesgo para el desarrollo de obesidad y/o para enfermedades metabólicas asociadas. Estas sustancias o contaminantes se encuentran de manera natural o artificial en el ambiente que nos rodea, e incluyen: pesticidas, fungicidas, bisfenoles, parabenos, dioxinas, ftalatos, retardantes de flama, hidrocarburos policíclicos aromáticos, metales, entre otros (Bray & Bouchard, 2014; Heindel, Newbold, & Schug, 2015; Nadal et al., 2017; Regnier & Sargis, 2014; Veiga-Lopez, Pu, Gingrich, & Padmanabhan, 2018). En relación a los metales, se sabe que algunos metales pesados como el plomo, el cadmio y el arsénico juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad (Sargis, Heindel, & Padmanabhan, 2019). Todos estos compuestos se sabe que actúan como disruptores endocrinos, alterando diferentes puntos de control metabólico en el adipocito, páncreas, hígado o músculo, provocando su disfunción, razón por la que se les ha denominado disruptores químicos del metabolismo (Heindel et al., 2017).

3.3. La grasa en la dieta

3.3.1. Cambio en la alimentación en México

Recientemente se ha podido observar el aumento en la demanda y consumo de aceites vegetales a nivel mundial y México no es la excepción. Mediante un análisis realizado por nuestro grupo de trabajo a partir de los datos de importación ajustados al consumo *per capita* que proporciona la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés), pudimos observar que la alimentación en México a lo largo del tiempo ha mostrado incremento en el consumo de kcal diarias provenientes principalmente de las grasas (datos no publicados) (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019). En dicho análisis, se comparó el consumo *per cápita* por macronutriente de 1961 al 2013, encontrando que en el 2013 se consumían al día 763 kcal más que en 1961. De este aumento en el consumo de energía, el 39.11 % lo aportan los hidratos de carbono (con consumo de 74.61 g más al día), el 13.08 % las proteínas (con consumo de 24.95 g más por día) y el 47.81 % las grasas (con consumo de 40.53 g más al día). Cabe señalar que a pesar de que se consumen más gramos de hidratos de carbono, las grasas aportan mayor cantidad de energía por gramo consumido (9 kcal/g), comparado con los otros dos macronutrientes que sólo aportan 4 kcal/g (WHO/FAO, 2002).



Las principales causas del aumento de energía proveniente de las grasas, podría ser la venta y consumo de alimentos industrializados, en donde uno de los ingredientes principales es el aceite de palma, el cual es de los aceites vegetales más consumidos a nivel mundial con el 64.02 % de la producción total de aceites vegetales (STATISTA, 2017). El aceite de palma es utilizado en la industria alimentaria para la producción de mantequillas y margarinas, aceite para freír y en diversos alimentos comerciales como helados y galletas, además de también ser utilizado para la producción de jabones, detergentes y biocombustible (Mba, Dumont, & Ngadi, 2015). Una de las características principales de este aceite es su elevado contenido de ácidos grasos saturados, en particular el ácido palmítico, lo que le confiere una consistencia sólida. El ácido palmítico, es uno de sus principales componentes del aceite de palma, constituyéndolo en 43.5 % seguido del ácido esteárico con 4.3 % (Marshall, 2011; United States Department of Agriculture Agricultural Research Service, 2016)

3.3.2. Ácido palmítico y su contenido en los alimentos

El ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$) es un ácido graso saturado considerado de cadena larga por sus 16 carbonos. Se encuentra de manera natural en todos los alimentos y en el suero de los mamíferos. Es precursor en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga y dependiendo de las necesidades de la célula, se sintetiza en mayor o menor medida. El ácido palmítico puede incorporarse a la membrana de la célula o a la del retículo endoplásmico, formar parte de las lipoproteínas al esterificarse en forma de triglicéridos o encontrarse libre en suero como un ácido graso no esterificado (Boyle, Nelson, & Cox, 2005). El ácido palmítico es un lípido esencial de las células y constituye más del 60% de los ácidos grasos presentes en los alimentos de origen animal y en los vegetales que poseen grasas saturadas como la semilla de palma (United States Department of Agriculture Agricultural Research Service, 2016).

3.3.3. Efecto de dietas altas en grasas y del ácido palmítico sobre leptina y adiponectina

De forma fisiológica, el ácido palmítico en humanos se encuentra en alto porcentaje. En el tejido adiposo de lactantes, las concentraciones oscilan entre el 45% y 50% del total de los ácidos grasos que lo componen, debido parte a la alta concentración de ácido palmítico que posee la leche materna (20%) y a su alta absorción (Innis, 2016). En adultos, se han observado que las concentraciones de ácido palmítico en suero oscilan entre 20% y 25% del total de los ácidos grasos, y se incrementa a 40% en personas con obesidad (Newgard et al.,



2009). Incluso se ha observado una correlación negativa entre las concentraciones de ácido palmítico y la concentración de adiponectina circulante (Fernández-Real, Vendrell, & Ricart, 2005), es decir, el aumento de este lípido en suero característico de la obesidad, se asocia con disminución de la adiponectina y por ende a menor sensibilidad a la insulina. Mientras que en un estudio en ratas que fueron alimentadas con grasa con distinto grado de insaturación por 21 días (saturada, mono y poliinsaturadas), se observó una disminución en las concentraciones séricas de adiponectina por aumento en la cantidad de grasa consumida, debido a acumulación en el retículo endoplásmico y en la membrana celular (Olivares-García et al., 2015). De igual forma, en otro estudio realizado en el mismo modelo animal alimentado con dieta alta en grasas por 4 semanas, se observó aumento en las concentraciones séricas de leptina (Steinberg & Dyck, 2000).

En estudios *in vitro*, se ha podido observar el efecto que tiene el ácido palmítico sobre las concentraciones de leptina. En cultivos primarios de adipocitos, se ha observado que la exposición al ácido palmítico genera una disminución progresiva en las concentraciones de leptina secretada de forma dosis-dependiente, en concentraciones de 0.1-1 mM por 2 h (Cammisotto, Gélinas, Deshaies, & Bukowiecki, 2005) o a concentraciones de 0-300 μ M durante 24 h (Shintani et al., 2000). En el caso de la adiponectina, el efecto del ácido palmítico se ha estudiado en adipocitos derivados de la línea celular 3T3-L1, observando que una exposición de 250 μ M por un periodo de 48 h, disminuye la expresión relativa del mensajero de adiponectina (Bueno et al., 2008). De igual manera, en células 3T3-L1, se ha observado disminución en la secreción de adiponectina de forma tiempo-dependiente con dosis de 500 μ M de palmitato, o bien un efecto dosis-dependiente con concentraciones de 300 y 500 μ M (Karki et al., 2011).

Como anteriormente se describió, los contaminantes ambientales también juegan un papel muy importante en el desarrollo de patologías relacionadas con la obesidad, por lo que son considerados factores de riesgo metabólico, entre ellos se puede destacar a el arsénico.

3.4. El arsénico

El arsénico es un metaloide que se encuentra distribuido de manera natural en la corteza terrestre en diversas regiones del mundo. El arsénico inorgánico es un elemento muy tóxico y puede ser encontrado en sus diferentes estados de oxidación como arsenato, arsenito. Las fuentes de exposición al arsénico son variadas, puede encontrarse en el agua donde su concentración dependerá de la geoquímica del suelo, del grado de evaporación de este y de la



actividad antropogénica. También puede encontrarse en los alimentos en cereales y vegetales principalmente. Sin embargo, las concentraciones de arsénico en estos son mínimas y no representan un problema. El arsénico es metabolizado por el cuerpo humano en reacciones oxido-reducción generando diferentes metabolitos metilados (Singh, Singh, Parihar, Singh, & Prasad, 2015).

3.4.1. Contaminación por arsénico

Además de la existencia natural del arsénico en el corteza terrestre, también existe la contaminación superficial del suelo debido a la actividad humana como el uso de pesticidas, insecticidas, herbicidas, fertilizantes y procesos industriales (Singh et al., 2015). El arsénico representa un riesgo importante para la salud en muchos países donde sus concentraciones son muy elevadas. Se estima que a nivel mundial entre 200 y 300 millones de personas se encuentran expuestas a arsénico (Landrigan, 2017; Quansah et al., 2015). Por ejemplo, en Bangladesh, India, es considerado como la principal sustancia de envenenamiento masivo ya que las concentraciones en el agua de bebida se encuentran entre 50 y 3,200 $\mu\text{g/L}$. En América, 14 de los 20 países tienen problemas de contaminación por arsénico (Bundschuh et al., 2012). En México, principalmente en la zona norte de país en los estados de Durango, Coahuila, Zacatecas, Aguascalientes, Chihuahua, Nuevo León, Guanajuato, Jalisco, San Luis Potosí y más al sur Puebla, Morelos y Oaxaca poseen concentraciones de arsénico mayores a 50 $\mu\text{g/L}$. Las zonas más afectadas son Zimapán, Los Altos, San Juan de los Lagos y la región de la Comarca Lagunera. En esta última, el 65% del agua extraída del subsuelo destinada al consumo y a la producción, se encuentra contaminada con arsénico en concentraciones de 8 a 624 $\mu\text{g/L}$ (McClintock et al., 2012; Mukherjee et al., 2006). A pesar de que la norma oficial mexicana (NOM-127-SSA1-1994) recomienda que la concentración permisible de arsénico en el agua de bebida no debe exceder 25 $\mu\text{g/L}$ (Secretaría de Salud, 2000) y la OMS recomienda que debe ser menor a 10 $\mu\text{g/L}$ (World Health Organization, 2011), el arsénico en el agua contaminada sigue consumiéndose con concentraciones mayores, provocando el desarrollo de diferentes enfermedades. Las lesiones más comunes de observar tras un consumo crónico y elevado de arsénico son las cutáneas, seguido de diferentes tipos de cáncer, problemas reproductivos, neurológicos, cardiovasculares y metabólicos como diabetes tipo 2 (Singh et al., 2015).



3.4.2. El arsénico como diabetógeno

Existe mucha evidencia epidemiológica y experimental de que el arsénico es un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 por lo que la OMS ya lo considera como diabetógeno (National Research Council (U.S.). Subcommittee on Arsenic in Drinking Water., 1999). En un estudio prospectivo en Taiwan realizado durante 4 años en población no diabética con exposición a arsénico, se evaluó la tolerancia a la glucosa tras ayuno de 12 horas, dando como resultado una asociación positiva entre la exposición al arsénico y el desarrollo de diabetes tipo 2 (Tseng et al., 2000). Desde entonces, varios estudios han observado correlación positiva entre la exposición crónica al arsénico y la prevalencia de diabetes en diferentes partes del mundo (Maull et al., 2012).

Desde el punto de vista experimental, los mecanismos de acción del arsénico se han enfocado principalmente en la funcionalidad pancreática y en menor grado sobre el tejido adiposo. Se ha visto que la exposición a dicho metaloide, disminuye la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células β -pancreáticas de rata mediante cambios en las concentraciones de calcio intracelular que impactan en la proteólisis de proteínas de la maquinaria de secreción de la insulina (Díaz-Villaseñor et al., 2008; Díaz-Villaseñor et al., 2006). Otros mecanismos sobre el efecto del arsénico en las células β -pancreáticas es la generación de estrés oxidante. Adicionalmente, en células de tejido adiposo, el arsénico evita la captación de glucosa impidiendo la translocación de los receptores GLUT4 hacia la membrana a través de la supresión de la expresión y fosforilación de Akt (Paul, Harmon, Devesa, Thomas, & Stýblo, 2007; Walton et al., 2004).

3.4.3. Efectos del arsénico sobre la leptina y la adiponectina

El efecto del arsénico sobre la síntesis y secreción de estas adipocinas se ha explorado muy vagamente hasta el momento. En mujeres embarazadas expuestas a arsénico en el agua de bebida se ha observado asociación positiva entre la concentración de arsénico en la orina y la cantidad de leptina en tejido placentario (Ahmed et al., 2010). De la misma manera, se ha encontrado tendencia de asociación positiva entre las concentraciones de arsénico en la orina con las concentraciones de leptina en sangre de cordón umbilical (Gossai et al., 2015). Por otro lado, en adipocitos derivados de células troncales, se sabe que el arsénico disminuye el ARNm de adiponectina cuando la exposición ocurre desde el inicio de su diferenciación celular hasta por 12 días, este efecto es dosis dependiente cuando las concentraciones de arsenito de sodio son de 0.1 a 2.5 μ M (Klei, Yesica Garciafigueroa, & Barchowsky, 2013). En el



mismo modelo experimental, se ha visto disminución significativa del mensajero de adiponectina a exposición de 1 μM de arsenito de sodio por 72 h (Garciafigueroa, Klei, Ambrosio, & Barchowsky, 2013). En ratones CD-1 expuestos *in utero* a diferentes concentraciones de arsenito de sodio (10 $\mu\text{g/L}$ y 42.5 mg/L) se observa aumento en las concentraciones de leptina sérica dosis dependiente, es decir a mayor concentración de arsénico, mayor cantidad de leptina en suero (Rodriguez et al., 2016). También en ratones C57BL/6 expuestos de manera crónica por 18 semanas a 5 o 50 mg/L de arsenito de sodio en el agua de bebida, se observó disminución en las concentraciones de adiponectina sérica, tanto la total como la de alto peso molecular (Song et al., 2017).

3.5. Efecto del arsénico en combinación de dietas altas en grasa

Se ha estudiado relativamente poco el efecto que tienen los ácidos grasos y el arsénico al combinarlos en diversas alteraciones metabólicas. Al respecto, estudios realizados en ratones wild type NMRI (Naval Medical Research Institute) expuestos a 25 y 50 mg/L de arsénico en agua de bebida por 20 semanas y a dieta alta en grasa, demostraron que la combinación de ambos produce sinergia por aumentar las concentraciones de leptina y adiponectina, producir disminución en la tolerancia a la glucosa, en la secreción de insulina y de las hormonas tiroideas y daño en los pulmones derivado de estrés oxidante (Ahangarpour et al., 2018; Ahangarpour et al., 2018; Hemmati, Alboghobeish, & Ahangarpour, 2018). En otros estudios realizados en ratones C57BL/6 expuestos de 3 a 50 mg/L de arsénico en agua de bebida por un periodo de 10 a 20 semanas y a dieta alta en grasa, también se demostró que el arsénico actúa sinérgicamente con la dieta alta en grasa para producir intolerancia a la glucosa y daño al ADN de células hepáticas (H. Hou et al., 2017; Paul, Walton, Saunders, & Styblo, 2011). En ratones Kunming expuestos a 200 mg/L de arsénico inorgánico en el agua de bebida por 10 meses y a dieta alta en grasa, se observó que el arsénico por si solo produce daño hepático y al combinarlo con la dieta alta en grasa aumenta la fibrosis hepática (Wu et al., 2008). Sin embargo, aún se requiere de más información para saber si el arsénico solo o en combinación con ácido palmítico puede o no generar disrupciones metabólicas en el adipocito para producir disfuncionalidad del tejido adiposo.



4. JUSTIFICACIÓN

La población mexicana presenta alta prevalencia de obesidad y de enfermedades metabólicas que se asocian a ella, representando el 42 % de las defunciones en el país. Además, presenta aumento en el consumo de grasa a través del tiempo y posee un problema de hidroarsenicismo considerable. Por tales razones resulta imperante la generación de conocimiento científico básico nuevo relacionado a la interacción de dichos factores.

La obesidad afecta al tejido adiposo alterando gran parte de su metabolismo, como la secreción de adipocinas, las cuales, desempeñan diversos efectos a nivel sistémico. Si bien ya se reconoce al arsénico como diabetógeno, se desconoce si el arsénico actúa como obesógeno, especialmente en relación con su efecto sobre la función endocrina del tejido adiposo blanco, en particular sobre la leptina y la adiponectina.

Existe cierta evidencia en la literatura que muestra que las dietas altas en ácidos grasos saturados, así como el ácido palmítico en particular, alteran las concentraciones de adiponectina y/o leptina desde su expresión génica hasta su secreción. Adicionalmente, existe evidencia aislada en la literatura que muestra que el arsénico también puede afectar dichas adipocinas. Sin embargo, no se ha evaluado el efecto de la combinación de ambos factores, el ácido palmítico y el arsénico, sobre la disfuncionalidad endocrina del adipocito blanco.

Con la finalidad de entender los mecanismos de acción por los cuales el arsénico y en presencia de ácido palmítico altera el metabolismo endocrino del adipocito, el proyecto contempla evaluar la síntesis y secreción de adiponectina y leptina en un modelo experimental *in vitro* de adipocitos, considerando diferentes etapas del estadio celular.



5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el arsenito de sodio o en combinación con el palmitato de sodio altera la síntesis y secreción de leptina y adiponectina en cultivos celulares de adipocitos.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

Exponer *in vitro* a adipocitos maduros por 72 h y a preadipocitos desde el inicio de la diferenciación celular hasta su maduración por 11 días, a arsenito de sodio, a palmitato de sodio y a la combinación de ambos para evaluar:

- a) Las dosis no citotóxicas pero equivalentes a exposiciones y concentraciones relevantes en el humano, de arsenito de sodio y palmitato de sodio, respectivamente
- b) La concentración secretada al medio extracelular de leptina y adiponectina
- c) La expresión de ARNm de leptina y adiponectina
- d) La abundancia intracelular de leptina y adiponectina
- e) La proporción de multímeros de adiponectina de diferente peso molecular secretados

7. HIPÓTESIS

El arsenito de sodio disminuye la síntesis y secreción de adiponectina y aumenta la de leptina en adipocitos maduros y en proceso de diferenciación. Dicho efecto en presencia de palmitato generará sinergia para potenciar la disminución.



8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Modelo y diseño experimental

Se utilizó la línea celular 3T3-L1 de fibroblastos de ratón (pases del 21 al 24), la cual tiene la capacidad de diferenciarse hacia adipocitos. Las células se crecieron con base a lo recomendado por la ATCC a una densidad aproximada de 100,000 células por área (3.8 cm^2), en medio DMEM alto en glucosa (25 mM) (Dulbeco's Modified Eagle Medium-High Glucose, Gibco, Cat: 12800017, Ontario, Canadá) suplementado con 10 % de suero de ternera (NCS, por sus siglas en inglés) (Biowest, Cat: S0750-500, Nauillé, Francia) y con 1% de antibióticos/antimicóticos (Biowest, Cat: L0010-100, Nauillé, Francia), desde la siembra (Día -4) hasta un día antes de la diferenciación (Día -1). Posteriormente, las células se mantuvieron en medio DMEM alto en glucosa con 10% de Suero Bovino Fetal (FBS, por sus siglas en inglés) (Byproducts, Cat: 90020, Jalisco, México) y con 1% de antibióticos/antimicóticos, desde la diferenciación (Día 0) hasta el último día del experimento (Día 11).

Para diferenciar a los fibroblastos hacia adipocitos, se adicionó al medio $1 \mu\text{M}$ de dexametasona (Sigma, Cat: D4902-100, Missouri, USA) diluido en dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma, Cat: D1435, Missouri, USA), 0.5 mM de Isobutil-Metil-Xantina (IBMX) (Sigma, Cat: I7018-250, Missouri, USA) diluido en DMSO y $1 \mu\text{M}$ de insulina de larga duración (Lantus, Sanofi, Estado de México, México), por 72 h. Posterior a la diferenciación, las células se mantuvieron en medio DMEM alto en glucosa, 10% de FBS y 1% de antibióticos/antimicóticos. Únicamente las 48 h posteriores a la diferenciación celular, el medio de cultivo se suplementó con insulina por 48 h más. De esta manera las células se mantuvieron en cultivo por un total de 15 días (Figura 1).

8.2. Tratamiento de arsenito de sodio y palmitato de sodio

Para establecer las dosis no citotóxicas, los cultivos celulares se expusieron a diferentes concentraciones (0.5, 1, 2, 5 y $10 \mu\text{M}$) de arsenito de sodio (As) (NaAsO_2 , P.M. 129.91; Sigma, Cat: 7784-46-5, Missouri, USA), a diferentes concentraciones (50, 100, 150, 200 y $400 \mu\text{M}$) de palmitato de sodio (Pa) ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{Na}$, P.M. 278.4; Sigma, Cat: P9767, Missouri, USA) y a la combinación de las diferentes concentraciones de arsenito con $200 \mu\text{M}$ de palmitato (AP).

Una vez definidas las dosis, el resto de los experimentos se realizaron con $1 \mu\text{M}$ de As, $200 \mu\text{M}$ de Pa y con la combinación de ambos. Los dos compuestos fueron diluidos y preparados en



condiciones de esterilidad en agua desionizada. En el caso del Pa, el agua se calentó a 65 C para obtener una solución homogénea.

La exposición a los compuestos se realizó bajo dos diferentes esquemas (Figura 1):

- **Diferenciación;** desde el inicio de la diferenciación cuando aún son fibroblastos (día 0) hasta que son adipocitos maduros, resultando en una exposición de 11 días en total.
- **Maduración;** una vez que son adipocitos maduros (día 8) por un periodo de 72 h.

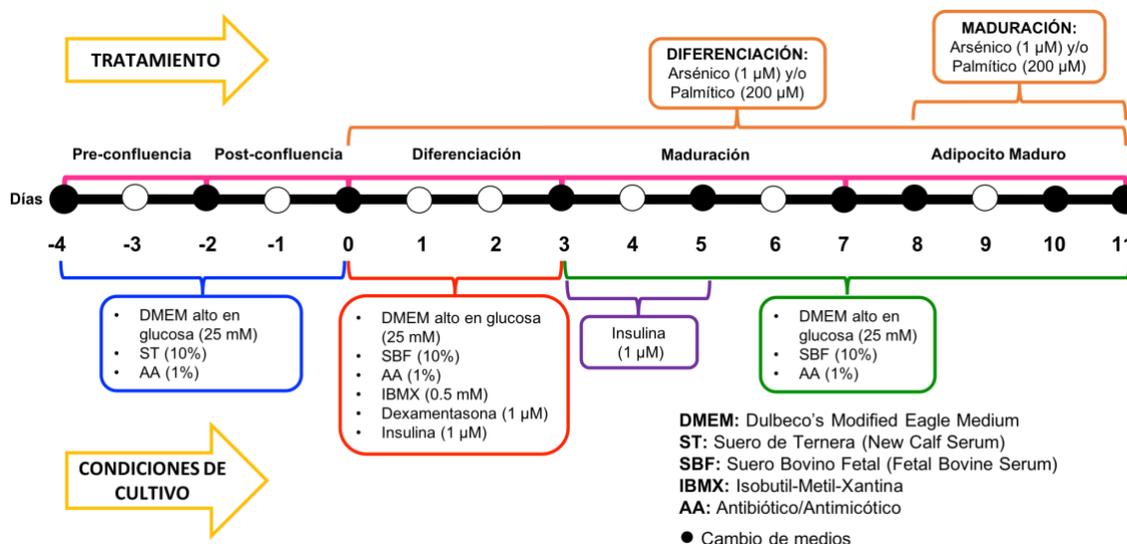


Figura 1. Esquema de tratamiento y protocolo de cultivo celular.

8.3. Sobrevida celular

Se buscó utilizar concentraciones no citotóxicas pero equivalentes a concentraciones relevantes en humanos. Para esto, se utilizó la técnica de tinción con 4,6-diamidino-2-felinindol (DAPI) (Sigma, Cat: D9542, Missouri, USA), la cual tiene una alta afinidad por los ácidos nucleicos de células vivas, principalmente a las regiones ricas en AT, produciendo una fluorescencia de color azul (Palu', Valisena, Barcellona, Masotti, & Meloni, 1987).

Al finalizar los dos esquemas de exposición, se les retiró el medio a las células y tras un lavado con buffer de fosfatos (PBS) y sin despegarlas, las células se fijaron en formalina al 10 % en PBS (Paraformaldehido, Sigma, Cat: F8775, Missouri, USA). Una vez fijadas las células, se permeabilizó la membrana con una solución de PBS con 0.1% de Tritón X-100 (BioRad, Cat: 1610407, Hemel Hempsted, Reino Unido) durante cinco minutos. Después de tres lavados con PBS, se añadió 1 μ g/mL de DAPI por cinco minutos y posteriormente se realizaron tres lavados con PBS.

Al término, las células se dejaron en PBS para realizar la cuantificación de fluorescencia intranuclear por medio de un fluorómetro de placas Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Vantaa Finland) con filtro de excitación 360 nm y de emisión de 460 nm. Se evaluó el porcentaje de células sobrevivientes con respecto a la condición control.

8.4. Secreción de leptina y adiponectina

El medio de cultivo se cambió 24 h antes de la cosecha del experimento (Día 10) para evaluar la secreción de adipocinas en el periodo de 1 día. Al término de las últimas 24 h, se recolectó todo el medio y se congeló a -70°C para ser evaluado posteriormente. El día de la medición, se descongeló el medio para realizar la cuantificación de ambas adipocinas con kits comerciales de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (RayBio, Cat: ELM-Adiponectin y ELM-Leptin, Georgia, USA), siguiendo las recomendaciones del proveedor. En el caso de la adiponectina se estandarizó previamente la dilución de la muestra quedando en proporción 1:250. Los anticuerpos de detección se diluyeron según lo estipulado en la hoja técnica del producto, 1:120 para leptina y 1:80 para adiponectina. La streptavidina conjugada con HRP se diluyó 1:120 y 1:700, respectivamente. La absorbancia se cuantificó en un espectrofotómetro de placas a una longitud de onda de 450 nm.

8.5. Expresión génica de leptina y adiponectina

Para realizar la extracción de ARN total, se lisaron y se recolectaron las células con Trizol (AMBION, Cat: 15596-026, California, USA) directo en las placas de cultivo. Las muestras se transfirieron a microtubos y se dejaron incubar a temperatura ambiente por cinco minutos, se añadió cloroformo (J.T. Baker, Cat: 9180-02, Pensilvania, USA) y se agitó manualmente por 15 segundos. Posterior a la incubación de tres minutos, las muestras se centrifugaron a 12,000 g por 10 min a 4 C. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se añadió isopropanol al 100% (Sigma, Cat: I9516, Missouri, USA) para precipitar al ARN. Después de incubar las muestras por 10 min, se centrifugaron a 12,000 g por 10 min a 4 C para la formación del pellet de ARN. Se eliminó el isopropanol con vacío, se añadió etanol al 75% con dietil pirocarbonato (DEPC) (Sigma, Cat: D5758, Missouri, USA) para lavar el pellet y se centrifugó a 7,500 g por 5 minutos a 4 C. Se eliminó el etanol por decantación, se dejó secar por 7 min y el ARN se resuspendió en 20 μL de agua DEPC libre de ARNasas. La cuantificación del ARN total de cada muestra se realizó en el Nanodrop y posteriormente se congeló a -70°C .



Para la síntesis de ADN complementario (ADNc), se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcriptasa reversa. Cada muestra de ARN se diluyó en agua destilada a una concentración final por muestra de 3,000 ng en 9 µL totales (333 ng/µL). Se colocaron los 9 µL de la dilución de ARN en tubos para PCR junto con 2 µL de Oligo dT 1 µM (Invitrogen, Cat: 18418-020, California, USA) y 1 µL de dNTP Mix 10 mM (Promega, Cat: U1515, Wisconsin, USA), y se incubaron a 65 C por 5 min. Posteriormente, utilizando los productos del kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen, Cat: 28025-013, California, USA), se añadieron 4 µL del Buffer 5X First-Standard, 2 µL de DTT 0.1 M, 0.5 µL de inhibidor de ribonucleasas (Promega, Cat: N2511, Wisconsin, USA) y 0.5 µL de agua. Posteriormente, las muestras se incubaron a 37 C por 2 min. Inmediatamente después de la incubación, se añadió 1 µL de retrotranscriptasa M-MLV y se incubó a 25 C por 10 min, 37 C por 50 min y por último a 70 C por 10 min. Todas las incubaciones se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

La cuantificación relativa del ARNm de leptina y adiponectina se realizó por medio de PCR en tiempo real con el uso de sondas Taqman (Life Technologies, Cat: Mm00434759 y Mm00456425, respectivamente) y se cuantificó el ARN mensajero de Ciclofilina y HPRT (Life Technologies, Cat: Mm02342429 y Mm01545399, respectivamente) como controles de expresión endógena. La eficiencia de las sondas se calculó con la siguiente fórmula:

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

Donde “m” es la pendiente de la recta de las diluciones del rango dinámico. Las eficiencias para cada gen fueron las siguientes: leptina 1.91, adiponectina 1.79, HPRT 1.78 y ciclofilina 1.75. El análisis de los datos se realizó con el método de PFLAFFL (Pfaffl, 2002; Pfaffl, Tichopad, Prgomet, & Neuvians, 2004) para dos genes constitutivos con la siguiente formula:

$$Abundancia\ Relativa = \frac{EfGi^{(Ct\ CtlBiol\ Gi - Ct\ CoExp\ Gi)}}{\sqrt{EfRef1^{(Ct\ CtlBiol\ Ref1 - Ct\ CoExp\ Ref1)} * EfRef2^{(Ct\ CtlBiol\ Ref2 - Ct\ CoExp\ Ref2)}}$$

Donde, “Ef” es la eficiencia de la sonda, “Gi” el gen de interés, “Ct” es el valor del ciclo umbral de detección, “CtlBiol” es el promedio del control biológico, “CoExp” hace referencia a las



condiciones experimentales (As, Pa, y AP) y “Ref” a los genes de expresión constitutiva que se están tomando de referencia.

8.6. Abundancia intracelular de leptina y adiponectina

La proteína total se extrajo directo en la placa de cultivo con buffer de lisis a base de PBS, y Tritón X-100 (1%) (BioRad, Cat:1610407, California, USA) y dodecil sulfato de sodio (SDS) (0.1%) (BioRad, Cat: 1610301, California, USA), adicionada con una pastilla de inhibidores de proteasas (ROCHE complete mini, Cat:11836153001, Madrid), 1 mM de fluoruro de sodio (NaF) (Sigma, Cat: S7920, Missouri, USA) y 2 mM de ortovanadato de sodio (NA₃VO₄) (Sigma, Cat: S6508, Missouri, USA) como estabilizadores protéicos. La proteína total se cuantificó utilizando el kit DC Protein Assay (BioRad, Cat: 500-0116, California, USA) y albúmina (BioRad, Cat: 500-0007, California, USA) como estándar. Se midió en un espectrofotómetro de placas a una absorbencia de 750 nm.

La abundancia intracelular de las proteínas leptina y adiponectina, se realizó mediante la técnica electroforética Western Blot en condiciones desnaturalizantes. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 12%. Se corrieron 30 µg de proteína de cada una de las muestras, diluidas con buffer de carga Laemmli 4x (BioRad, Cat:161-0710) con β-mercaptoetanol (BioRad, Cat: 161-0710, California,USA) en proporción 3:1, respectivamente. Los volúmenes de las muestras se ajustaron con PBS-Tritón X-100 (1%) con el fin de que en todos los pozos se cargara la misma cantidad de volumen. Las muestras se desnaturalizaron mediante una incubación a 95 C por 5 min. En un carril del gel, siempre se corrieron 5 µL del marcador de peso molecular con las proteínas de referencia preteñidas con color (BioRad, Cat: 161-0375, Nueva Jersey, USA). Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis vertical a 100 V por 30 min para permitir la alineación de las proteínas y a 150 V para separarlas según su peso molecular. Terminada la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de PVDF de 0.45 µm de baja fluorescencia (BioRad Cat:162-0264 California, USA) en una cámara de transferencia húmeda vertical en condiciones frías a 100 V por 60 min en buffer Zhafer-Nielsen con 20% de metanol (Karal, Cat: 2100, Guanajuato, México). Al término de la transferencia, las membranas se bloquearon con leche descremada (BioRad, Cat:170-6404) al 5% en TBS-tween al 1% por una hora y posteriormente se incubó toda la noche a 4 C con los anticuerpos primarios a una dilución de 1:1,000 para leptina (Abcam, Cat: AB16227, Cambridge, UK) o adiponectina (Millipore, Cat: AB3269P, Darmstadt, Alemania). El anticuerpo secundario anti-conejo con peroxidasa de rabano (HRP) (Santa Cruz, Cat: sc-2357, Texas,



USA) se utilizó a una dilución de 1:3,500 y se incubó por hora y media a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween al 1% por 10 min.

Para la inmunodetección por quimioluminiscencia, se utilizó el sustrato ECL (Millipore, Cat: WBKLS0100, Darmstadt, Alemania) y las imágenes se capturaron con el fotodocumentador GeLogic 1500 Imaging System (Kodak). Las densitometrías de las bandas se realizaron con el software Image Lab versión 6.0.0 edición estándar (BioRad, California, USA) con la sustracción global del fondo. Como control de carga se realizó la densitometría de los carriles en los geles teñidos con Azul de Coomassie. Para el análisis, los datos se ajustaron dividiendo el valor de las densitometrías de las bandas de las adipocinas entre la proteína total cargada mediante los geles teñidos con Azul de Coomassie.

8.7. Multímeros de adiponectina secretados

La proporción de adiponectina de bajo, medio y alto peso molecular (LMW, MMW y HMW, respectivamente) secretados al medio se determinó por la técnica de Western Blot previamente descrita, pero ahora en condiciones no desnaturizantes.

Para este caso, los medios de cultivos recolectados fueron sometidas a un proceso de sublimación donde se congelaron 500 μ L de cada muestra en tubos de ensaye. Posteriormente, se colocaron los tubos en una cama de hielo y cada tubo se sometió a una presión constante de nitrógeno comprimido que fluía a través de pipetas Pasteur, las cuales se mantuvieron a escasos milímetros de la superficie de la muestra. Una vez deshidratadas las muestras se mantuvieron en congelación a -80 C y se resuspendieron hasta el momento de su evaluación en 25 μ L de PBS con ortovanadato de sodio 2 mM, fluoruro de sodio a 1 mM e inhibidores de proteasas con la finalidad de concentrar las muestras 20 veces. Para el buffer de carga se utilizó Laemmli 4x (BioRad, Cat:161-0747, California, USA) en proporción 3:1. Como control positivo, se utilizó suero de ratón a una dilución de 1:50. Las muestras se cargaron en geles de gradiente pre-hechos de 4 al 20% (BioRad, Cat: 456-1096, California, USA) y se corrieron a 200 V sobre en condiciones frías. El anticuerpo primario contra adiponectina se utilizó en una dilución 1:1,000 y el secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa a 1:3,500. Como control de carga en esta ocasión se realizó la densitometría de los carriles en las membranas teñidas con Azul de Coomassie.



8.8. Análisis estadístico

Los datos se muestran como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Para determinar la diferencias significativas entre cuatro las condiciones experimentales, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Para el análisis *post hoc* para determinar las diferencias entre las cuatro condiciones, se realizó la prueba de Dunnet para los experimentos de viabilidad celular, comparando contra la condición control y para el resto de los experimentos se utilizó la prueba *post hoc* de LSD Fisher. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Se utilizó el software GraphPad Prism v.6. para realizar el análisis de los datos.



9. RESULTADOS

9.1. Sobrevida celular

Con el fin de identificar las dosis relevantes, pero no citotóxicas, las células fueron incubadas con diferentes dosis de As (0.5, 1, 2, 5 y 10 μM) y de Pa (50, 100, 150, 200 y 400 μM). En la condición de diferenciación, la concentración de 10 μM de As redujo significativamente ($p < 0.0001$) la sobrevida celular al 50% de la población control (Figura 2A), mientras que la dosis de 400 μM de Pa la redujo en 25% de manera significativa ($p < 0.0001$) (Figura 2B). En el caso de la combinación de ambos compuestos, sólo la dosis de 10 μM de As con 200 μM de Pa (Figura 2C), disminuyó la sobrevida celular de forma significativa ($p < 0.0001$) en 25% aproximadamente. Para la condición de maduración, ninguna de las dosis de As, de Pa o la combinación de ambos compuestos fueron citotóxicas. (Figura 2D, 2E y 2F). Con base en dichos resultados obtenidos de sobrevida celular, se decidió utilizar para el resto de los experimentos las dosis de 1 μM de As y 200 μM de Pa, en dichas condiciones.

Adicionalmente, con el objetivo de identificar si la diferencia encontrada con las dosis altas de As y Pa, entre la condición de diferenciación y de maduración, pudo estar dada por el tiempo de exposición (11 días vs 72 h, respectivamente) se realizó un segundo ensayo. En este caso los adipocitos maduros se expusieron durante 8 días más, adicionales a las 72 h contempladas en el primer ensayo, dando un total de 11 días, con la finalidad de que el tiempo de exposición fuera igual y sólo variara el estadio celular, es decir 11 días de tratamiento desde la diferenciación o a partir de la maduración. Como resultado, ninguno de los dos compuestos en sus diferentes concentraciones o en conjunto, produjeron un cambio significativo (Figura 2G, 2H, 2I).



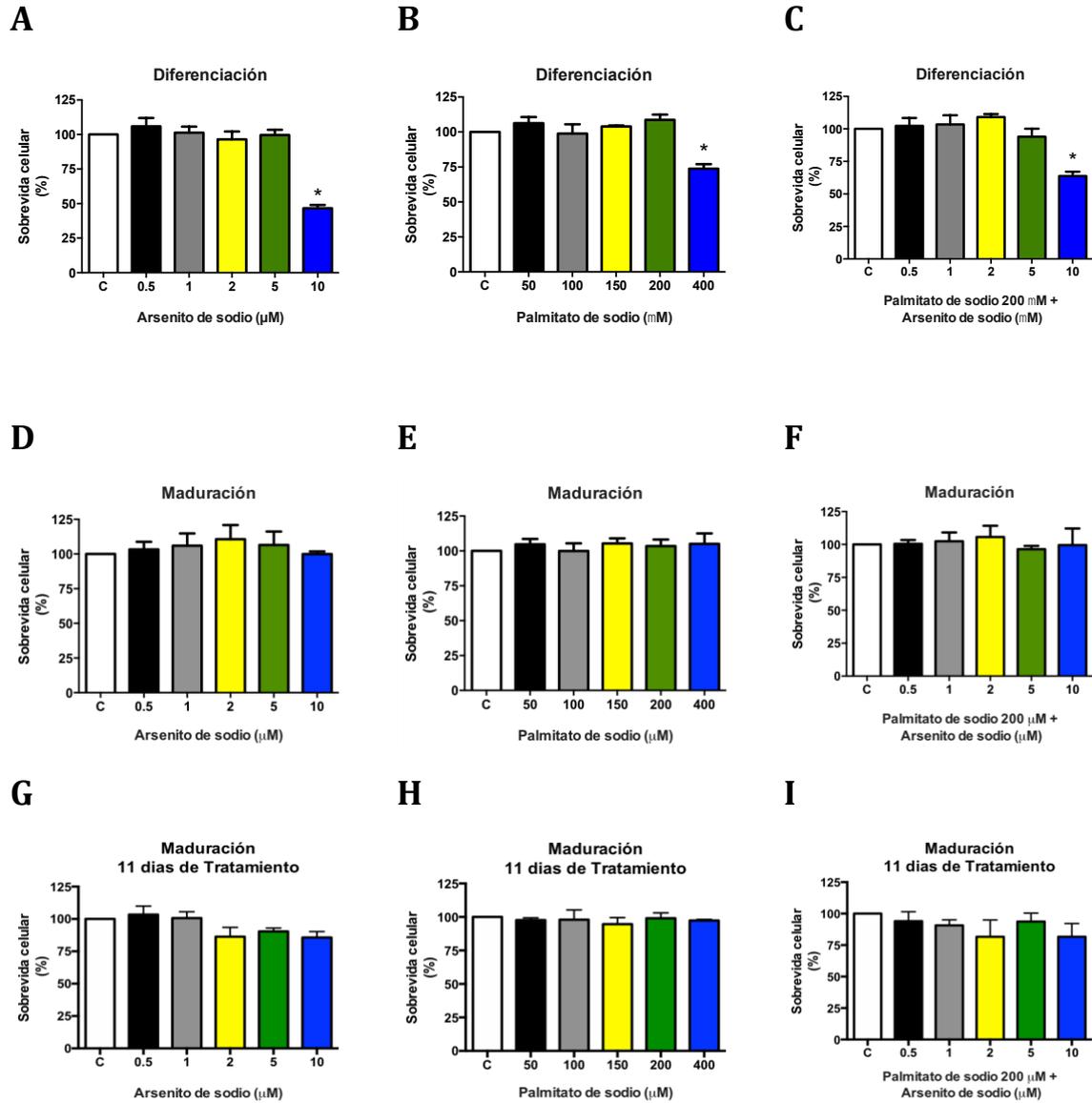


Figura 2. Sobrevivencia celular.

Adipocitos 3T3-L1 evaluados con la técnica de tinción de núcleo con DAPI. Exposición a diferentes concentraciones de: A) As por 11 días desde el inicio de la diferenciación, B) Pa por 11 días desde el inicio de la diferenciación, C) As con 200 μM de Pa por 11 días desde el inicio de la diferenciación, D) As por 72 h en adipocitos maduros, E) Pa por 72 h en adipocitos maduros, F) As con 200 μM de Pa por 72 h en adipocitos maduros, G) As por 11 días a partir del día 8 de maduración, H) Pa por 11 días a partir del día 8 de maduración, I) As con 200 μM de Pa por 11 días a partir del día 8 de maduración. Media \pm EEM de 3 experimentos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, post hoc Dunnet. * $p < 0.0001$ vs la condición control.

9.1. Leptina

9.1.1. Secreción de leptina

Tras la exposición de As, Pa y la combinación de ambos compuestos desde el inicio de la diferenciación, se observó que la cantidad de leptina secretada disminuyó de manera significativa ($p < 0.05$) con los 3 tratamientos cuando se comparó contra con la condición control (Figura 3A). El tratamiento con As demostró disminución de casi el 50% del control con diferencia significativa ($p < 0.05$), seguido por el tratamiento de Pa y en menor medida (23%) por la combinación de ambos compuestos. De tal forma que la secreción de leptina con el tratamiento combinado fue significativamente ($p < 0.05$) mayor que el tratamiento con As solo (Figura 3A).

Para la condición de Maduración (Figura 3B), se observó un patrón similar, pero con magnitudes diferentes. La secreción de leptina disminuyó de manera significativa ($p < 0.05$) con respecto al control en las células tratadas con el tratamiento único de As aproximadamente en 75%, a 15% con el tratamiento de Pa y 24% con el tratamiento combinado, con una marcada diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tres grupos experimentales.

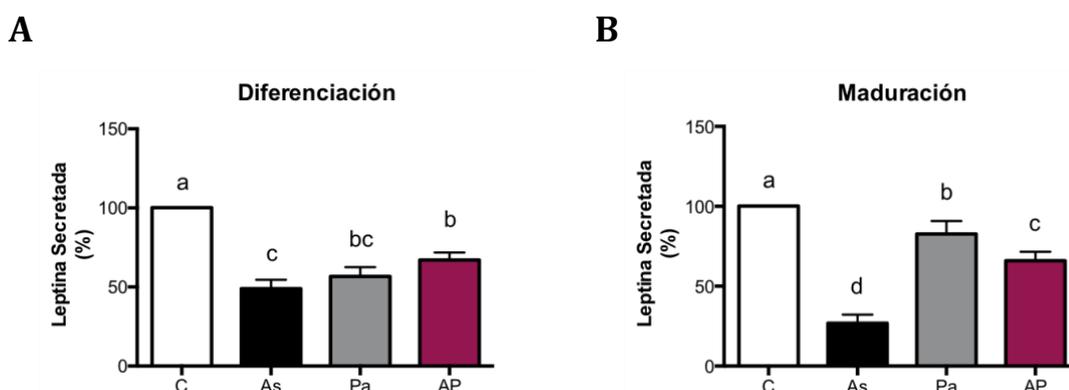


Figura 3. Leptina secretada al medio en 24 h.

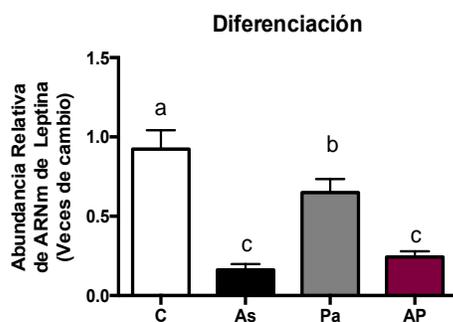
Adipocitos 3T3-L1 expuestos a arsenito de sodio 1 μM (As), palmitato de sodio 200 μM (Pa) y a la combinación de ambos (AP), A) desde el inicio de la diferenciación por 11 días, B) por 72 h como adipocitos maduros. Media \pm EEM de 3 experimentos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, post hoc LSD Fisher, donde $a > b > c > d$, $p < 0.05$.

9.1.2. Expresión génica de leptina

Dado que los tratamientos redujeron la secreción de leptina, con el fin de determinar si está disminución estaba asociada a reducción en la expresión del gen de leptina, se evaluó la abundancia del ARN mensajero de leptina. Como se puede observar en la Figura 4A, se presentó disminución significativa ($p < 0.05$), casi del 76%, del mensajero con los tratamientos de As en el esquema de diferenciación, y combinado con Pa tuvo recuperación del 13%, sin embargo, la expresión sigue siendo significativamente ($p < 0.05$) menor en comparación a la condición control. Por otro lado, el tratamiento con plamitato también afectó la expresión del mensajero de leptina de forma significativa ($p < 0.05$), pero en menor grado, con reducción del 25% (Figura 4A).

En el esquema de maduración, el ARN mensajero de leptina disminuyó significativamente con los tres tratamientos alrededor del 50% (Figura 4B).

A



B

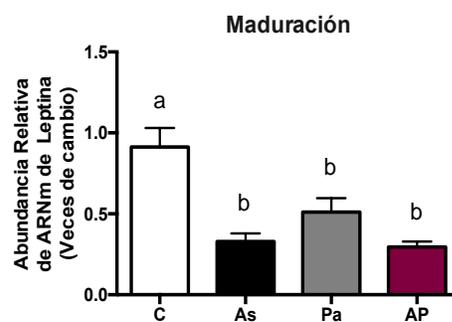


Figura 4. Abundancia relativa de ARNm de leptina

Adipocitos 3T3-L1 expuestos a arsenito de sodio 1 μM (As), palmitato de sodio 200 μM (Pa) y a la combinación de ambos (AP), A) Desde el inicio de la diferenciación por 11 días, B) por 72 h como adipocitos maduros. Media \pm EEM de 3 experimentos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, post hoc LSD Fisher, donde $a > b > c$, $p < 0.05$.

9.1.3. Abundancia proteica de leptina intracelular

Con el objetivo de identificar si la disminución en la abundancia del ARN mensajero de leptina por los tratamientos repercutía también en la síntesis proteica de leptina, se evaluó la abundancia de leptina intracelular. En el esquema de diferenciación se observó que con la combinación AP, la abundancia de leptina intracelular disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en comparación a las células en condición control y tratadas con Pa, mientras que no mostró diferencias significativas con respecto al tratamiento solo de As, aunque sí hubo tendencia a

disminuir (Figura 5A). Los tratamientos de As y Pa solos, no mostraron cambios con respecto a la condición control en el esquema de diferenciación (Figura 5A).

En el caso del esquema de maduración, se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) de magnitud similar (del 42 al 47%) de la abundancia intracelular de leptina con los tres tratamientos con respecto a la condición control (Figura 5B).

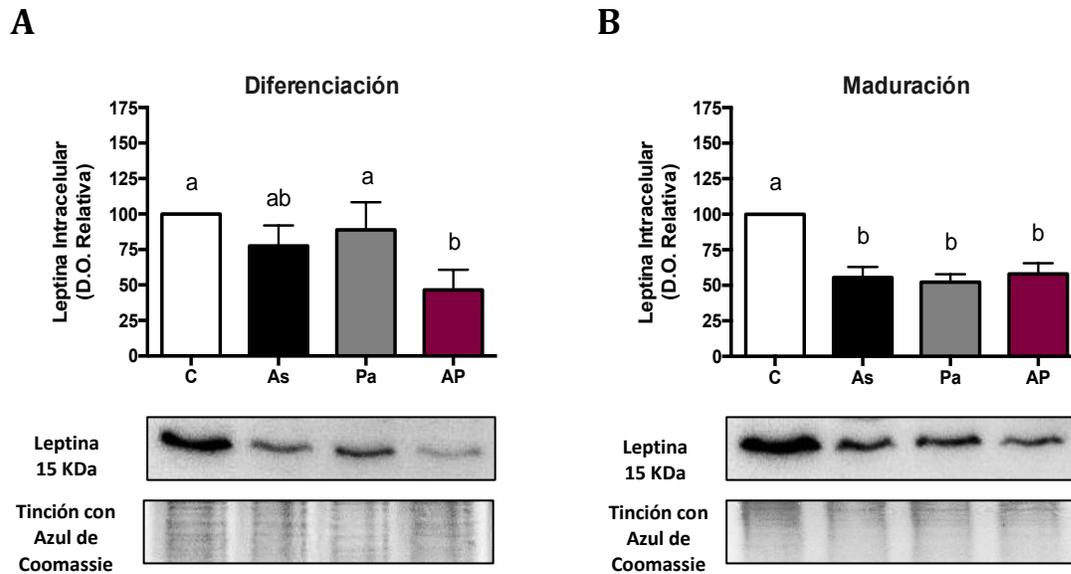


Figura 5. Abundancia de leptina intracelular.

Adipocitos 3T3-L1 expuestos a arsenito de sodio 1 μM (As), palmitato de sodio 200 μM (Pa) y a la combinación de ambos (AP), A) Desde el inicio de la diferenciación por 11 días, B) por 72 h como adipocitos maduros. La normalización se realizó con la tinción con Azul de Coomassie (imágenes inferiores) Media \pm EEM de 3 experimentos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, post hoc LSD Fisher, donde $a > b$, $p < 0.05$.

9.2. Adiponectina

9.2.1. Secreción de adiponectina

En relación con la secreción de adiponectina, posterior a la exposición a los compuestos en el esquema de diferenciación, el As disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la concentración de adiponectina secretada, en más del 50% cuando se aplicó solo y 41% cuando se combinó con Pa (Figura 6A). El grupo tratado únicamente con Pa mostró disminución menor en la secreción de adiponectina con respecto a los otros dos grupos tratados con As, con disminución significativa ($p < 0.05$) del 14% con respecto al control (Figura 6A).

En la condición de Maduración, la secreción de adiponectina tuvo disminución ligera pero significativa ($p < 0.05$) contra el control en los grupos tratados con As y con la combinación AP. Para el grupo tratado con Pa no ocurrieron cambios significativos (Figura 6B).

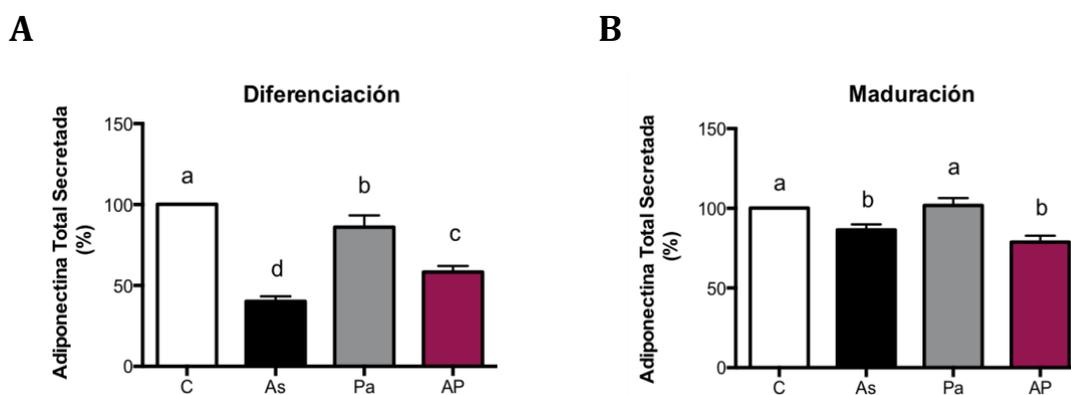


Figura 6. Adiponectina secretada al medio en 24 h.

Adipocitos 3T3-L1 expuestos a arsenito de sodio 1 μM , (As), palmitato de sodio 200 μM (Pa) y a la combinación de ambos (AP), A) Desde el inicio de la diferenciación por 11 días, B) por 72 h como adipocitos maduros. Media \pm EEM de 3 experimentos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, post hoc LSD Fisher, donde $a > b > c > d$, $p < 0.05$.

9.2.2. Expresión génica de adiponectina

Dadas las disminuciones en la secreción de adiponectina por los 3 diferentes tratamientos, se evaluó la abundancia del ARN mensajero con la finalidad de identificar desde qué nivel ocurrió el efecto. En el esquema de Diferenciación, el ARN mensajero de adiponectina se vio disminuido significativamente ($p < 0.05$) por la acción de los tratamientos con As solo y

combinado con Pa, en 27% y 33%, respectivamente. Mientras que con Pa no hubo efecto (Figura 7A).

En la condición de Maduración, se observó una tendencia similar, donde el ARN mensajero de adiponectina disminuyó significativamente ($p < 0.05$) con ambos tratamientos de As, solo (en 19%) y en combinación con Pa (en 27%), mientras que el Pa no modificó la expresión génica de adiponectina (Figura 7B).

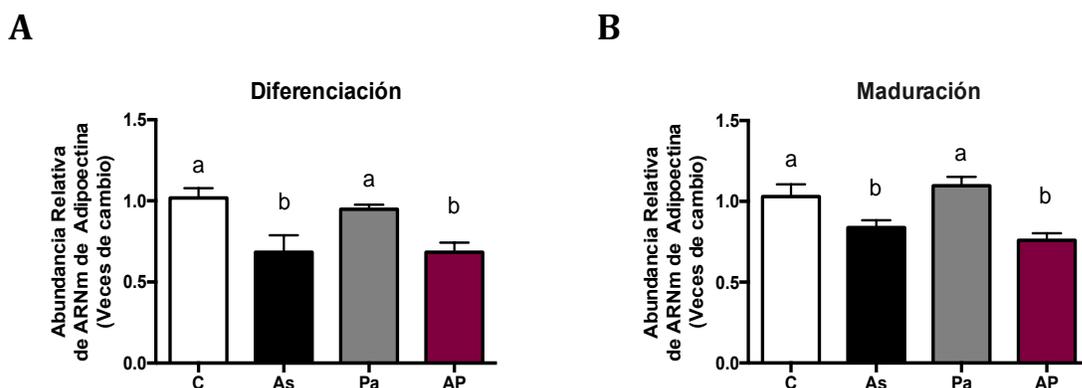


Figura 7. Abundancia relativa de ARNm de adiponectina.

Adipocitos 3T3-L1 expuestos a arsenito de sodio 1 μM (As), palmitato de sodio 200 μM (Pa) y a la combinación de ambos (AP), A) Desde el inicio de la diferenciación por 11 días, B) por 72 h como adipocitos maduros. Media \pm EEM de 3 experimentos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, post hoc LSD Fisher, donde $a > b$, $p < 0.05$.

9.2.3. Abundancia proteica de adiponectina intracelular

Con la finalidad de continuar con el rastreo del nivel al que los tratamientos ejercen el efecto sobre la adiponectina, se determinó la abundancia intracelular de esta adipocina. En ambos esquemas, diferenciación y maduración, tanto el tratamiento con As como el tratamiento combinado AP redujeron la cantidad de adiponectina intracelular de manera significativa ($p < 0.05$). En el caso de la diferenciación, la disminución fue de 66%, mientras que en maduración fue de 46% (Figura 8A y 8B). En ambos casos el Pa no tuvo efecto sobre la abundancia intracelular de adiponectina (Figura 8A y 8B).

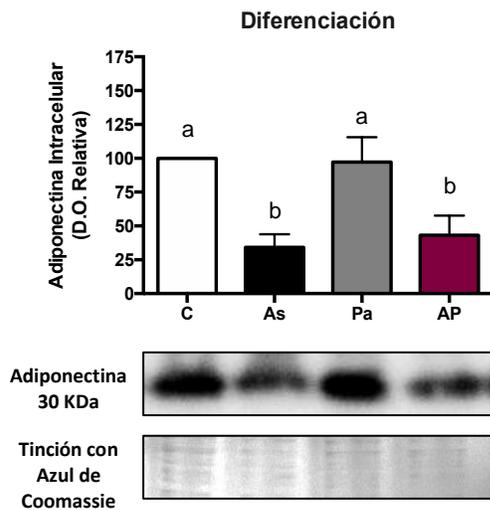
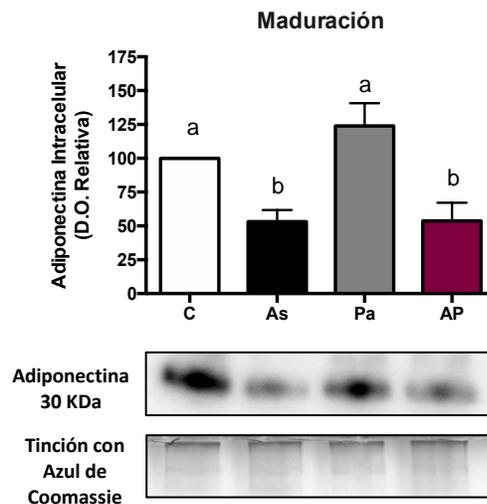
A**B**

Figura 8. Abundancia de adiponectina intracelular.

Adipocitos 3T3-L1 expuestos a arsenito de sodio 1 μ M (As), palmitato de sodio 200 μ M (Pa) y a la combinación de ambos (AP), A) Desde el inicio de la diferenciación por 11 días, B) por 72 h como adipocitos maduros. La normalización se realizó con la tinción con Azul de Coomassie (imágenes inferiores). Media \pm EEM de 3 experimentos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, post hoc LSD Fisher, donde $a > b$, $p < 0.05$.

9.2.4. Multímeros de adiponectina secretados

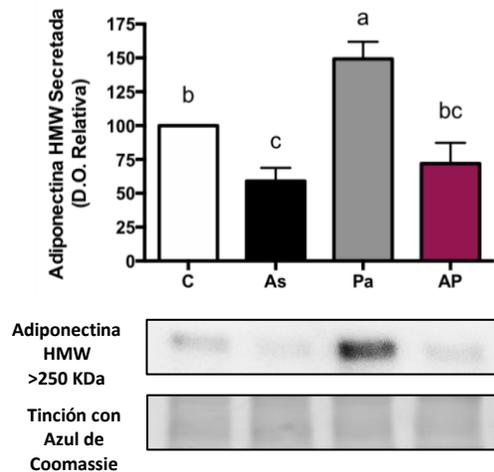
Con la finalidad de determinar si el proceso de multimerización de la adiponectina se estaba afectando por los tratamientos, se determinó la proporción de los diferentes multímeros (LMW, MMW y HMW) secretados. Debido a que la prueba de ELISA utilizada únicamente tiene la capacidad de determinar la cantidad de adiponectina total secretada, los multímeros fueron determinados en el medio por medio de Western Blot en condiciones no desnaturizantes. Para saber si los tratamientos modificaban la abundancia de los tres diferentes multímeros de manera individual, los valores se ajustaron a los niveles del control de cada uno de ellos.

Cuando la exposición ocurrió por 11 días desde la diferenciación (Figura 9), se puede observar que la adiponectina de alto peso molecular (HMW) secretada, disminuyó significativamente ($p < 0.05$) 41.3% con el tratamiento de As comparado con el control, mientras que con el Pa hubo aumento del 49.2% que fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) a las otras tres condiciones experimentales. Finalmente, la combinación de ambos compuestos no mostró cambios con respecto a la condición control (Figura 9A). Para el caso de la adiponectina de medio peso molecular (MMW) en el esquema de diferenciación, únicamente ocurrió disminución significativa ($p < 0.05$) en la secreción con el tratamiento de As (Figura

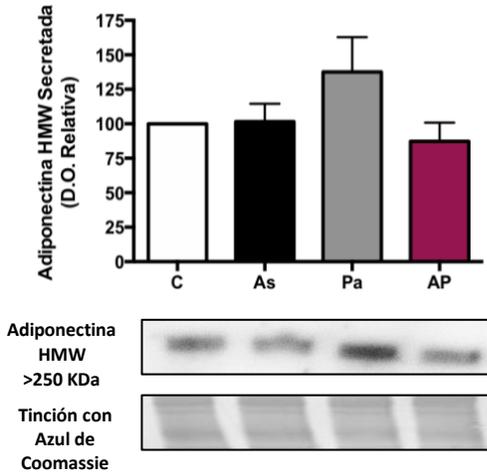
9B). Finalmente, para la secreción de adiponectina de bajo peso molecular (LMW), todos los tratamientos disminuyeron su secreción significativamente ($p < 0.05$) en comparación al control, siendo el tratamiento de As el más afectado con disminución del 63.7%, seguido de la combinación AP con disminución del 42.1% y por último el Pa que disminuyó la secreción 17.6% (Figura 9C).

En el esquema de Maduración no hubo diferencias estadísticamente significativas en la adiponectina de alto peso molecular (HMW) secretada, sin embargo, hubo tendencia a incrementar la secreción de este multímero de adiponectina con el tratamiento de Pa (Figura 9D). A comparación del control, el único tratamiento que disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la adiponectina de mediano peso molecular (MMW) fue la combinación AP, con disminución del 42.5% (Figura 9E). Por último, no se observó cambio en la adiponectina de bajo peso molecular (LMW) secretada (Figura 9F).

A



D



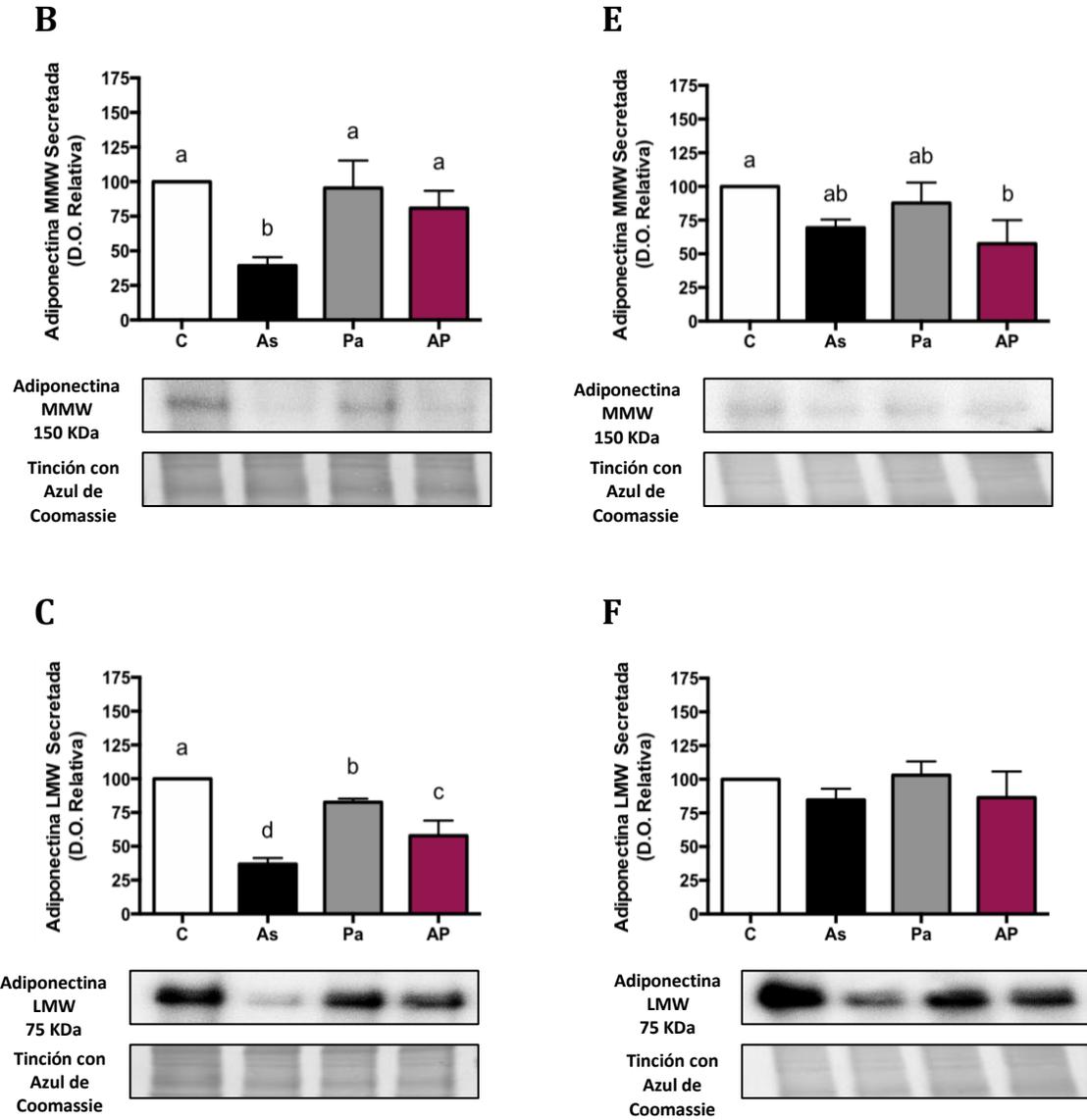


Figura 9. Abundancia de multimeros de adiponectina secretados.

Adipocitos 3T3-L1 expuestos a arsenito de sodio 1 μ M (As), palmitato de sodio 200 μ M (Pa) y a la combinación de ambos (AP), (A, B, C) desde el inicio de la diferenciación por 11 días y (D, E, F) por 72 horas como adipocitos maduros. (A y D) adiponectina de alto peso molecular (HMW) secretada. (B y E) Adiponectina de mediano peso molecular (MMW) secretada. (C y F) Adiponectina de bajo peso molecular (LMW) secretada. La normalización se realizó con la tinción con Azul de Coomassie (imágenes inferiores). Media \pm EEM de 3 experimentos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, post hoc LSD Fisher, donde $a > b > c > d$, $p < 0.05$.



10. DISCUSIÓN

Con la finalidad de encontrar dosis no citotóxicas pero que fueran equivalentes a exposiciones y concentraciones relevantes en humanos de As y Pa para su uso en un modelo experimental *in vitro* en adipocitos 3T3-L1, se evaluó la sobrevivencia celular de cada compuesto considerando el tiempo de exposición por 11 días desde el inicio de su diferenciación (esquema de diferenciación) o por 72 horas una vez que los adipocitos eran ya maduros (esquema de maduración). Solamente en el esquema de diferenciación se encontró que las concentraciones altas de As (10 μM) y de Pa (400 μM) son citotóxicas, mientras que en el esquema de maduración no lo fueron. Para descartar el hecho de que las diferencias en la sobrevivencia celular entre ambos esquemas pudiesen ir en función del tiempo de exposición, se decidió tratar a las células del esquema de maduración por 8 días más, para completar 11 días de exposición. El resultado fue similar al anterior, no hubo pérdida de la viabilidad celular con las concentraciones más altas, por lo que el tiempo de tratamiento no tuvo influencia en los resultados encontrados entre ambos esquemas. Por el contrario, las diferencias se pueden adjudicar al estadio celular en el que ocurre la exposición. Para llevar a cabo los experimentos, se decidió utilizar la dosis de 1 μM de As que corresponde a la concentración sérica comúnmente encontrada en suero de humanos cuando hay una exposición crónica alta de este metaloide (Díaz-Villaseñor et al., 2007). En el caso del Pa, se utilizó la concentración de 200 μM , la cual es ligeramente superior a la encontrada en suero de humanos obesos, la cual es de aproximadamente 140 μM (Newgard et al., 2009).

El As tuvo efecto considerable al disminuir la secreción de leptina, en ambos esquemas de tratamiento, con efecto desde la disminución de la expresión del gen (Figura 10A). Este hallazgo difiere con lo encontrado por Gossai et al., 2015, en donde observaron aumento en las concentraciones de leptina circulante en sangre de cordón umbilical en mujeres embarazadas expuestas a arsénico. Sin embargo, debido a que la leptina también se expresa en tejido placentario (Maymó et al., 2011), se podría considerar que las concentraciones de leptina del estudio de Gossai et al., son las provenientes de tejido placentario y no tanto del tejido adiposo, motivo por el cual no sería adecuado realizar una comparación con los resultados del presente trabajo. En otro estudio realizado por Ahangarpour et al., 2018, utilizaron ratones NMRI como modelo experimental expuestos a arsénico y observaron aumento en las concentraciones de leptina y adiponectina sérica, este efecto a su vez se vio potenciado con la adición de dieta alta en grasa, lo cual también es contrario a los resultados encontrados en este estudio. El trabajo aquí presentado se realizó en un modelo de adipocitos



in vitro, en el cual no existe influencia de los otros tipos celulares que componen el tejido adiposo, como por ejemplo macrófagos, ni influencia sistémica sobre las síntesis y secreción de leptina y adiponectina. En particular para la leptina, la respuesta del hipotálamo a la leptina genera regulación sobre la cantidad de leptina secretada, como en el caso de la resistencia a la leptina. En vista de que todos los resultados previamente publicados han sido evaluados en modelos *in vivo*, podría ser esta la razón por la cual los hallazgos son contrarios. Sin embargo, la disminución en la secreción de leptina generada por exposición a As generaría falta de saciedad y esto podría desencadenar aumento en el consumo de energía que llevara a la obesidad.

Así mismo, el As inhibe la diferenciación de adipocitos del estroma vascular de ratón, derivadas del tejido adiposo humano y de células 3T3-L1, a dosis de 1 μM de As (Y. Hou et al., 2013). Dado que los preadipocitos no secretan leptina (Mitchell et al., 1997), la falta de diferenciación por el As puede explicar los resultados encontrados en este trabajo y a la disminución en la expresión y secreción de leptina en adipocitos expuestos a As en el esquema de diferenciación. Sin embargo, para el esquema de maduración, la disminución en la síntesis y secreción de leptina por As respondería a otro mecanismo.

El receptor nuclear PPAR γ es un corregulador positivo en la expresión de C/EBP α el cual es uno de los factores de transcripción para leptina (Lowe, O'Rahilly, & Rochford, 2011) y se sabe que el As disminuye las concentraciones de PPAR γ ejerciendo su acción a través de los receptores de endotelina A acoplados a proteínas G (ENDRA) (Klei et al., 2013), por lo tanto, podría disminuir la expresión de C/EBP α y esto afectar sus blancos transcripcionales, como el gen de leptina (Figura 10B). Sin embargo, para este estudio no se evaluó la expresión de PPAR γ y C/EBP α .

La disminución de ARN mensajero de leptina por As también pudiera deberse a metilaciones en el ADN, ya que la exposición a arsénico en humanos induce cambios epigenéticos, particularmente metilaciones en regiones promotoras y en sitios de unión a factores de transcripción (Argos, 2015). Adicionalmente, la línea celular 3T3-L1 tiene metilaciones en las islas CpG del promotor de leptina, generando una expresión disminuida en comparación con el tejido adiposo blanco epididimal y subcutáneo de ratón (Kuroda et al., 2016). De tal forma que las células 3T3-L1 podrían ser susceptibles a los efectos epigenéticos del arsénico (Figura 10B). Con la posible disminución del factor de transcripción y la metilación del ADN, es posible que ambos estén influyendo en la disminución de la transcripción del mensajero de leptina (Figura 10A).



Cuando las células son expuestas a Pa, se puede observar descenso en las concentraciones de leptina en los tres diferentes niveles, en la transcripción, la traducción y la secreción. La disminución de la proteína secretada concuerda con lo encontrado por Cammisotto et al., 2005 y Shintani et al., 2000 donde observan disminución dosis dependiente en la secreción de leptina en cultivos primarios de adipocitos.

El Pa y el As generan estrés oxidante del retículo endoplásmico, lo cual libera a la proteína homóloga de C/EBP, mejor conocida como CHOP (Marwarha, Claycombe, Schommer, Collins, & Ghribi, 2016). Esta proteína, específicamente CHOP10, inhibe las concentraciones y/o la actividad de unión al DNA de C/EBP β y/o δ , que son reguladores de la transcripción de C/EBP α y PPAR γ . De tal forma que CHOP10 evita de manera indirecta la transcripción de C/EBP α y PPAR γ , los cuales son los factores de transcripción de leptina y adiponectina, respectivamente (Frith, J and Genever, 2008). Por lo tanto, la disminución en las concentraciones de leptina y adiponectina por el Pa, y el arsénico podría estar dada por la disminución de sus factores de transcripción (Figura 10B).

Debido a que no se observó ningún cambio en la abundancia de leptina intracelular en el esquema de diferenciación con el As, esto pudiera deberse a que la proteína que se alcanza a sintetizar no se está secretando adecuadamente y por lo tanto se queda atrapada dentro de la célula (Figura 10A).

La principal función de la leptina en los mamíferos es la regulación del apetito a nivel neuronal. Cuando esta hormona presenta disminución sérica, se genera aumento en el consumo de alimento y al contrario, cuando aumenta se suprime el consumo (Flier & Maratos-Flier, 2017). Esto se puede observar en modelos animales mutantes como los ratones db/db y ob/ob, en los cuales los receptores y la producción de leptina respectivamente son deficientes, y por consiguiente, el animal tiende a ser obeso y no presenta saciedad (Barrett, Mercer, & Morgan, 2016) Por otra parte, cuando hay aumento exacerbado en la ingesta de alimento y el tejido adiposo aumenta de tamaño, se produce hiperleptinemia que provoca resistencia a la leptina a nivel de sistema nervioso central, debido a interferencias en la señalización de los receptores o a disminución del paso de la proteína a través de la barrera hematoencefálica (Farr, Gavrieli, & Mantzoros, 2015). Los resultados de este trabajo muestran que el As y el Pa disminuyen la secreción de leptina (Figura 10A). En caso de que este fenómeno también ocurriera en animales, podría inicialmente generar la supresión de la saciedad, promoviendo el aumento en el consumo de alimento y por consiguiente el aumento del tejido adiposo, que más adelante desarrollaría resistencia a la leptina.



Cuando las células son expuestas a As, la abundancia de adiponectina a nivel de ARNm, de proteína intracelular y de la proteína secretada, disminuyen con respecto a la condición control, en ambos esquemas de tratamiento (Figura 10A). Este dato concuerda con lo reportado por Klei et al., 2013 y Garciafigueroa et al., 2013 donde observan disminución en la proteína intracelular y en la expresión génica, tanto de adiponectina como de su factor de transcripción (PPAR γ) por As a través de los receptores ENDRA. Por lo tanto, es probable que la disminución en la adiponectina observada en este estudio sea debido a la disminución de su factor de transcripción a través del mecanismo antes mencionado (Figura 10B). Este efecto resultó más marcado cuando las células se expusieron desde el inicio de su diferenciación, donde la expresión de PPAR γ es fundamental para la diferenciación del adipocito y por ende para la producción de adiponectina (Lowe et al., 2011) (Figura 10A).

En el caso de la exposición al Pa, la adiponectina intracelular y el mensajero, no mostraron cambio alguno en ninguno de los dos esquemas de tratamiento (Figura 10A), contrario a lo encontrado por Bueno et al. los cuales reportan la disminución del mensajero de adiponectina (Bueno et al., 2008; Karki et al., 2011). Sin embargo, en dicho estudio se utilizan concentraciones de Pa superiores a las fisiológicas (300 y 500 μ M) que difieren por mucho a las utilizadas en este trabajo. Por otro lado, solo en el esquema de diferenciación, las concentraciones de adiponectina total secretadas disminuyeron significativamente con respecto al control, tal como lo observó Nguyen et al., 2005 donde el tratamiento con ácidos grasos libres disminuye la secreción de esta adipocina sin modificar el mensajero o la proteína intracelular. Esto es debido a que el Pa promueve a manera dosis dependiente, la degradación de la adiponectina vía lisosomal a través de la sortilina, que es una proteína citoplasmática de transporte (Karki et al., 2011) (Figura 10B).

Antes de que la adiponectina pueda ser secretada, sufre una serie de modificaciones post-traduccionales donde la proteína se multimeriza generando proteínas de diferentes pesos moleculares, las cuales tendrán mayor afinidad por los receptores y por lo tanto mayor acción fisiológica (Magkos & Sidossis, 2007). La multimerización de la adiponectina se debe a la formación de enlaces disulfuro realizada por la proteína DsbA-L que promueve la unión de cisteínas, principalmente la 39 en humanos y la 36 en ratones. Otros aminoácidos que también se han visto involucrados en la multimerización son el triptófano 42 y una serie de lisinas (65, 68, 77 y 101). Adicionalmente, la hidroxilación y la glicosilación de la proteína son igual de importantes para este proceso (Liu & Liu, 2014a).



Cuando las células son expuestas a As durante 11 días desde el inicio de su diferenciación, se puede observar una clara disminución en las concentraciones de los tres multímeros de adiponectina, lo cual es contundente con la gran disminución de la adiponectina total (Figura 10A). Este hallazgo pudiera explicarse por disminución de su factor de transcripción PPAR γ y reflejarse en la disminución en la transcripción de adiponectina (Garciafigueroa et al., 2013; Klei et al., 2013) (Figura 10B).

También se sabe que el As tiene alta afinidad por los puentes disulfuro (Hughes, Beck, Chen, Lewis, & Thomas, 2011), lo que podría estar evitando la multimerización de la proteína, sin embargo, esto ocasionaría aumento en la abundancia de adiponectina intracelular, cosa que no sucede.

El Pa produce estrés del retículo endoplásmico, y este proceso se sabe que disminuye las concentraciones de DsbA-L, la cual es una proteína que propicia la multimerización de la adiponectina (Figura 10B). Al haber disminución de esta proteína, la adiponectina no es capaz de multimerizarse adecuadamente, disminuyendo en particular la adiponectina HMW (Liu et al., 2015). Por el contrario, en los resultados de este proyecto se observa que el Pa en el esquema de diferenciación genera disminución con respecto al control de la adiponectina LMW y aumento en las concentraciones de adiponectina HMW (Figura 10A). Esto nos indica que las concentraciones de adiponectina total se mantienen debido al intercambio en la proporción de dichos multímeros y por lo tanto no se observan cambios significativos en la concentración de adiponectina total. Cuando la exposición a ambos compuestos fue por 72 horas, solo ocurrió disminución significativa en las concentraciones de adiponectina MMW (Figura 10A), mostrando tendencia similar a la antes mencionada, es decir, la concentración de adiponectina MMW disminuye, pero la de adiponectina HMW y LMW aumentan, por lo que la proporción de adiponectina total se mantiene.

Se sabe que la adiponectina tiene varias acciones en el organismo, unas de ellas son aumentar la sensibilidad a la insulina y promover la oxidación de los ácidos grasos (Liu & Liu, 2014b). Los multímeros de adiponectina como el HMW y el LMW presentan mayor actividad metabólica. La adiponectina HMW se piensa que es la forma mas activa en tejidos periféricos, como el hígado y el músculo, mientras que la LMW, que se encuentra principalmente en el fluido cerebro espinal, juega un papel importante en el metabolismo de la glucosa, en donde bajos niveles de LMW se asocian con diabetes (Goto et al., 2014).

Al combinar los tratamientos de Pa y As esperábamos que los efectos fueran aditivos para adiponectina y sin cambios para leptina. Sin embargo, lo que observamos fue que el efecto del



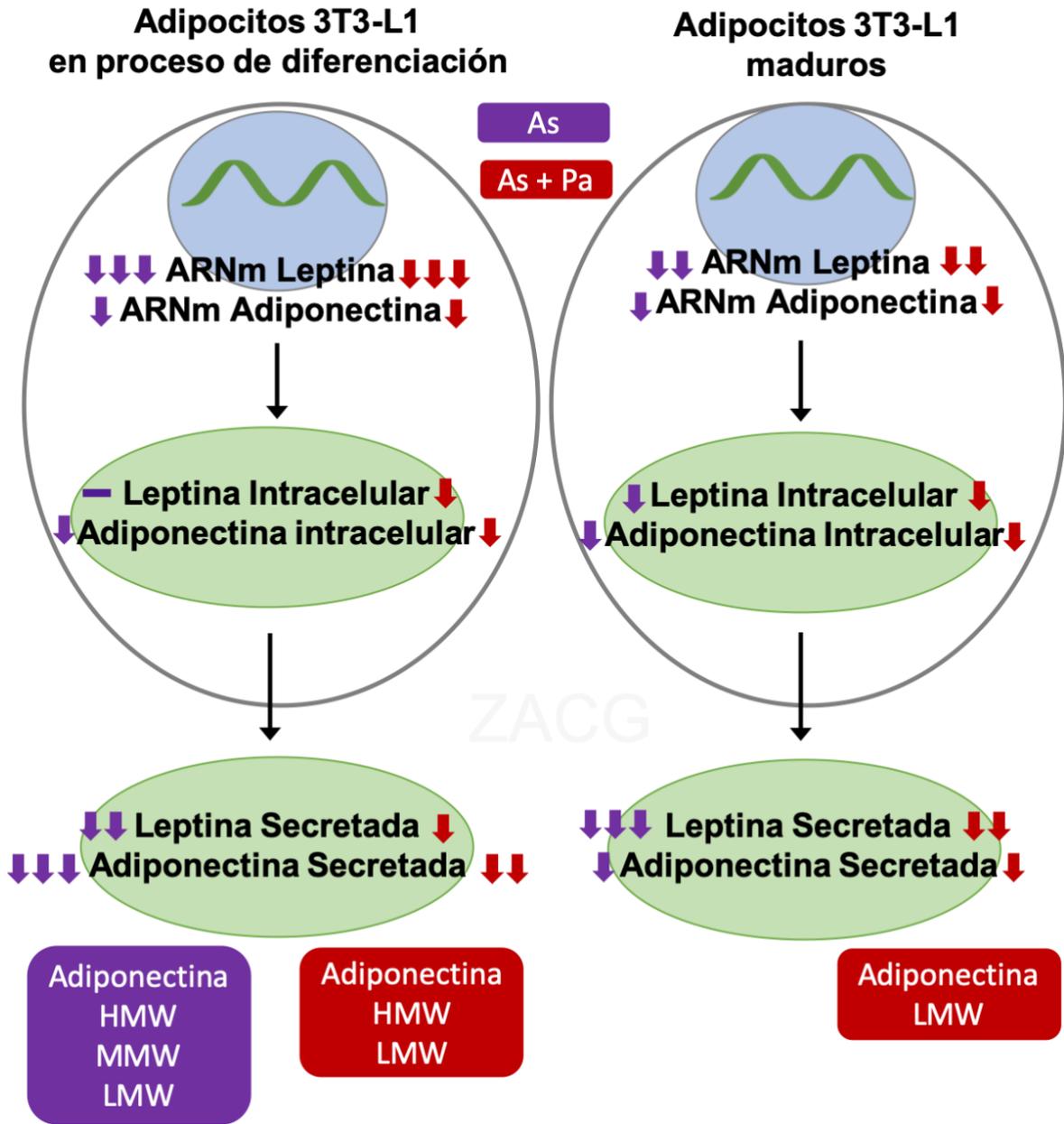
arsénico predominó sobre el efecto del palmítico en el esquema de diferenciación, sobre la disminución del mensajero de leptina y la proteína intracelular. Sin embargo, en el esquema de maduración, el As exacerbó el efecto del Pa sobre la disminución en la secreción de leptina. Para el caso de la adiponectina, en el esquema de diferenciación el As exacerbó la disminución en la secreción de esta adipocina por el palmítico, especialmente los multímeros HMW y LMW cuando se combinaron ambos tratamientos. Mientras que el efecto de disminución del As predominó sobre los efectos del palmítico solamente sobre el mensajero y la proteína intracelular de adiponectina de dicho esquema (Figura 10A).

Cuando las células fueron expuestas al tratamiento combinado de Pa y As por 72 h en el esquema de maduración, ocurrió un predominio del efecto del As sobre el del Pa de sodio sobre la disminución del mensajero, la proteína intracelular y la secreción de adiponectina, particularmente del multímero MMW (Figura 10A). Una razón por la cual en el tratamiento combinado el efecto del As predominó sobre el efecto del Pa o lo exacerbó, pudiera ser debido al cambio en la actividad de los receptores ENDRA. Como se mencionó anteriormente, el As puede ejercer su acción a través de los receptores ENDRA. Estos receptores requieren de la modificación post-traduccional de palmitoilación en sitios específicos para tener una función adecuada (Horstmeyer, Cramer, Sauer, Müller-Esterl, & Schroeder, 1996) (Figura 10B). De tal forma que, es probable que el aumento en las concentraciones de Pa esté teniendo cierta influencia en ello. Adicionalmente, el As puede ingresar a la célula a través de la acuaporina 9, la cual se expresa en adipocitos (Shinkai, Sumi, Toyama, Kaji, & Kumagai, 2009), favoreciendo su disponibilidad intracelular y promoviendo otro mecanismo de acción que pudiera explicar sus efectos sobresalientes con respecto al Pa (Figura 10B).

El presente trabajo se enfocó en estudiar los efectos en la funcionalidad endocrina del tejido adiposo blanco, especialmente en la alteración de la síntesis y secreción de leptina y adiponectina, la cual se sabe que es una de las principales alteraciones en el desarrollo de la obesidad. Este tipo de estudio aporta conocimiento nuevo sobre la interacción de diferentes tipos de factores ambientales en relación con la etiología de la obesidad. Las dietas altas en ácidos grasos saturados son el factor de riesgo más estudiado y reconocido para el desarrollo de la obesidad. Por su parte, la exposición a concentraciones de arsénico por arriba de la norma internacional ($>10 \mu\text{g/L}$), ocurren en un gran número de personas (>200 millones)(Quansah et al., 2015; World Health Organization, 2011). De tal forma que conocer los efectos del arsénico en presencia de ácidos grasos saturados, ayuda a entender el proceso de desarrollo de la obesidad y aporta herramientas para su prevención.



A



B

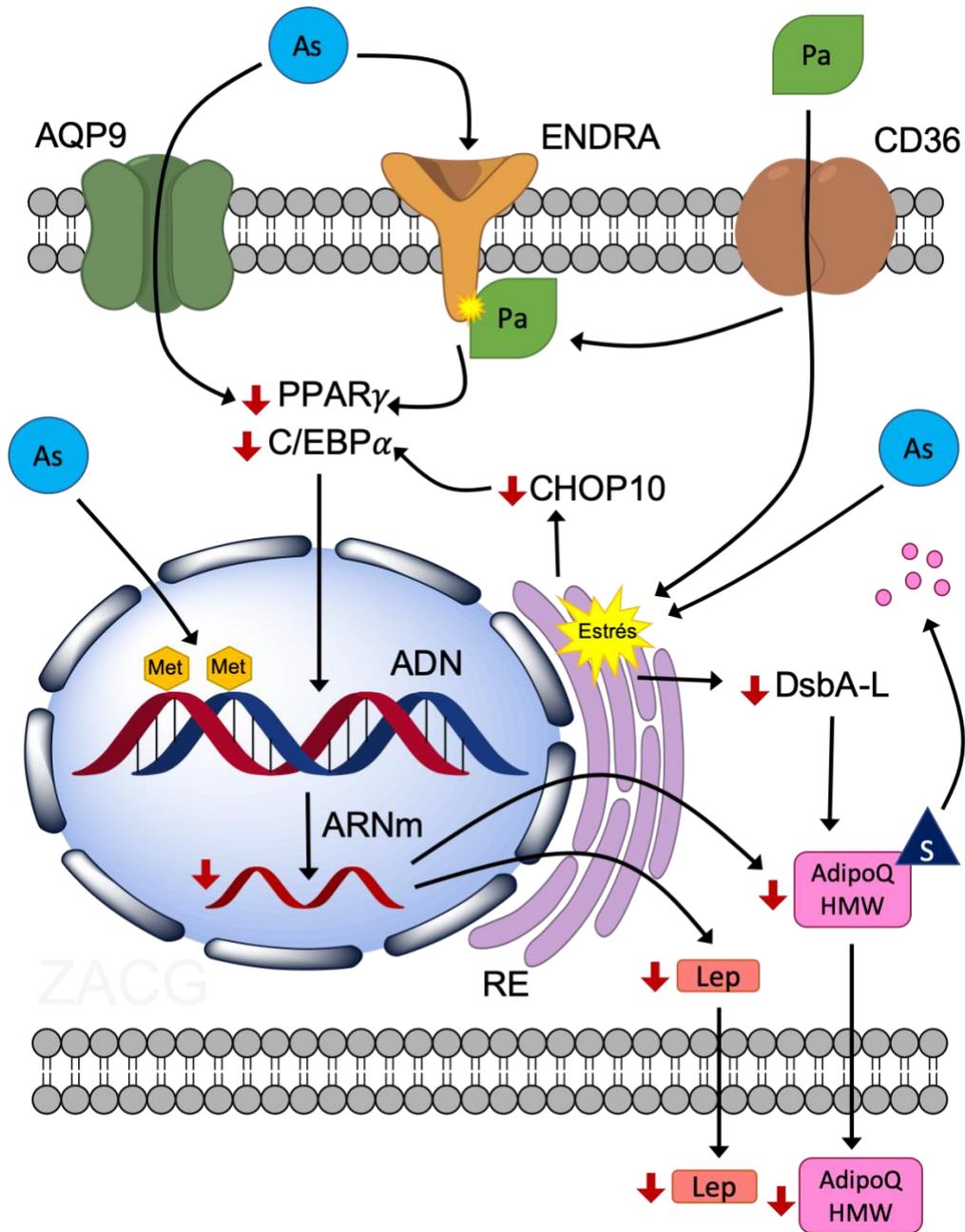


Figura 10. Resumen de resultados obtenidos (A) y probables mecanismo de acción del As y el Pa (B) sobre la síntesis y secreción de leptina y adiponectina en adipocitos.

Arsénito (As), palmitato (Pa), receptor de endotelina (ENDRA), acuaporina 9 (AQP9), receptor para ácidos grasos de cadena larga (CD36), factores de transcripción (PPAR γ y C/EBP α), proteína homóloga de C/EBP (estrés del retículo) (CHOP10), metilación (Met), ácido desoxiribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), retículo endoplásmico (RE), proteína de multimerización de adiponectina (DsbA-L), sortilina (S), leptina (Lep) y adiponectina (AdipoQ).

11. CONCLUSIONES

- El arsenito de sodio a concentración de 1 μM disminuye la secreción de leptina en adipocitos 3T3-L1, siendo mayor el efecto en adipocitos maduros.
- En el tratamiento combinado de palmitato y arsenito, el efecto del arsenito predominó sobre el efecto del palmitato en la disminución de la síntesis de leptina y exacerbó su secreción en ambos esquemas de exposición.
- El arsenito de sodio a concentración de 1 μM disminuye la secreción de adiponectina en adipocitos 3T3-L1, siendo mayor el efecto cuando la exposición ocurre desde la diferenciación celular, en el cual la secreción de los tres multímeros se reduce.
- En el tratamiento combinado de palmitato y arsenito, el efecto del arsenito predominó sobre el efecto del palmitato en la disminución de la síntesis de adiponectina. Mientras que, en la secreción de adiponectina, el efecto del arsenito exacerbó el efecto del palmitato solamente en el esquema de diferenciación, particularmente sobre los multímeros HMW y LMW; y en el esquema de maduración, el efecto del arsenito fue de predominio, especialmente para la disminución de la adiponectina MMW.
- La disminución en la secreción de leptina y adiponectina por arsenito de sodio y al combinarse con palmitato de sodio, se debe a un déficit en su síntesis.
- La magnitud del efecto del arsenito, del palmitato, y de la combinación de ambos, es dependiente del estadio celular en el que ocurra la exposición. En particular, los efectos para la leptina son mayores en adipocitos maduros y para adiponectina en adipocitos en proceso de diferenciación.



12. PERSPECTIVAS

- Con el fin de entender a mayor profundidad el mecanismo de acción por el cual el arsenito de sodio solo o en combinación con el palmitato, disminuye la expresión génica de leptina y adiponectina, sería recomendable evaluar la expresión de sus factores de transcripción, tales como PPAR γ y C/EBP α .
- Así mismo, sería ideal una evaluación profunda para conocer el mecanismo de acción del arsenito de sodio solo o en combinación con el palmitato sobre la cascada de señalización que afecta finalmente la transcripción de ambas adipocinas.
- Sería igualmente importante estudiar el mecanismo por el cual el arsenito altera el proceso de multimerización de la adiponectina, particularmente sobre DsAb-L
- En cuanto al efecto del palmitato, se podría analizar la palmitoilación del receptor ENDRA, con el fin de determinar si el efecto del arsenito predominó sobre el efecto del palmitato o lo exacerbó, mediante este mecanismo



13. REFERENCIAS

1. Ahangarpour, A., Alboghobeish, S., Rezaei, M., Khodayar, M. J., Oroojan, A. A., & Zainvand, M. (2018). Evaluation of diabetogenic mechanism of high fat diet in combination with arsenic exposure in male mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 17(1), 164–183.
2. Ahangarpour, A., Alboghobeish, S., Samimi, A., Afshari, G., Oroojan, A. A., & Zeidooni, L. (2018). Effects of combined exposure to chronic high-fat diet and arsenic on thyroid function and lipid profile in male mouse. *Biological Trace Element Research*, 182(1), 37–48. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1068-1>
3. Ahmed, S., Mahabbat-e Khoda, S., Rekha, R. S., Gardner, R. M., Ameer, S. S., Moore, S., ... Raqib, R. (2010). Arsenic-Associated Oxidative Stress, Inflammation, and Immune Disruption in Human Placenta and Cord Blood. *Environmental Health Perspectives*, 119(2), 258–264. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002086>
4. Antuna-Puente, B., Fève, B., Fellahi, S., & Bastard, J. P. (2008). Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab*, 34(1262-3636 (Print)), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2007.09.004>
5. Argos, M. (2015). Arsenic Exposure and Epigenetic Alterations: Recent Findings Based on the Illumina 450K DNA Methylation Array. *Current Environmental Health Reports*, 2(2), 137–144. <https://doi.org/10.1007/s40572-015-0052-1>
6. Barrett, P., Mercer, J. G., & Morgan, P. J. (2016). Preclinical models for obesity research. *Disease Models & Mechanisms*, 9(11), 1245–1255. <https://doi.org/10.1242/dmm.026443>
7. Boyle, J., Nelson, D., & Cox, M. (2005). *Principles of biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology Education* (Vol. 33).
8. Bray, G. A., & Bouchard, C. (2014). *Handbook of obesity. Volume 1, Epidemiology, etiology, and physiopathology*. Retrieved from <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Obesity----Volume-1-Epidemiology->



Etiology-and-Physiopathology/Bray-Bouchard/p/book/9781842145562

9. Bueno, A. A., Oyama, L. M., De Oliveira, C., Pisani, L. P., Ribeiro, E. B., Silveira, V. L. F., & Oller Do Nascimento, C. M. (2008). Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose tissue. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 455(4), 701–709. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0330-3>
10. 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>
11. Cammisotto, P. G., Gélinas, Y., Deshaies, Y., & Bukowiecki, L. J. (2005). Regulation of leptin secretion from white adipocytes by insulin, glycolytic substrates, and amino acids. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 289(1), E166–E171. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00602.2004>
12. Caron, A., Lee, S., Elmquist, J. K., & Gautron, L. (2018). Leptin and brain – adipose crosstalks. *Nature Publishing Group*, 19(3), 153–165. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.7>
13. Dani, C., & Billon, N. (2012). Adipose Tissue Biology. *Adipose Tissue Biology*, 1–17. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0965-6>
14. Díaz-Villaseñor, A., Burns, A. L., Hiriart, M., Cebrián, M. E., & Ostrosky-Wegman, P. (2007). Arsenic-induced alteration in the expression of genes related to type 2 diabetes mellitus. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225(2), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.08.019>
15. Díaz-Villaseñor, A., Burns, A. L., Salazar, A. M., Sordo, M., Hiriart, M., Cebrián, M. E., & Ostrosky-Wegman, P. (2008). Arsenite reduces insulin secretion in rat pancreatic Beta-cells by decreasing the calcium-dependent calpain-10 proteolysis of SNAP-25. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231(3), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.05.018>
16. 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>
17. ENSANUT. (2016). Informe final de resultados Encuesta Nacional de Salud, 2016(Ensanut). Retrieved from http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/doctos_2016/ensanut_mc_2016-310oct.pdf
 18. Esteve Ràfols, M. (2014). Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinologia y Nutricion: Organo de La Sociedad Espanola de Endocrinologia y Nutricion*, 61(2), 100–112.
<https://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>
 19. Farr, O. M., Gavrieli, A., & Mantzoros, C. S. (2015). Leptin applications in 2015. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*, 22(5), 353–359.
<https://doi.org/10.1097/med.0000000000000184>
 20. Fernández-Real, J.-M., Vendrell, J., & Ricart, W. (2005). Circulating adiponectin and plasma fatty acid profile. *Clinical Chemistry*, 51(3), 603–609.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.041350>
 21. Fisman, E. Z., & Tenenbaum, A. (2014). Adiponectin: a manifold therapeutic target for metabolic syndrome, diabetes, and coronary disease? *Cardiovascular Diabetology*, 13(1), 103. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-103>
 22. Flier, J. S., & Maratos-Flier, E. (2017). Leptin's Physiologic Role: Does the Emperor of Energy Balance Have No Clothes? *Cell Metabolism*, 26(1), 24–26.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.013>
 23. Fonseca-Alaniz, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. C., & Lima, F. B. (2007). Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *Jornal de Pediatria*, 83(5 Suppl), S192–S203. <https://doi.org/10.2223/JPED.1709>
 24. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2019). FAOSTAT. Retrieved March 22, 2018, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
 25. Frith, J and Genever, P. (2008). Transcriptional Control of Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 35(Area 9), 216–227. <https://doi.org/10.1159/000127448s>
 26. 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>
27. Gossai, A., Lesseur, C., Farzan, S., Marsit, C., Karagas, M. R., & Gilbert-Diamond, D. (2015). Association between maternal urinary arsenic species and infant cord blood leptin levels in a New Hampshire Pregnancy Cohort. *Environmental Research*, 136, 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.005>
28. Goto, M., Goto, A., Morita, A., Deura, K., Sasaki, S., Aiba, N., ... Watanabe, S. (2014). Low-molecular-weight adiponectin and high-molecular-weight adiponectin levels in relation to diabetes. *Obesity*, 22(2), 401–407. <https://doi.org/10.1002/oby.20553>
29. Harris, R. B. (2000). Leptin--much more than a satiety signal. *Annual Review of Nutrition*, 20, 45–75. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.45>
30. Heindel, J. J., Blumberg, B., Cave, M., Machtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M. A., ... vom Saal, F. (2017). Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reproductive Toxicology*, 68, 3–33. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.10.001>
31. Heindel, J. J., Newbold, R., & Schug, T. T. (2015). Endocrine disruptors and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(11), 653–661. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.163>
32. 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. *Monaldi Archives for Chest Disease*, 88(1), 61–66. <https://doi.org/10.4081/monaldi.2018.903>
33. Herrera, E., Ramos de Castillo, M. del P. (María del P., Roca, P., & Viana, M. (2014). *Bioquímica básica : base molecular de los procesos fisiológicos*. Elsevier España. Retrieved from <https://www.laleo.com/bioquimica-basica-p-12015.html>
34. Horstmeyer, A., Cramer, H., Sauer, T., Müller-Esterl, W., & Schroeder, C. (1996). Palmitoylation of Endothelin Receptor A. *Journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20811–20819. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20811>



35. Hou, H., Yu, Y., Shen, Z., Liu, S., & Wu, B. (2017). Hepatic transcriptomic responses in mice exposed to arsenic and different fat diet. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(11), 10621–10629. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8743-9>
36. 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>
37. Hughes, M. F., Beck, B. D., Chen, Y., Lewis, A. S., & Thomas, D. J. (2011). Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicological Sciences*, 123(2), 305–332. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr184>
38. Innis, S. M. (2016). Palmitic Acid in Early Human Development. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(12), 1952–1959. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1018045>
39. Karki, S., Chakrabarti, P., Huang, G., Wang, H., Farmer, S. R., & Kandror, K. V. (2011). The multi-level action of fatty acids on adiponectin production by fat cells. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028146>
40. 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>
41. Kuroda, M., Tominaga, A., Nakagawa, K., Nishiguchi, M., Sebe, M., Miyatake, Y., ... Sakaue, H. (2016). DNA methylation suppresses leptin gene in 3T3-L1 adipocytes. *PLoS ONE*, 11(8), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160532>
42. Landrigan, P. J. (2017). The power of environmental protection: arsenic in drinking water. *The Lancet Public Health*, 2(11), e488–e489. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(17\)30197-4](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(17)30197-4)
43. Lee, Y.-H., Mottillo, E. P., & Granneman, J. G. (2014). Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 358–369.



<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.011>

44. Li, F. Y. L., Cheng, K. K. Y., Lam, K. S. L., Vanhoutte, P. M., & Xu, A. (2011). Cross-talk between adipose tissue and vasculature: Role of adiponectin. *Acta Physiologica*, 203(1), 167–180. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02216.x>
45. Liu, M., Chen, H., Wei, L., Hu, D., Dong, K., Jia, W., ... Liu, F. (2015). Endoplasmic reticulum (ER) localization is critical for DsbA-L protein to suppress ER stress and adiponectin down-regulation in adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(16), 10143–10148. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.645416>
46. Liu, M., & Liu, F. (2014a). Regulation of adiponectin multimerization, signaling and function. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.06.003>
47. Liu, M., & Liu, F. (2014b). Regulation of adiponectin multimerization, signaling and function. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 28(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.06.0033>
48. Lowe, C. E., O’Rahilly, S., & Rochford, J. J. (2011). Adipogenesis at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 16), 2681–2686. <https://doi.org/10.1242/jcs.079699>
49. Magkos, F., & Sidossis, L. S. (2007). Recent advances in the measurement of adiponectin isoform distribution. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 10(5), 571–575. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3282bf6ea8>
50. Marshall, T. A. (2011). Dietary Guidelines for Americans, 2010: an update. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 142(6), 654–656. [https://doi.org/10.1016/S0300-7073\(05\)71075-6](https://doi.org/10.1016/S0300-7073(05)71075-6)
51. Martin, S. S., Qasim, A., & Reilly, M. P. (2008). Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 52(15), 1201–1210. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.05.060>
52. Marwarha, G., Claycombe, K., Schommer, J., Collins, D., & Ghribi, O. (2016). Palmitate-induced Endoplasmic Reticulum stress and subsequent C/EBP α Homologous Protein activation attenuates leptin and Insulin-like growth factor



- 1 expression in the brain. *Cellular Signalling*, 28(11), 1789–1805.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.08.012>
53. Maull, 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>
54. Maymó, J. L., Pérez Pérez, A., Gambino, Y., Calvo, J. C., Sánchez-Margalet, V., & Varone, C. L. (2011). Review: Leptin gene expression in the placenta - Regulation of a key hormone in trophoblast proliferation and survival. *Placenta*, 32(SUPPL. 2), S146–S153.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.01.004>
55. Mba, O. I., Dumont, M.-J., & Ngadi, M. (2015). Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry - A review. *Food Bioscience*, 10, 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.01.003>
56. McClintock, T. R., Chen, Y., Bundschuh, J., Oliver, J. T., Navoni, J., Olmos, V., ... Parvez, F. (2012). Arsenic exposure in Latin America: Biomarkers, risk assessments and related health effects. *Science of the Total Environment*, 429, 76–91. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.051>
57. Mitchell, S. E., Rees, W. D., Hardie, L. J., Hoggard, N., Tadayyon, M., Arch, J. R. s., & Trayhurn, P. (1997). Ob Gene Expression and Secretion of Leptin Following Differentiation of Rat Preadipocytes To Adipocytes in Primary Culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 230(2), 360–364.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.5964>
58. Mukherjee, A., Sengupta, M. K., Hossain, M. A., Ahamed, S., Das, B., Nayak, B., ... Chakraborti, D. (2006). Arsenic contamination in groundwater: A global perspective with emphasis on the Asian scenario. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 24(2), 142–163.
59. Nadal, A., Quesada, I., Tudurí, E., Nogueiras, R., & Alonso-Magdalena, P. (2017). Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(9), 536–546.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.51>



60. National Research Council (U.S.). Subcommittee on Arsenic in Drinking Water. (1999). Arsenic in drinking water. Retrieved August 16, 2018, from <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>
61. Newgard, C. B., An, J., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Lien, L. F., ... Svetkey, L. P. (2009). A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, 9(4), 311–326. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.002>
62. Nguyen, M. T. A., Satoh, H., Favellyukis, S., Babendure, J. L., Imamura, T., Sbodio, J. I., ... Olefsky, J. M. (2005). JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35361–35371. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504611200>
63. 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 & Diabetes*, 5(11), e184. <https://doi.org/10.1038/nutd.2015.34>
64. Palu', G., Valisena, S., Barcellona, M. L., Masotti, L., & Meloni, G. A. (1987). DAPI - pUC8 complex: A tool to investigate biological effects of nucleic acid-drug interaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 145(1), 40–45. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(87\)91284-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(87)91284-8)
65. Panuganti, K. K., & Lenehan, C. P. (2017). *Obesity. StatPearls*. StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29083734>
66. Park, A. (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 6(1), 33. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i1.33>
67. Paul, D. S., Harmon, A. W., Devesa, V., Thomas, D. J., & Stýblo, M. (2007). Molecular mechanisms of the diabetogenic effects of arsenic inhibition of insulin signaling by arsenite and methylarsonous acid. *Environmental Health Perspectives*, 115(5), 734–742. <https://doi.org/10.1289/ehp.9867>



68. Paul, D. S., Walton, F. S., Saunders, R. J., & Styblo, 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>
69. Pfaffl, M. (2002). 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>
70. Pfaffl, M., 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), 509–515. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15127793>
71. 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: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, *123*(5), 412–421. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307894>
72. Regnier, S. M., & Sargis, R. M. (2014). Adipocytes under assault: Environmental disruption of adipose physiology. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1842*(3), 520–533. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.028>
73. Richards, A. A., Stephens, T., Charlton, H. K., Jones, A., Macdonald, G. A., Prins, J. B., & Whitehead, J. P. (2006). Adiponectin Multimerization Is Dependent on Conserved Lysines in the Collagenous Domain: Evidence for Regulation of Multimerization by Alterations in Posttranslational Modifications. *Molecular Endocrinology*, *20*(7), 1673–1687. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0390>
74. Rodriguez, K. F., Ungewitter, E. K., Crespo-Mejias, Y., Liu, C., Nicol, B., Kissling, G. E., & Yao, H. H. C. (2016). Effects of in utero exposure to arsenic during the second half of gestation on reproductive end points and metabolic parameters in female CD-1 mice. *Environmental Health Perspectives*, *124*(3), 336–343. <https://doi.org/10.1289/ehp.1509703>

75. Ronti, T., Lupattelli, G., & Mannarino, E. (2006). The endocrine function of adipose tissue: An update. *Clinical Endocrinology*, 64(4), 355–365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02474.x>
76. Sargis, R. M., Heindel, J. J., & Padmanabhan, V. (2019). Interventions to Address Environmental Metabolism-Disrupting Chemicals: Changing the Narrative to Empower Action to Restore Metabolic Health. *Frontiers in Endocrinology*, 10(February). <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00033>
77. Scully, T. (2014). Public health: Society at large. *Nature*, 508(7496), 2014–2015. <https://doi.org/10.1038/508S50a>
78. Secretaría de Salud. NOM-127-SSA1-1994, salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización., 2000 Diario Oficial de la Federación § (2000). Retrieved from <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m127ssa14.html>
79. Shehzad, A., Iqbal, W., Shehzad, O., & Lee, Y. S. (2012). Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones (Athens, Greece)*, 11(1), 8–20. <https://doi.org/10.4161/epi.19547>
80. Shinkai, Y., Sumi, D., Toyama, T., Kaji, T., & Kumagai, Y. (2009). Role of aquaporin 9 in cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237(2), 232–236. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.014>
81. Shintani, M., Nishimura, H., Yonemitsu, S., Masuzaki, H., Ogawa, Y., Hosoda, K., ... Nakao, K. (2000). Downregulation of leptin by free fatty acids in rat adipocytes: effects of triacsin C, palmitate, and 2-bromopalmitate. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 49(3), 326–330. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(00\)90154-9](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(00)90154-9)
82. Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112, 247–270. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.009>
83. Song, X., Li, Y., Liu, J., Ji, X., Zhao, L., & Wei, Y. (2017). Changes in Serum

- Adiponectin in Mice Chronically Exposed to Inorganic Arsenic in Drinking Water. *Biological Trace Element Research*, 179(1), 140–147. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-0950-1>
84. STATISTA. (2017). • Vegetable oils: global consumption, 2016/17 | Statistic. Retrieved November 6, 2017, from <https://www.statista.com/statistics/263937/vegetable-oils-global-consumption/>
85. Steinberg, G. R., & Dyck, D. J. (2000). Development of leptin resistance in rat soleus muscle in response to high-fat diets. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 279(6), E1374-82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11093926>
86. Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. *Physiological Reviews*, 93(1), 1–21. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2012>
87. 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/10.1289/ehp.00108847>
88. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service. (2016). National Nutrient Database for Standard Reference Release 28. Retrieved from <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/661?n1=%7BQv%3D1%7D&fgcd=&man=&facet=&count=&max=50&sort=default&qlookup=palm+oil&offset=&format=Full&new=&measureby=&Qv=1>
89. Veiga-Lopez, A., Pu, Y., Gingrich, J., & Padmanabhan, V. (2018). Obesogenic Endocrine Disrupting Chemicals: Identifying Knowledge Gaps. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29(9), 607–625. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.06.003>
90. Waki, H., & Tontonoz, P. (2007). Endocrine Functions of Adipose Tissue. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2, 31–56. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.2.010506.091859>



91. Walton, F. S., Harmon, A. W., Paul, D. S., Drobná, Z., Patel, Y. M., & Styblo, M. (2004). Inhibition of insulin-dependent glucose uptake by trivalent arsenicals: Possible mechanism of arsenic-induced diabetes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198(3), 424–433. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.10.026>
92. Wang, Y., Lam, K. S. L., Chan, L., Kok, W. C., Lam, J. B. B., Lam, M. C., ... Xu, A. (2006). Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. *Journal of Biological Chemistry*, 281(24), 16391–16400. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513907200>
93. WHO/FAO. (2002). Food energy – methods of analysis aWHO/FAO. (2002). Food energy – methods of analysis and conversion. Fao Food and Nutrition Paper, 93. <http://doi.org/ISSN 0254-4725nd conversion>. *Fao Food and Nutrition Paper*, 93. <https://doi.org/ISSN 0254-4725>
94. World Health Organization. (2011). Arsenic in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Retrieved November 30, 2016, from http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/arsenic.pdf
95. World Health Organization. (2015). WHO; Overweight and Obesity. Retrieved November 28, 2016, from http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/
96. World Health Organization. (2016). OMS | Obesidad y sobrepeso. Retrieved October 20, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
97. Wu, J., Liu, J., Waalkes, M. P., Cheng, M.-L., Li, L., Li, C.-X., & Yang, Q. (2008). High Dietary Fat Exacerbates Arsenic-Induced Liver Fibrosis in Mice. *Experimental Biology and Medicine*, 233(3), 377–384. <https://doi.org/10.3181/0710-rm-269>
98. Xu, B., & Xie, X. (2016). Neurotrophic factor control of satiety and body weight. *Nature Reviews. Neuroscience*, 17(5), 282–292. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.24>

