



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**T E S I S**

**“Regulación de la lipólisis por insulina en el  
tejido adiposo subcutáneo y visceral de ratones  
alimentados con dieta alta en grasa y expuestos  
a arsénico en el agua de bebida”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ARANZA ESPINOSA SOBERANIS**

**Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2022**





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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

**VOCAL:** TANIA GÓMEZ SIERRA

**SECRETARIO:** ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR

**1° SUPLENTE:** SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

**2° SUPLENTE:** SOFÍA MORÁN RAMOS

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO B-247

DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL,  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, SEDE EXTERNA.

**ASESORA DEL TEMA:** DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR

**SUSTENTANTE:** ESPINOSA SOBERANIS ARANZA

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>11</b>
1. Tejido adiposo .....	11
1.1 Tejido adiposo subcutáneo .....	12
1.2 Tejido adiposo visceral .....	12
2. Lipólisis .....	14
2.1 Definición .....	14
2.2 Vía de señalización de la lipólisis estimulada .....	15
2.3 Función de la perilipina y su fosforilación como activadores de la lipólisis estimulada .....	17
3. Efectos de la insulina en el tejido adiposo blanco .....	17
3.1 Vías de señalización del efecto anti lipolítico de la insulina durante el postprandio .....	18
3.2 Función de Akt y fosforilación de Akt como punto estratégico en la vía de la insulina .....	20
4. Disfunción del tejido adiposo por dieta alta en grasa .....	21
5. Panorama de la obesidad en el mundo y en México .....	23
6. Disruptores químicos del metabolismo .....	23
7. La contaminación del agua de bebida y alimentos por arsénico como problema mundial .....	24
8. Arsénico como factor de riesgo en el desarrollo de diabetes mellitus y obesidad .....	26
8.1 Diabetes mellitus .....	26
8.2 Obesidad .....	28
9. Efecto de la dieta alta en grasa en combinación con arsénico. ....	30
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>32</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>33</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>33</b>

<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
1. Modelo y diseño experimental .....	35
2. Extracción de proteína de tejido adiposo blanco .....	37
3. Cuantificación de proteína .....	37
4. Western blot .....	38
4.1 SDS-PAGE .....	38
4.2 Transferencia .....	39
4.3 Confirmación de transferencia por tinción con Ponceau-S .....	39
4.4 Bloqueo.....	39
4.5 Incubación de anticuerpo primario y secundario.....	39
4.6 Reacción de quimioluminiscencia .....	40
4.7 Tinción de la membrana con Azul de Coomassie como control de carga.....	40
5. Análisis de datos .....	40
5.1 Densitometría óptica y normalización de datos.....	40
5.2 Análisis estadístico .....	41
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
1. Estandarización de cantidad de anticuerpo y proteína para Western blot.....	42
2. Abundancia de la proteína perilipina-1 en los tejidos adiposos de los ratones con tratamiento .....	47
3. Abundancia de la proteína perilipina fosforilada en el residuo ser 522 en los tejidos adiposo de los ratones con tratamiento.....	49
4. Proporción de perilipina fosforilada (Ser522) respecto a la perilipina total en los tejidos adiposos de los ratones con tratamiento.....	51
5. Abundancia de la proteína Akt-1 en los tejidos adiposos de los ratones con tratamiento.....	53
6. Abundancia de la proteína Akt fosforilada en el residuo ser 473 en los tejidos adiposos de los ratones con tratamiento .....	55
7. Proporción de Akt fosforilada (ser 473) respecto a Akt total en los tejidos adiposos de los ratones con tratamiento.....	57
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>59</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>65</b>

<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>APÉNDICE A: REACTIVOS .....</b>	<b>77</b>
<b>APÉNDICE B: ANTICUERPOS .....</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representación esquemática de la vía de señalización de la lipólisis estimulada. .....	<b>16</b>
<b>Figura 2:</b> Serie de reacciones que constituyen la lipólisis.....	<b>17</b>
<b>Figura 3:</b> Representación esquemática de la vía de señalización del efecto anti lipolítico de la insulina.....	<b>20</b>
<b>Figura 4:</b> Metodología en diagrama de bloques.....	<b>34</b>
<b>Figura 5:</b> Diseño experimental gráfico.....	<b>36</b>
<b>Figura 6:</b> Preparación de muestras en pools por tejido.....	<b>38</b>
<b>Figura 7.</b> Estandarización de las condiciones para detectar perilipina total.....	<b>43</b>
<b>Figura 8.</b> Estandarización de las condiciones para detectar p-perilipina 522.....	<b>44</b>
<b>Figura 9.</b> Estandarización de las condiciones para detectar Akt total .....	<b>46</b>
<b>Figura 10.</b> Estandarización de las condiciones para detectar pAkt 473.....	<b>46</b>
<b>Figura 11.</b> Abundancia de la proteína perilipina-1 total.....	<b>48</b>
<b>Figura 12.</b> Abundancia de la proteína p-perilipina 522.....	<b>50</b>
<b>Figura 13.</b> Proporción fosforilada de p-perilipina 522 respecto a perilipina total. ....	<b>52</b>
<b>Figura 14.</b> Abundancia de la proteína Akt total .....	<b>54</b>
<b>Figura 15.</b> Abundancia de la proteína pAkt 473.....	<b>56</b>
<b>Figura 16.</b> Proporción fosforilada de pAkt 473 respecto a Akt total .....	<b>58</b>
<b>Figura 17:</b> Conclusión gráfica.....	<b>66</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Diferencias entre los tejidos adiposos visceral y subcutáneo.....	<b>14</b>
<b>Tabla 2:</b> Composición de las dietas.....	<b>35</b>
<b>Tabla 3:</b> Estandarización de concentración de anticuerpo primario para cada proteína evaluada en los tres tejidos. ....	<b>42</b>
<b>Tabla 4:</b> Estandarización de la cantidad de proteína evaluada en los tres tejidos .....	<b>42</b>
<b>Tabla 5:</b> Información comercial de los reactivos .....	<b>77</b>
<b>Tabla 6:</b> Información comercial de los anticuerpos .....	<b>78</b>

## ABREVIATURAS

<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>AG</b>	Ácido graso
<b>ADIPO-IR</b>	Índice de resistencia a la insulina en el tejido adiposo, del inglés Adipose tissue insulin resistance index
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>AMPK</b>	Cinasa activada por AMP, del inglés AMP-activated protein kinase
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza, del inglés Analysis of variance.
<b>AS160</b>	Sustrato de Akt de 160 kDa, del inglés Akt substrate of 160 kDa
<b>As<sup>III</sup></b>	Arsénico trivalente
<b>As<sup>V</sup></b>	Arsénico pentavalente
<b>ATGL</b>	Lipasa de triglicéridos del tejido adiposo, del inglés Adipose triglyceride lipase
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>C/EBP</b>	Proteína estimulante de unión a CCAAT
<b>CGI-58</b>	Gen comparativo de identificación 58, del inglés Comparative gene identification 58
<b>CH<sub>3</sub><sup>+</sup></b>	Grupo metilo
<b>CHOP</b>	Proteína homóloga potenciadora de la unión a CCAAT,
<b>DAG</b>	Dieta alta en grasa
<b>DAG-As</b>	Dieta alta en grasa con arsénico
<b>DC</b>	Dieta control
<b>DC-As</b>	Dieta control con arsénico
<b>DEQ</b>	Disruptor endocrino químico
<b>DG</b>	Diglicérido
<b>DMA<sup>III</sup></b>	Ácido dimetilarsinoso
<b>DMA<sup>V</sup></b>	Ácido dimetilarsínico
<b>DMT2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>DQM</b>	Disruptor químico del metabolismo

<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>G3P</b>	Glicerol-3-fosfato
<b>GLUT4</b>	Transportador de glucosa 4, del inglés Glucose transporter-4
<b>G<math>\alpha</math><sub>i</sub></b>	Proteína G con subunidad $\alpha$ inhibitoria
<b>G<math>\alpha</math><sub>s</sub></b>	Proteína G con subunidad $\alpha$ estimuladora
<b>HDL</b>	Colesterol de alta densidad, del inglés High density cholesterol
<b>HSL</b>	Lipasa sensible a la hormona, del inglés Hormone-sensitive lipase
<b>HOMA-IR</b>	Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina, del inglés homeostasis model assessment-estimated insulin resistance
<b>iAs</b>	Arsénico inorgánico
<b>iAs<sup>III</sup></b>	Arsenito
<b>iAs<sup>V</sup></b>	Arsenato
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IRS</b>	Sustrato del receptor de insulina, del inglés Insulin receptor substrate
<b>JNK</b>	Cinasa N-terminal c-Jun
<b>MG</b>	Monoglicérido
<b>MGL</b>	Lipasa de monoglicéridos, del inglés Monoglyceride lipase
<b>MMA<sup>III</sup></b>	Ácido monometilarsonoso
<b>MMA<sup>V</sup></b>	Ácido monometilarsonico
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear kappa B
<b>PDE</b>	Fosfodiesterasa 3, del inglés Phosphodiesterase-3
<b>PKD</b>	Proteínas cinasas dependientes de 3-fosfoinositol, del inglés 3-phosphoinositide-dependent protein kinase
<b>PEPCK</b>	Fosfoenol piruvato carboxicinasaa, del inglés Phosphoenolpyruvate carboxykinase
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol-3-cinasa, del inglés Phosphoinositide 3-kinase
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol difosfato, del inglés Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol trifosfato, del inglés Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate

<b>PKA</b>	Proteína cinasa A, del inglés Protein kinase A
<b>PP1</b>	Proteína fosfatasa 1, del inglés Protein phosphatase 1
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>RIPA</b>	Buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación
<b>SDS</b>	Duodecil sulfato de sodio
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
<b>-SH</b>	Grupo tiol
<b>SREBP-1c</b>	Proteína 1c de unión al elemento regulador del esterol
<b>TAE</b>	Tejido adiposo epididimal
<b>TAR</b>	Tejido adiposo retroperitoneal
<b>TAS</b>	Tejido adiposo subcutáneo
<b>TG</b>	Triglicérido
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>UCP-1</b>	Proteína desacoplante 1, del inglés Uncoupling protein 1

## RESUMEN

En la actualidad la disfunción del tejido adiposo blanco se reconoce dentro de los mecanismos novedosos que se relaciona con la etiología de la obesidad y la resistencia a la insulina. Por un lado, se sabe que las dietas hiperenergéticas son un factor de riesgo sobre la disfunción del tejido adiposo y obesidad. Sin embargo, la alimentación desbalanceada la mala alimentación también puede funcionar como un modulador negativo que, en combinación con diferentes disruptores químicos del metabolismo (DQM) a los que nos encontramos expuestos, son factores de riesgo externos que pueden incrementar el riesgo a padecer obesidad, diabetes mellitus tipo 2 o síndrome metabólico.

El arsénico es reconocido como un DQM, del cual actualmente se estima que 300 millones de personas a nivel mundial, incluido México, se encuentran expuestos por alimentos y agua para uso humano (bebida, uso doméstico o agua de riego para cultivos) contaminados de forma natural o por actividad industrial. El metabolismo del arsénico está bastante estudiado en órganos como hígado, riñón, cerebro, piel, sistema respiratorio, cardiovascular y reproductor; sin embargo, el estudio sobre tejido adiposo no se comprende completamente. Se conoce poco sobre el mecanismo de acción que ejerce sobre el metabolismo del tejido adiposo blanco, específicamente sobre la regulación de la lipólisis, y mucho menos en combinación con una dieta alta en grasa (DAG).

Al estudiar el metabolismo del tejido adiposo blanco por efecto de la DAG y el arsénico en nuestro laboratorio, se encontró que el índice de lipólisis disminuye por efecto de la DAG (39.1% kcal de grasa) y dicho efecto se exagera en los ratones que son expuestos a la DAG en conjunto a 100 µg/L de arsénico inorgánico en el agua de bebida. De manera contraria, la resistencia a la insulina específica de tejido adiposo, evaluada a través de metabolitos en suero, aumenta por efecto de la DAG y se incrementa en combinación con arsénico.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la regulación positiva de la lipólisis estimulada a través de la perilipina y la regulación negativa de la insulina a través de Akt en tejido adiposo blanco visceral (epididimal y retroperitoneal) y subcutáneo de ratones macho por efecto de una dieta alta en grasa (40 % kcal) en combinación de arsénico como DQM.

Los resultados obtenidos revelan que la combinación de DAG con arsénico disminuye ( $p < 0.05$ ) la regulación positiva de la lipólisis estimulada en el tejido adiposo retroperitoneal (visceral) evaluada a través de la proporción de activación por fosforilación de la perilipina. De igual forma, la DAG, el arsénico y la combinación de ambos aumentan ( $p < 0.05$ ) en igual grado la proporción de activación por fosforilación de Akt en el tejido adiposo epididimal (visceral), lo que sugiere un aumento en la regulación negativa al efecto anti lipolítico de la insulina en ayuno.

En conclusión, la regulación de la lipólisis estimulada por arsénico y DAG se altera en los tejidos adiposos viscerales de forma diferencial en cada uno de sus depósitos. El tejido retroperitoneal contribuye en mayor medida a la disminución de la lipólisis estimulada y el tejido epididimal contribuye al aumento de la resistencia a los efectos anti lipolíticos de la insulina.

La regulación positiva y negativa de la lipólisis estimulada por arsénico, DAG y/o su combinación, se altera de forma diferencial entre el tejido adiposo visceral y subcutáneo. Específicamente, dicha regulación es heterogénea en cada uno de los depósitos viscerales evaluados.

**Palabras clave:** lipólisis estimulada, perilipina, Akt, resistencia a insulina, arsénico, DAG.

## **ABSTRACT**

To our days, white adipose tissue dysfunction is known within the novel mechanisms related to the etiology of obesity and insulin resistance. High-caloric diets are risk factors for adipose tissue dysfunction and obesity, however, diet also works as negative modulator that in combination with different metabolic disruptor chemicals (MDC) to which we are exposed, are also external risk factors that may increase the risk for obesity, diabetes or metabolic syndrome.

Arsenic is known to be an MDC and it is currently estimated that 300 million people worldwide, including Mexico, are exposed through contaminated food and water (drinking, domestic use, irrigation of crops) contaminated naturally and by industrial activity. Arsenic metabolism is well studied in organs such as liver, kidneys, brain, skin, respiratory tract, cardiovascular and reproductive systems, however, the study on adipose tissue is not fully understood. Little is known about the mechanisms of action that arsenic exerts on white adipose tissue metabolism, specifically on lipolysis regulation, and much less in combination with a high-fat diet.

When studying white adipose tissue metabolism by the effect of high fat diet (HFD) and arsenic, previous data obtained in our laboratory demonstrated that the lipolysis index decreases by effect of HFD (39.1 % kcal of fat) and this effect is exacerbated in mice fed HFD together with 100 µg/L of arsenic exposure in drinking water. On the contrary, adipose tissue insulin resistance, evaluated through serum metabolites, increases by effect of the HFD and rises when is combined with arsenic.

The aim of this work was to study the positive regulation of stimulated lipolysis through perilipin and the negative regulation of insulin through Akt in white visceral (retroperitoneal and epididymal) and subcutaneous adipose tissues of male mice due to the effect of a HFD (40% kcal) in combination with arsenic as an MDC.

Results indicate that the combination of HFD with arsenic decreases ( $p < 0.05$ ) the positive regulation of stimulated lipolysis in retroperitoneal (visceral) adipose tissue evaluated by the rate of activated perilipin by phosphorylation. Similarly, HFD, arsenic and the combination of both increase ( $p < 0.05$ ) in an equal manner the rate of activated Akt by phosphorylation

in epididymal (visceral) adipose tissue, which suggests that there is an increase in the negative regulation to the anti-lipolytic effect of insulin during fasting.

In conclusion, the regulation of stimulated lipolysis by HFD and arsenic is differentially altered in the visceral adipose tissue and in each of its depots. The retroperitoneal adipose tissue contributes to a greater extent to the decrease of stimulated lipolysis and epididymal adipose tissue contributes to the increased resistance to the anti-lipolytic effects of insulin.

The positive and negative regulation of stimulated lipolysis by arsenic, HFD and/or its combination is also differentially altered between visceral and subcutaneous adipose tissues. Specifically, this regulation is heterogeneous in each of the visceral depots evaluated.

**Keywords:** stimulated lipolysis, perilipin, Akt, insulin resistance, arsenic, HFD.

## **ANTECEDENTES**

### **1. Tejido adiposo**

El tejido adiposo es un conjunto de diversas células que se compone aproximadamente en un 35-70% por adipocitos y el resto lo compone la fracción del estroma vascular (fibroblastos, células vasculares endoteliales, preadipocitos, células mesenquimales y células inmunológicas como macrófagos) (Frühbeck, 2008). Se distribuye a lo largo de todo el cuerpo, entre órganos viscerales y la región cardiovascular, debajo de la piel, en la médula ósea, en el tejido mamario, en el rostro, extremidades y articulaciones (Ahmad e Imam, 2016; Zwick et al., 2018). Se clasifica principalmente en dos: pardo y blanco, ambos difieren según su localización, morfología, origen y función

El tejido adiposo pardo consta de adipocitos con pequeñas vacuolas lipídicas (multilocular), es más vascularizado y posee una gran cantidad de mitocondrias (Luong y Lee, 2018), lo que le da el color pardo. Su función principal consiste en hacer termogénesis, es decir, disipar energía almacenada en forma de calor cuando el cuerpo se expone a bajas temperaturas, lo cual se lleva a cabo mediante la proteína desacoplante mitocondrial (UCP-1, en inglés uncoupling protein 1). Este tipo de tejido se localiza en el tronco superior, particularmente en la zona supraclavicular, intraescapular, paravertebral, cervical, pericardial y perirenal (Cook y Cowan, 2009; Sethi y Vidal-Puig, 2011).

El tejido adiposo blanco consta de una vacuola lipídica que ocupa casi el 90% del adipocito (unilocular), tiene pocas mitocondrias en comparación con el tejido pardo y poco volumen citoplásmico (Cinti, 2009; Luong y Lee, 2018). Las funciones principales de este tejido son: primero mantener la homeostasis energética vía almacenamiento o hidrólisis de lípidos según la necesidad metabólica del cuerpo (Zwick et al., 2018) y, en segundo lugar, actuar como protector de órganos delicados o amortiguador de zonas expuestas a impacto mecánico (Rosen y Spiegelman, 2014). Por otro lado, hoy se sabe que también es un órgano endocrino que secreta múltiples moléculas bioactivas como adipocinas, citocinas y lipocinas que, no sólo actúan sobre la función del adipocito, sino también actúan sobre varias rutas metabólicas e influyen la fisiología y patología humana (Ahmad y Imam, 2016;

Szablewski, 2019). De acuerdo a su localización, el tejido adiposo blanco se puede subdividir en dos: visceral y subcutáneo, cada uno con su respectiva función.

### **1.1 Tejido adiposo subcutáneo**

El tejido adiposo subcutáneo se ubica debajo de la piel, generalmente arriba de la musculatura abdominal, mamaria y en la región gluteofemoral del cuerpo, representa aproximadamente el 80% del tejido adiposo corporal (Frühbeck, 2008; Gasevic et al., 2014) y por su ubicación drena directo a la circulación sistémica. Al ser el tejido adiposo más grande del cuerpo, actúa como un excelente amortiguador o reservorio ya que tiene una mayor capacidad de capturar el exceso de ácidos grasos libres y glicerol de forma postprandial para su almacenamiento en forma de triglicéridos (Ibrahim, 2010).

Este tejido cuenta con una gran capacidad de expansión, la cual ocurre principalmente por hiperplasia (aumento en el número de adipocitos por diferenciación de preadipocitos) en lugar que por hipertrofia (aumento en el tamaño del adipocito). Dicha capacidad de expansión le confiere al tejido adiposo subcutáneo un efecto metabólico protector. Sin embargo, cuando se supera su capacidad de almacenamiento, el exceso de ácidos grasos se deposita primero en el tejido adiposo visceral y luego en depósitos ectópicos de órganos como el hígado, páncreas, corazón y músculo. Por otra parte, la hipertrofia de los adipocitos genera que los macrófagos se infiltran e invadan el tejido adiposo, se dejan de secretar adipocinas anti-inflamatorias como adiponectina y se secretan citocinas pro-inflamatorias; todo en conjunto contribuye a desarrollar resistencia a la insulina y una subsecuente diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares (Smith y Kahn, 2016; González-Muniesa et al., 2017).

### **1.2 Tejido adiposo visceral**

El tejido adiposo visceral constituye el 20% del total del tejido adiposo corporal (Frühbeck, 2008), se ubica en la cavidad intra abdominal alrededor de órganos internos y se divide en: omental (inicia en el estómago y cubre los intestinos), mesentérico (sostiene el intestino delgado y su pliegue circular), retroperitoneal (detrás del páncreas y riñón), gonadal

(alrededor del útero, ovarios ó epidídimo y testículos), (Cook & Cowan, 2009; Bjørndal *et al.*, 2011).

En comparación con el tejido subcutáneo, el visceral está más vascularizado, innervado y contiene una mayor cantidad de células inflamatorias e inmunológicas, menos preadipocitos capaces de diferenciarse, un mayor porcentaje de adipocitos de gran tamaño (hipertróficos) y en los adipocitos se encuentran más receptores de glucocorticoides. Los adipocitos viscerales son metabólicamente más activos, más sensibles a la lipólisis, y menos sensibles al efecto anti-lipolítico de la insulina. Es decir, son más resistentes a la insulina, tienen una mayor capacidad para producir ácidos grasos libres, son más sensibles a la estimulación adrenérgica y por ende presentan una mayor captura de glucosa. A diferencia del tejido adiposo subcutáneo que tiene un efecto protector, la disfunción del tejido visceral se asocia con un mayor riesgo de complicaciones metabólicas, incluidas las cardiometabólicas (Ibrahim, 2010; Schoettl *et al.*, 2018)

El estudio del tejido adiposo visceral es de interés clínico ya que su acumulación se asocia positivamente con algunas características del síndrome metabólico como lo son la resistencia a la insulina, diabetes mellitus, inflamación sistémica y local, dislipidemias, y aterosclerosis, entre otras (Ibrahim, 2010; Chait y den Hartigh, 2020).

En la Tabla 1 se describe de manera comparativa algunas de las diferencias entre el tejido adiposo visceral y subcutáneo.

**Tabla 1:** Diferencias entre los tejidos adiposos visceral y subcutáneo.

Característica	Visceral	Subcutáneo
<b>Localización</b>	Cavidad intra abdominal alrededor de órganos internos	Debajo de la piel, arriba de la musculatura abdominal, mamaria y en la zona gluteofemoral del cuerpo
<b>Función</b>	Asociado a complicaciones metabólicas	Mayor captura de ácidos grasos libres y glicerol
<b>Crecimiento de adipocitos</b>	Hipertrofia	Hiperplasia
<b>Lipólisis</b>	Más sensible por una mayor cantidad de $\beta$ -adrenoreceptores (de efecto lipolítico)	
<b>Metabolismo de glucosa</b>	Más captura de glucosa	
<b>Respuesta a la insulina</b>	Más resistentes (menos sensibles a $\alpha$ -adrenoreceptores de efecto anti lipolítico)	Más sensibles
<b>Disfunción metabólica</b>	Hiperglicemia Hiperinsulinemia Hipertrigliceridemia Complicaciones cardiometabólicas	Acumulación del exceso de ácidos grasos en depósitos ectópicos y tejido adiposo visceral

Elaborada a partir de Ibrahim, 2009; Smith y Khan, 2016; Schoettl, 2018.

## 2. Lipólisis

### 2.1 Definición

La lipólisis es un proceso catabólico que consiste en la hidrólisis de triglicéridos almacenados en el tejido adiposo para liberar una molécula de glicerol y tres ácidos grasos libres, catalizado por tres enzimas: la lipasa de triglicéridos del tejido adiposo (ATGL, del inglés Adipose triglyceride lipase), la lipasa sensible a la hormona (HSL, del inglés Hormone-sensitive lipase) y la lipasa de monoglicéridos (MGL, del inglés Monoglyceride lipase) (Luo y Liu, 2016). Esta vía metabólica puede ser de dos tipos, basal o estimulada. La primera ocurre a lo largo del día, de forma continua pero es una vía energéticamente poco

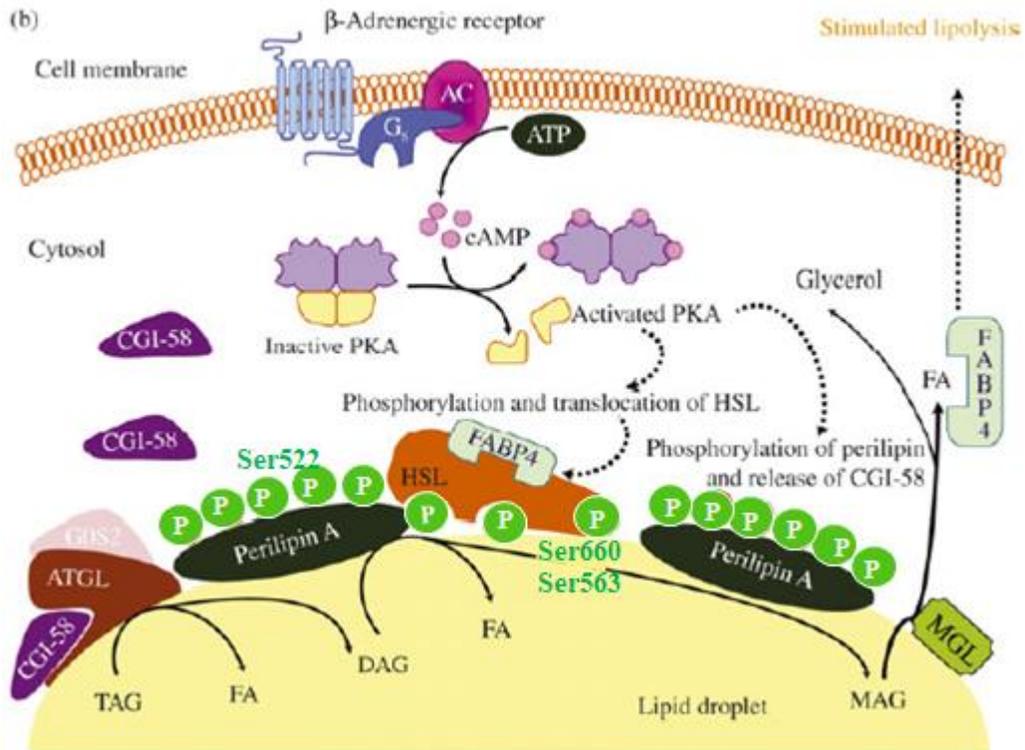
eficiente, mientras que la lipólisis estimulada es inducida en periodos de demanda energética cuando el gasto es mayor que la ingesta energética (Green, 2006), lo cual ocurre durante el ayuno, la actividad física o estrés agudo. La lipólisis provee de glicerol al hígado para llevar a cabo la gluconeogénesis y ácidos grasos al mismo hígado, músculo y riñón para su oxidación según sea la necesidad energética (Luo y Liu, 2016).

## **2.2 Vía de señalización de la lipólisis estimulada**

La lipólisis estimulada está regulada por diversos factores, como la edad, el sexo, la localización del tejido adiposo, genética, alimentación, actividad física, hormonas y el estímulo nervioso. (Frühbeck et al., 2014). Los reguladores hormonales más importantes son las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, las cuales en humanos tienen un efecto altamente estimulador sobre la lipólisis (Arner, 1999, 2005; Nielsen *et al.*, 2014) aunque también pueden ser otras hormonas como glucagon, péptido intestinal vasoactivo y péptidos natriuréticos (Green, 2006).

El mecanismo por el cual se induce la señalización para que se lleve a cabo la lipólisis estimulada comienza con la unión de las catecolaminas a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos que se localizan en la membrana plasmática de los adipocitos. Estos receptores están acoplados a proteínas G con subunidad  $\alpha$  estimuladoras ( $G\alpha_s$ ) y regulan la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC), la cual promueve la síntesis del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) a través de la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP) intracelular. El segundo mensajero AMPC activa a la proteína cinasa A (PKA, del inglés Protein kinase A) (Arner, 1999) que, por un lado, fosforila a la lipasa HSL en los residuos de serina 660 y serina 563 (sitios de activación) y, por otro lado, también fosforila a la proteína perilipina-1 en el residuo serina 522 o serina 497 (McDonough *et al.*, 2013). La fosforilación de estas dos proteínas da lugar a que se lleven a cabo ciertos eventos, tales como la translocación de la HSL fosforilada (activa) del citoplasma a la periferia de la vacuola lipídica, lo cual es permitido debido a que; la perilipina-1 vez fosforilada (activa) se reposiciona en la periferia de la vacuola lipídica y permite el acceso de HSL. De forma simultánea, la fosforilación a perilipina-1 libera al gen comparativo de identificación 58 (CGI-58, del inglés comparative gene identification 58). La formación del complejo entre ATGL y su coactivador CGI-58, le aumenta la actividad

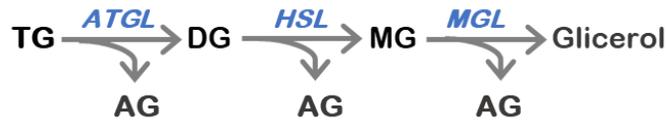
enzimática a la ATGL y translocarse desde el citoplasma hasta la vacuola lipídica para iniciar la lipólisis (Frühbeck *et al.*, 2014; Bolsoni-Lopes y Alonso-Vale, 2015). En la Figura 1 se esquematiza la vía de señalización de la lipólisis estimulada y las principales proteínas que participan en ella.



**Figura 1: Representación esquemática de la vía de señalización de la lipólisis estimulada.** Adenilato ciclasa, AC; adenosín monofosfato cíclico, AMPc; adenosín trifosfato, ATP; diglicérido, DG; gen comparativo de identificación 58, CGI-58; lipasa de triglicéridos del tejido adiposo, ATGL; lipasa sensible a la hormona, HSL; monoglicérido, MG; proteína cinasa A, PKA; proteínas G con subunidad  $\alpha$  estimuladoras,  $G\alpha_s$ ; triglicérido, TG. Figura adaptada de Frühbeck *et al.*, 2014.

En la Figura 2 se presenta la serie de reacciones que se llevan a cabo durante la lipólisis son la hidrólisis de triglicéridos (TG) a diglicéridos (DG) por la enzima ATGL, seguido de la hidrólisis de DG a monoglicéridos (MG) por la ATGL en la lipólisis basal y por la HSL en

la lipólisis estimulada y por último la hidrólisis del MG por la MGL en glicerol y un ácido graso (AG).



**Figura 2:** Serie de reacciones que constituyen la lipólisis. TG (triglicérido), DG (diglicérido), MG (monoglicérido), AG (ácido graso), ATGL (lipasa de triglicéridos del tejido adiposo), HSL (lipasa sensible a la hormona) y MGL (lipasa de monoglicéridos).

### 2.3 Función de la perilipina y su fosforilación como activadores de la lipólisis estimulada

Las perilipinas son a una familia de proteínas que recubren la vacuola lipídica y tienen la función de regular el almacenamiento o hidrólisis de lípidos almacenados. Una de estas proteínas, perilipina-1, es la más abundante en el tejido adiposo blanco y tiene funciones demostradas en las homeostasis sistémica de glucosa y lípidos (Sztalryd y Kimmel, 2014). De forma basal o durante el post-prandio (cuando hay elevadas concentraciones de insulina en circulación), se encuentra defosforilada (inactiva). La función que cumple en este estado es actuar como una barrera protectora de la vacuola lipídica que evita el acceso y acción de las lipasas citosólicas sobre los triglicéridos, con ello permite el almacenamiento y esterificación de ácidos grasos exógenos. Durante la lipólisis estimulada, perilipina-1 se encuentra en su forma activa, es decir, fosforilada en el residuo de serina 522, lo que facilita la liberación del coactivador de ATGL, CGI-58, al citoplasma y al mismo tiempo permite la translocación de HSL fosforilada a la vacuola lipídica (Sztalryd y Brasaemle, 2017). En resumen, tiene una función reguladora muy importante en el adipocito y en la lipólisis estimulada.

### 3. Efectos de la insulina en el tejido adiposo blanco

En el tejido adiposo la insulina es una hormona de control anabólico que cumple con algunas funciones importantes, entre las cuales destacan promover la captura de glucosa estimulada por insulina por medio del transportador de glucosa 4 (GLUT4, del inglés Glucose transporter-4), aunque en mucho menor proporción en comparación del músculo esquelético;

promover la captura de ácidos grasos en circulación mediante la activación de la lipoproteína lipasa así como su esterificación y estimular la síntesis *de novo* de ácidos grasos libres (Dimitriadis et al., 2011). La insulina también regula el crecimiento y diferenciación del adipocito, así como modula la expresión de factores de transcripción que promueven la expresión de adipocinas, así como factores de transcripción y enzimas involucrados en el metabolismo de lípidos tales como el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR $\gamma$ , del inglés Peroxisome proliferator- activated receptor gamma) y la proteína 1c de unión al elemento regulador del estero (SREPB-1c, del inglés Sterol regulatory element-binding transcription factor 1). Por último y tal vez uno de los más importante, la insulina ejerce un efecto anti-lipolítico, es decir, suprime la lipólisis al inhibir la acción de HSL y perilipina mediante la activación de Akt (Cignarelli et al., 2019).

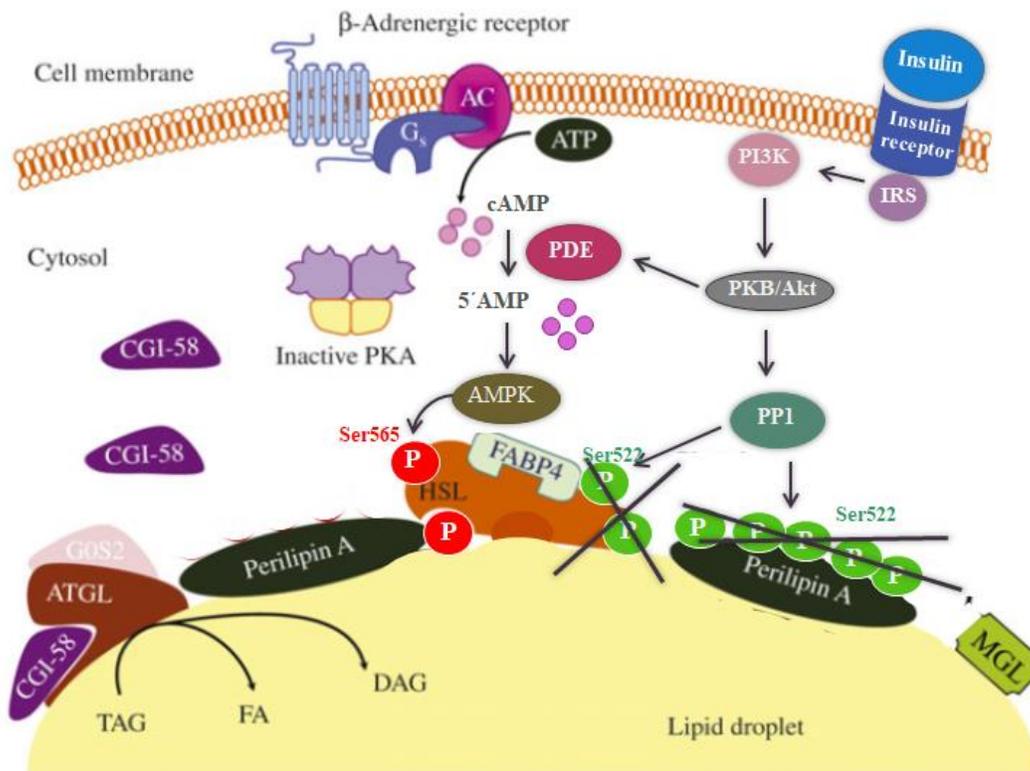
### **3.1 Vías de señalización del efecto anti lipolítico de la insulina durante el postprandio.**

Durante el postprandio, la glucosa en circulación estimula la secreción de insulina de las células  $\beta$ -pancreáticas. En el tejido adiposo la cascada de señalización inicia con la unión de la insulina a su receptor membranal extracelular, el cual se dimeriza y se auto-transfosforila en residuos de tirosina. En seguida, se induce la fosforilación de la familia de proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2, del inglés Insulin receptor substrate) en residuos de tirosina (sitios de activación). Esta etapa constituye el sitio estratégico de control en esta vía. Posteriormente, las proteínas IRS forman un complejo con la subunidad reguladora del fosfoinositol-3-cinasa (PI3K, del inglés Phosphoinositide 3-kinase), referida como p85, la cual favorece la activación de PI3K, segundo sitio de control. El PI3K cataliza la fosforilación del fosfatidilinositol difosfato (PIP2, del inglés Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) para formar fosfatidilinositol trifosfato (PIP3, del inglés Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate). El aumento de PIP3 activa a las proteínas cinasas dependientes de 3-fosfoinositol (PDK-1 y PDK-2, del inglés 3-phosphoinositide-dependent protein kinase) que promueven la fosforilación y activación de la proteína Akt en los residuos de serina 473 y treonina 308, tercer sitio estratégico de control. Por último y específicamente en relación al metabolismo de glucosa, Akt cataliza la fosforilación de la proteína sustrato de Akt de 160 kDa (AS160, del inglés Akt substrate of 160 kDa) y estimula la translocación de los

transportadores de glucosa, GLUT4, desde las vesículas intracelulares a la superficie de la membrana celular para permitir el ingreso de glucosa (Świdarska et al., 2018).

El efecto anti-lipolítico de la insulina en el tejido adiposo consiste en inhibir la lipólisis estimulada característica del ayuno por medio de la activación de su vía de señalización. Una vez que la insulina se une a su receptor y éste se activa, se inicia la vía de señalización previamente descrita. Una vez que se activa Akt, ésta activa a la fosfodiesterasa 3 (PDE, del inglés phosphodiesterase-3), la cual promueve la hidrólisis del enlace 3-fosfoéster del AMPc en su forma inactiva 5'AMP. Al no haber suficiente AMPc, se inhibe la lipólisis ya que este segundo mensajero es indispensable para la activación de la cinasa PKA, que de manera estimulada, fosforila a la perilipina y a la HSL, para activarlas y llevar a cabo la lipólisis estimulada (Arner, 2005). Adicionalmente, el aumento en 5'AMP, producido por la activación en la vía de señalización de la insulina, activa a la cinasa activada por AMP (AMPK, del inglés AMP-activated protein kinase), la cual fosforila a la lipasa HSL pero en sitios de inactivación, específicamente en la serina 565, por lo que se bloquea la translocación de HSL y se inhibe la lipólisis (Frühbeck et al., 2014). Otra forma en la que la insulina suprime la lipólisis es mediante la activación de la proteína fosfatasa 1 (PP1, del inglés protein phosphatase 1), la cual remueve las fosforilaciones de activación de la perilipina y de la HSL (Clifford et al., 1998).

Otra vía en la que se inhibe la lipólisis estimulada, es a través de la activación de receptores acoplados a proteínas  $G\alpha_i$  inhibitoria. La activación de  $G\alpha_i$  inhibe a la AC, reduciendo así los niveles de AMPc y por ende reduciendo igual los niveles de activación de la PKA. La activación de la proteína  $G\alpha_i$  puede darse por la unión de catecolaminas,  $\beta$ -hidroxibutirato, prostaglandinas, adenosina y lactato al receptor acoplado (Morigny *et al.*, 2021). En la Figura 3 se esquematiza la vía de señalización del efecto anti lipolítico de la insulina en el tejido adiposo.



**Figura 3: Representación esquemática de la vía de señalización del efecto anti lipolítico de la insulina.** Adenilato ciclasa, AC; adenosín monofosfato cíclico, AMPc; adenosín trifosfato, ATP; cinasa activada por AMP, AMPK; diglicérido, DG; fosfodiesterasa 3, PDE; gen comparativo de identificación 58, CGI-58; lipasa de triglicéridos del tejido adiposo, ATGL; lipasa sensible a la hormona, HSL; monoglicérido, MG; proteína cinasa A, PKA; proteína fosfatasa 1, PPI; proteína G con subunidad  $\alpha$  estimulatorias,  $G_{\alpha s}$ ; proteínas G con subunidad  $\alpha$  inhibitoria,  $G_{\alpha i}$ ; triglicérido, TG. Figura modificada de Frühbeck et al., 2014.

### 3.2 Función de Akt y fosforilación de Akt como punto estratégico en la vía de la insulina

Tal y como se describió en las secciones anteriores, Akt es una proteína que forma parte de manera temprana en la vía de señalización de la acción de la insulina, por lo que participa tanto en la captura glucosa como en la inhibición de la lipólisis. Akt tiene tres isoformas, donde Akt-1 es de las más importantes y, para que se lleva a cabo una activación completa de la vía, la fosforilación de Akt en el residuo de serina 473 es crítico (Summers et al., 2000).

En este sentido se comprende que la vía de señalización de Akt es un sitio estratégico del metabolismo y, por lo tanto, está bajo estricto control, cualquier alteración en este sitio puede causar diversas reacciones metabólicas, entre ellas la resistencia a la insulina.

De tal forma que, en condiciones fisiológicas durante el ayuno, la vía de señalización de la insulina debe de estar mínimamente encendida. Sin embargo, se ha reportado que en presencia de resistencia a la insulina y frente a una exposición a dieta alta en grasa, la vía dependiente de Akt se encuentra activa (Liu *et al.*, 2009).

#### **4. Disfunción del tejido adiposo por dieta alta en grasa**

El tejido adiposo es un órgano central asociado a enfermedades como la obesidad, una de las razones detrás de la expansión del tejido adiposo es el consumo de DAG, sobre todo cuando los lípidos constituyen mayor o igual cantidad del 30% del consumo energético (Hariri y Thibault, 2010). La grasa proveniente de los alimentos es energéticamente densa, es decir, aporta casi el doble de energía en comparación a hidratos de carbono o proteínas y sensorialmente es muy agradable al gusto, lo que puede llevar al individuo a sobrealimentarse y con ello, subir de peso y expandir el tejido adiposo ya sea por hipertrofia o hiperplasia (Ghibaudi et al., 2002). El aumento de tejido adiposo por hipertrofia ocurre porque en el postprandio la grasa no se oxida inmediatamente para generar energía, al contrario, en el tejido adiposo la insulina señala para llevar a cabo lipogénesis, que consiste en esterificar los ácidos grasos libres provenientes de la dieta y almacenarlos como triglicéridos (TG), o bien, convertir el exceso de glucosa consumida en ácidos grasos (AG) para también esterificarlos en forma de TG.

Frente a una dieta obesogénica, los ácidos grasos libres en exceso dentro del adipocito se acumulan y el tejido adiposo blanco se expande por hipertrofia, lo que produce estrés celular por múltiples vías. La hipertrofia de los adipocitos se asocia con la alteración de muchas de sus funciones, como la secreción de hormonas llamadas adipocinas, de las cuales destacan dos muy importantes, adiponectina y leptina. La adiponectina promueve sensibilidad a la insulina en otros órganos y también tiene un efecto antiinflamatorio, esta hormona disminuye en presencia del exceso de ácidos grasos libres. La leptina es responsable de generar saciedad, por lo que modula la ingesta de alimentos al inhibir la sensación de hambre,

y además fomenta el gasto energético. La leptina aumenta de forma proporcional a la cantidad de tejido adiposo, generando eventualmente resistencia a la leptina a nivel de sistema nervioso central (Luo y Liu, 2016; Mustieles y Arrebola, 2020).

A nivel molecular, la desregulación de las adipocinas junto con el aumento de especies reactivas de oxígeno (EROs), derivadas del estrés mitocondrial y del retículo endoplásmico, promueven la sobreproducción de mediadores de inflamación (ej. factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B, del inglés nuclear factor kappa B), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , del inglés tumor necrosis factor alpha), interleucina 6 (IL-6, del inglés interleukine-6), cinasa N-terminal c-Jun (JNK, del inglés c-Jun N-terminal kinase)) los cuales atraen macrófagos y éstos producen un microambiente en donde el adipocito secreta más citocinas pro-inflamatorias (Poret et al., 2018). En este ambiente, la vía de señalización de la insulina se ve también afectada ya que el factor de transcripción TNF- $\alpha$  estimula a la proteína JNK y ésta inhibe a IRS-1, con lo que la cascada de señalización de la insulina y por ende la inhibición de la lipólisis y la captura de glucosa, se ven alteradas, lo que contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina en el adipocito. Por otro lado, TNF- $\alpha$  también aumenta la lipólisis y con ello hay una mayor secreción de ácidos grasos libres que se liberan a la circulación sistémica, lo que contribuye a la acumulación de grasa en órganos como hígado, páncreas y músculo, generando lipotoxicidad (de Ferranti y Mozaffarian, 2008; Mustieles y Arrebola, 2020).

El grado de saturación de los ácidos grasos provenientes de la dieta también es un factor que contribuye a la disfunción del tejido adiposo. Cuando son mayormente ácidos grasos saturados éstos tienen un efecto similar a la desregulación por adipocinas al estimular los factores de inflamación, pero también a través de la síntesis de ceramidas y diacilgliceroles. Por un lado los diacilgliceroles inducen la inactivación de IRS, por lo que se relacionan con la disminución de las proteínas PI3K y Akt, mientras que las ceramidas se asocian con la disminución de fosforilación de Akt (activación), en ambos casos, disminuyendo la captura de glucosa (Bikman y Summers, 2011; Ritter *et al.*, 2015).

## **5. Panorama de la obesidad en el mundo y en México**

La etiología de la obesidad es compleja y multifactorial, en términos simples se define como la acumulación excesiva de tejido adiposo con un valor del índice de masa corporal mayor o igual a 30. La ganancia de peso asociada a la obesidad y sobrepeso ocurre cuando existe un desequilibrio energético donde es mayor la ingesta que el gasto energético, lo que actúa como un factor de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, diabetes mellitus y algunos tipos de cáncer (Organización Mundial de la Salud, 2020) La causa principal de la obesidad es el consumo de dietas hiperenergéticas y falta de actividad física; sin embargo, hoy se sabe que esta enfermedad es también la suma de factores ambientales, genéticos, estilo de vida y estilos y hábitos alimenticios que no sólo producen la ganancia de peso sino también una compleja disfunción del metabolismo del tejido adiposo.

Los cifras y la estadística no son favorecedores, hasta el año 2016 se estimó que el 39% de la población mundial adulta padecía sobrepeso, de los cuales el 13% padecía obesidad, lo que se traduce 650 millones de personas con obesidad (OMS, 2020). El escenario en México es preocupante, de acuerdo a la última Encuesta Nacional de Salud y Nutrición el acumulado de personas adultas con sobrepeso y obesidad es del 75.2% (39.1% sobrepeso y 36.1% obesidad) (Instituto Nacional de Salud Pública, 2018), estas cifras sitúan a México como el país número uno en obesidad y sobrepeso del mundo (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, 2020).

## **6. Disruptores químicos del metabolismo**

Desde que la obesidad ha emergido como una epidemia, la búsqueda detrás de los factores que la ocasionan sugiere que la genética, la dieta, los hábitos y el estilo de vida no son los únicos responsables en la etiología de la obesidad, sino que también los contaminantes ambientales son partícipes en la ganancia de peso.

Se les conoce como disruptores endocrinos químicos (DEQ) a todos esos contaminantes ambientales que interfieren con las funciones hormonales del organismo y con ello interrumpen vías de señalización que pueden llevar a producir enfermedades por

alteraciones en el sistema endocrino. Muchos de estos contaminantes se pueden encontrar en la naturaleza ya que provienen de la actividad industrial como por ejemplo los derivados de hidrocarburos de la industria petrolera y metalúrgica; agrícolas, como los pesticidas y fertilizantes; sintéticos, para uso cosmético o alimentario y aquellos que son propios de la corteza terrestre, como es el caso de los metales (como arsénico, cadmio, plomo), sólo por mencionar algunos. La exposición diaria a estas sustancias puede provenir de cualquier fuente, ya sea por productos cosméticos, plásticos, alimentos, agua, aire, farmacéuticos y, aunque la mayoría de estos químicos tienen un uso particular, tienen un efecto negativo sobre la salud actuando como DEQ. La lista es tan grande que hoy en día se conocen más de 1,000 sustancias químicas clasificadas como DEQ (Heindel, 2019).

Como ya se mencionó anteriormente, el tejido adiposo aunado a su capacidad de expansión por acúmulo de triglicéridos tiene una función endocrina ya que secreta hormonas y ácidos grasos libres que tienen un papel importante en el metabolismo sistémico de lípidos y los hidratos de carbono, por lo que a aquellos DEQ que predisponían al individuo a la ganancia de peso por alteraciones en puntos estratégicos del metabolismo de lípidos en el tejido adiposo, se les comenzó a conocer como obesógenos (Grün y Blumberg, 2006, 2009). Sin embargo, debido a toda la investigación que se ha realizado en torno a los DEQ, se ha subclasificado a un grupo de DEQ denominados como disruptores químicos del metabolismo (DQM) a aquellas sustancias químicas ambientales que no sólo son capaces de aumentar la expansión del tejido adiposo por hipertrofia o hiperplasia, pero también resultan en otras disfunciones metabólicas como resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, esteatosis hepática y/o síndrome metabólico, denominadas (Heindel *et al.*, 2017; Veiga-Lopez *et al.*, 2018).

## **7. La contaminación del agua de bebida y alimentos por arsénico como problema mundial**

Entre este subgrupo de DQM se encuentra el arsénico, un metaloide disperso en la corteza terrestre pero que también proviene de la actividad metalúrgica e industrial. Actualmente representa un grave problema de salud en el mundo ya que ciertas poblaciones están expuestas al consumo de arsénico inorgánico a través del agua de uso (consumo, uso doméstico o agua de riego para cultivos). Muchos países a nivel mundial presentan altos

niveles de arsénico en el agua subterránea, es decir, por arriba del nivel permisible internacional de 10 µg/L (Organización Mundial de la Salud, 2018), se estima aproximadamente que entre 220 y 300 millones de personas en el mundo están expuestas a elevadas concentraciones de arsénico debido a la contaminación del agua subterránea (Podgorski & Berg, 2020; Quansah et al., 2015). Sin embargo, la normatividad Mexicana establece como límite máximo 25 µg/L (Secretaría de Salud, 2000) para agua de uso y de 10 µg/L para agua embotellada y hielos (Secretaría de Salud, 2015) . En México se han encontrado concentraciones hasta de 400 µg/L en el agua de uso (Cebrian et al., 1983; Rosas et al., 1999, Podgorski y Berg, 2020), es decir, muy por arriba de este límite permisible. Los estados que han reportado niveles altos de arsénico son (en orden alfabético): Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sonora, Tabasco, Zacatecas (Bundschuh et al., 2021).

La toxicidad del arsénico depende de su estado de oxidación, trivalente ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) o pentavalente ( $\text{As}^{\text{V}}$ ), y de la forma química en la que se presente, inorgánica (iAs) u orgánica. La forma química más abundante en el agua es la inorgánica (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2011) como arsenato ( $\text{iAs}^{\text{V}}$ ), la cual rápidamente se puede reducir y convertirse en arsenito ( $\text{iAs}^{\text{III}}$ ), la cual se considera la más tóxica (Bundschuh et al., 2012; IARC y WHO, 2012). Tras el consumo de iAs por medio del agua, el cuerpo lo biotransforma por medio de una serie de reacciones de óxido-reducción y metilaciones donde inserta grupos metilo ( $\text{CH}_3^+$ ) con el objetivo de detoxificar al organismo, de tal manera que se producen cuatro principales productos de biotransformación orgánicos metilados: ácido monometilarsónico ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ), dimetilarsínico ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ), monometilarsonoso ( $\text{MMA}^{\text{III}}$ ) y dimetilarsinoso ( $\text{DMA}^{\text{III}}$ ). No obstante, estos compuestos que antes se creía sólo eran parte de la ruta de detoxificación, hoy se sabe que son altamente tóxicos, inclusive más que el iAs, particularmente las especies trivalentes  $\text{MMA}^{\text{III}}$  y  $\text{DMA}^{\text{III}}$  ya que tienen una alta afinidad a los grupos tiol (-SH) y proteínas celulares (ASTDR, 2010; Drobna *et al.*, 2009). La ruta de excreción del arsénico es a través de la orina aunque se ha visto que también se elimina a través de las uñas, el cabello y en menor medida las heces (ASTDR, 2010B)

Además del agua de uso, existen otras fuentes de exposición a arsénico a través de otro tipo de bebidas y alimentos. El arrastre del arsénico a través de la tierra hasta el agua del subsuelo que se extrae para uso humano y riego de cultivos resulta en la contaminación de estos productos de consumo humano. Algunas marcas de agua embotellada y agua mineral Peñafiel han llegado a mostrar concentraciones de arsénico por arriba de la norma internacional o la nacional para agua de bebida y hielos, (10 µg/L) (Gutiérrez-Alcalá, 2019), jugo de manzana (Wilson *et al.*, 2012), en alimentos para bebés (HBBF, 2017) y en arroz (García-Rico *et al.*, 2020). En humanos, en general se maneja que la dosis letal de arsénico ingerido es de 1-3 mg/kg. (PHE Centre for Radiation Chemical and Environmental Hazards, 2016)

## **8. Arsénico como factor de riesgo en el desarrollo de diabetes mellitus y obesidad**

### **8.1 Diabetes mellitus**

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es un desorden metabólico donde uno de los eventos fisiológicos más importantes es la resistencia a la insulina, asociada junto con alteraciones en la secreción de la insulina (Farkhondeh *et al.*, 2019). Los efectos del arsénico como diabetógeno se han estudiado extensamente a través de estudios epidemiológicos o por medio de modelos *in vivo* e *in vitro*. La evidencia experimental demuestra que este metaloide resulta como factor de riesgo para DMT2 por medio de cuatro principales procesos conocidos al momento a nivel molecular (Martin *et al.*, 2017), los cuales se mencionan a continuación.

A) Desregulación de la secreción de insulina en células β-pancreática: Uno de los mecanismos descritos es disminuyendo la secreción de insulina estimulada por glucosa debido a una pérdida en las oscilaciones de calcio que hacen que la calpaína-10 no se active de forma adecuada y, por lo tanto, no se pueda llevar a cabo el corte proteolítico de la proteína SNAP-25 para que los gránulos de insulina se puedan fusionar con la membrana plasmática (Díaz-Villaseñor *et al.*, 2006, 2008). Por otro lado, la respuesta antioxidante endógena estimulada por la presencia del arsénico inhibe las EROs inducidas por glucosa que, en este caso, son parte de la maquinaria de señalización que promueve la secreción de insulina *in vitro* (Fu *et al.*, 2010). Dover y colaboradores, en un estudio *in vitro*, sugieren

que otro de los mecanismos por los que el arsénico, específicamente el  $iAs^{III}$  y  $DMA^{III}$ , alteran la función de la célula  $\beta$ -pancreática es a través de la desregulación de la función mitocondrial, lo que tiene como consecuencia la inhibición de la secreción de insulina (Dover *et al.*, 2018). En cuanto a la respuesta inflamatoria, el arsénico induce factores de inflamación como NF- $\kappa$ B que elevan el nivel de EROs y dan lugar a apoptosis celular (Farkhondeh *et al.*, 2019). La exposición aguda a concentraciones tóxicas de  $iAs^{III}$ , del orden de 100 a 200  $\mu$ M también altera la secreción de insulina *in vitro* (Ahangarpour *et al.*, 2017).

B) Inhibición de la captura de glucosa dependiente de insulina: Se ha estudiado en modelos *in vitro* de adipocitos que el arsénico inorgánico en concentraciones subcrónicas perturba la vía de señalización de la insulina al disminuir los niveles de pAkt en serina 473 y treonina 308 (Paul, Harmon, et al., 2007A). En consecuencia se produce una disfunción en la captura de glucosa estimulada por insulina al disminuir la translocación del transportador GLUT4 hacia la membrana (Walton et al., 2004), lo que da lugar a resistencia a la insulina. De igual manera, el arsénico en concentraciones ambientalmente significativas de 1 y 2  $\mu$ M disminuyen el mRNA del gen Glut4 y la abundancia intracelular de la proteína GLUT 4 (Xue et al., 2011).

C) Estimulación de la gluconeogénesis hepática: El  $iAs$  en concentraciones crónicas induce la transcripción y la expresión de la enzima paso limitante de la ruta encargada de la síntesis de glucosa en el hígado, la fosfoenol piruvato carboxicinas (PEPCK, del inglés phosphoenolpyruvate carboxykinase), lo que tiene como consecuencia hiperglicemia en ayuno (Liu *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015). En tejido adiposo, al igual que en el hígado, el arsénico induce la transcripción y expresión de PEPCK, con la diferencia de que en el tejido adiposo esta enzima participa en la gliceroneogénesis, la cual se encarga de la síntesis de glicerol-3-fosfato (G3P), lo que tiene como consecuencia el aumento de la re-esterificación de ácidos grasos durante el ayuno (Beale *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2014).

D) Disminución de la síntesis de glucógeno hepático estimulado por insulina *in vitro*: El arsénico aumenta la fosforilación de la glucógeno sintasa en la serina 641 lo que inactiva y disminuye la actividad de la enzima que cataliza el paso limitante de la glucogénesis. Por el contrario, el arsénico también aumenta la actividad relativa la enzima paso limitante de la

glucogenólisis, la glucógeno fosforilasa, y en consecuencia, aumenta la glucosa libre en el medio (Zhang *et al.*, 2017).

## 8.2 Obesidad

La obesidad y DMT2 son dos epidemias altamente correlacionadas que, aunque no son lo mismo, la primera es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la resistencia a la insulina, la cual es una de las complicaciones de la DMT2. El arsénico como DQM se considera un factor de riesgo para el desarrollo de DMT2 mientras que la relación con la obesidad y el impacto en el tejido adiposo blanco no es del todo claro. Los pocos trabajos que han estudiado el efecto del arsénico sobre el tejido adiposo no tienen mucha relación y seguimiento entre ellos y los objetivos son muy dispersos o poco claros. Los trabajos se han enfocado en la diferenciación y el crecimiento del adipocito, la secreción de algunas adipocinas, metabolismo de lípidos y de glucosa (Catriota *et al.*, 2020 A; Ceja-Galicia *et al.*, 2017).

Se han realizado estudios *in vitro* para determinar el efecto del arsénico sobre la diferenciación de pre adipocitos describe que a concentraciones de 3  $\mu\text{M}$  ésta disminuye significativamente y a partir de 6 a 10  $\mu\text{M}$  se inhibe por completo (Trouba *et al.*, 2000).

Al evaluar el efecto del arsenito sobre la proteína estimulante de unión a CCAAT alfa y beta (C/EBP- $\alpha$ , C/EBP- $\beta$ ) y PPAR $\gamma$  se encontró que la expresión y transcripción de estas proteínas así como su interacción disminuye en un rango de concentraciones de 0.2-6  $\mu\text{M}$ , lo que se traduce en una disminución de la adipogénesis (Wauson *et al.*, 2002; Xue *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2013). El estrés del retículo endoplásmico por la presencia de arsénico induce la expresión de la proteína homóloga potenciadora de la unión a CCAAT (CHOP), la cual desregula la adipogénesis al reducir la expresión de los genes involucrados en dicha vía, como es el caso de PPAR $\gamma$  y C/EBP- $\alpha$  (Hou *et al.*, 2013).

En cuanto a la secreción de adipocinas, en particular de adiponectina, que junto con la insulina regula el metabolismo de lípidos y glucosa. Song y colaboradores describen en un modelo *in vivo* que la concentración de adiponectina disminuye en suero tras una exposición crónica de 5-50 mg/L de arsenito sin alterar los niveles de glucosa e insulina en suero. Sin

embargo, estas concentraciones de arsenito elevan los niveles de triglicéridos y colesterol de alta densidad (HDL, del inglés high density cholesterol) por lo que perturba el metabolismo de lípidos (Song et al., 2017). No obstante, concentraciones más bajas y ambientalmente más significativas de arsénico en modelos *in vitro* (1  $\mu\text{M}$ ) revelan un aumento en la lipólisis basal medida a través de la secreción de glicerol, mientras que en los modelos *in vivo* (100  $\mu\text{g/L}$ ), el arsénico genera adipocitos de mayor tamaño (hipertróficos) y una disminución de la expresión de perilipina total, por lo que son adipocitos más grandes pero disfuncionales para el almacenamiento de lípidos (Garciafigueroa et al., 2013).

En relación al metabolismo de glucosa, en modelos *in vitro* han evaluado el efecto del arsénico sobre la captura de glucosa estimulada por insulina. Se ha encontrado que bajas concentraciones de  $\text{iAs}^{\text{III}}$  en un rango de 0.5-5  $\mu\text{M}$ , y 0.5 de  $\mu\text{M}$   $\text{MMA}^{\text{III}}$  disminuyen la captura de glucosa estimulada por insulina, lo cual va de la mano con la disminución de la fosforilación de pAkt Ser 473 y la abundancia y transcripción del transportador GLUT4 (Paul, Harmon, et al., 2007A; Xue et al., 2011; Padmaja-Divya et al., 2015).

De igual forma, con concentraciones subtóxicas de 20-100  $\mu\text{M}$  de  $\text{iAs}^{\text{III}}$ , 1-5  $\mu\text{M}$  de  $\text{MMA}^{\text{III}}$  y 2-10  $\mu\text{M}$  de  $\text{DMA}^{\text{III}}$  se disminuyen la captura de glucosa *in vitro* estimulada por insulina y la translocación del transportador GLUT4 hacia la membrana. En cambio, de manera independiente de insulina sólo a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{iAs}^{\text{III}}$  disminuye la captura de glucosa (Walton et al., 2004).

Por otro lado, en modelos *in vivo* han evaluado el efecto con concentraciones crónicas de 50  $\text{mg/L}$  de  $\text{iAs}^{\text{III}}$  y los resultados muestran que la glucosa postprandial se eleva, o dicho de otra forma, se altera la tolerancia a la glucosa o capacidad de otros órganos periféricos de capturar glucosa, lo cual es uno de los primeros indicadores de la resistencia a la insulina (Paul, Hernández-Zavala, et al., 2007B).

## **9. Efecto de la dieta alta en grasa en combinación con arsénico.**

Los estudios que estudian el efecto de una dieta alta en grasa en presencia de arsénico sobre el metabolismo de lípidos y glucosa son muy limitados.

En la fisiopatología de la DMT2 se produce resistencia a la insulina, hiperglucemia e hiperinsulinemia. No obstante, la evidencia muestra que la exposición crónica a concentraciones altas de 25 y 50 mg/L de arsénico aumentan los niveles de glucosa en sangre (hiperglicemia) pero disminuyen tanto la cantidad de insulina en suero (hipoinsulinemia) como la resistencia a la insulina. Finalmente, en cuanto al metabolismo de lípidos, esta combinación de dieta y arsénico disminuye el contenido de triglicéridos en suero y en hígado, es decir genera hipolipidemia (Paul *et al.*, 2011).

Por otra parte, la existente evidencia experimental *in vivo* revela que con concentraciones altas de 25 y 50 mg/L de arsénico (es decir 2,500 y 5,000 veces más que la concentración internacional permitida) junto con una dieta alta en grasa se disminuye el peso del hígado y del páncreas, se reduce el contenido y la secreción de insulina de los islotes pancreáticos, se aumenta la leptina y adiponectina en suero, se aumenta el estrés oxidante a través de las EROs y el daño a la membrana mitocondrial junto con la disminución del contenido de enzimas antioxidantes (Ahangarpour, Alboghobeish *et al.*, 2018 A).

Otros estudios que también han evaluado el efecto combinado de la dieta alta en grasa con arsénico en otros órganos, describen que la combinación de ambos factores aumenta el riesgo a padecer DMT2 en individuos con obesidad (Castriota *et al.*, 2018). En roedores, dicha combinación aumenta el estrés oxidante a través de las EROs produciendo daño cardíaco y pulmonar (Ahangarpour *et al.*, 2018A; Hemmati *et al.*, 2018), genera hipertiroidismo (Ahangarpour *et al.*, 2018 B), induce efectos tóxicos en el sistema reproductor (Ahangarpour *et al.*, 2019), perturba la memoria (Alboghobeish *et al.*, 2019B). Adicionalmente, la combinación se asocia a un mayor daño en la función y acumulación de arsénico en hígado y riñones, probablemente por la disminución en la abundancia y diversidad de la microbiota intestinal causada por la dieta alta en grasa (Liu *et al.*, 2020).

En referencia al metabolismo del tejido adiposo blanco, datos previos del laboratorio de que dieron pie a esta tesis, revelan que el marcador del índice de lipólisis en suero disminuye significativamente en ratones C57BL/6 alimentados con dieta alta en grasa (39.1% kcal de grasa) pero el efecto se exagera cuando los ratones son además expuestos en conjunto a 100 µg/L de arsénico inorgánico en al agua de bebida. De manera molecular, los niveles de activación de la HSL apoyan dicho efecto, en particular en el tejido adiposo retroperitoneal (Calderón-DuPont et al., 2022)

De manera contraria, los índices de resistencia a la insulina de tejido adiposo evaluado a través de metabolitos en suero, aumentan por efecto de la dieta alta en grasa y el efecto del arsénico genera un mayor aumento de forma aditiva en presencia de arsénico (Calderón-DuPont et al., 2022).

## JUSTIFICACIÓN

La lipólisis estimulada es una de las principales funciones del tejido adiposo blanco y su desregulación afecta al organismo de forma sistémica. La lipólisis estimulada se regula tanto positivamente en condiciones de ayuno como negativamente por insulina durante el postprandio. De tal forma que la disfuncionalidad lipolítica del tejido adiposo blanco que se asocia a la obesidad, se caracteriza por una disminución en la lipólisis estimulada durante el ayuno y una resistencia a la insulina, la cual se traduce como una falta de efecto anti-lipolítico de la insulina en el tejido adiposo blanco durante el postprandio.

La expresión de la perilipina así como su fosforilación de activación en serina 522, es un punto de regulación estratégico en la lipólisis estimulada, ya que al fosforilarse, por un lado libera a CGI-58, el cual es el coactivador de la lipasa ATGL y por otro lado permite el acceso a la lipasa HSL hacia la vacuola lipídica. De igual forma, un punto crucial en la vía de señalización de la insulina es la fosforilación de Akt en serina 473, la cual en ayuno debe de encontrarse bastante disminuida y un aumento se interpreta como una desensibilización de la vía asociada a resistencia a la insulina, lo cual no permite que, ante el estímulo postprandial, que se acompaña con el aumento en la concentración sérica de insulina, la vía se active de forma adecuada y la lipólisis estimulada se inhiba.

Dado que el arsénico potencia el efecto de la dieta alta en grasa sobre la disminución en la lipólisis estimulada (índice de lipólisis) y el aumento de la resistencia a la insulina del tejido adiposo (índice ADIPO-IR), evaluados a través de marcadores en suero, resulta de interés evaluar a nivel molecular los puntos de regulación de la lipólisis estimulada y de la vía de señalización de la insulina en los depósitos de tejido adiposos visceral y subcutáneo.

## **HIPÓTESIS**

El tejido adiposo blanco de aquellos animales que fueron alimentados con dieta alta en grasa presentan en estado de ayuno con respecto al grupo control, menor proporción de la proteína fosforilada de perilipina en la serina 522 y mayor proporción de Akt en la serina 473, como indicadores de inhibición de la lipólisis estimulada y resistencia a la insulina de tejido adiposo, respectivamente.

El arsénico exagera el efecto negativo ocasionado por la dieta alta en grasa sobre el efecto de la fosforilación en perilipina y Akt, lo que indica que la regulación de la lipólisis (independiente y dependiente de insulina) se altera en presencia de este metaloide.

A nivel molecular existe un mayor efecto negativo sobre los marcadores de la lipólisis estimulada (perilipina) y resistencia a la insulina (Akt) en los tejidos adiposos viscerales en comparación con el tejido adiposo subcutáneo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar puntos de regulación positiva y negativa de la lipólisis estimulada en tejido adiposo blanco subcutáneo y visceral (epididimal y retroperitoneal) de ratones macho alimentados con dieta control o alta en grasa y con o sin exposición crónica a arsénico en el agua de bebida.

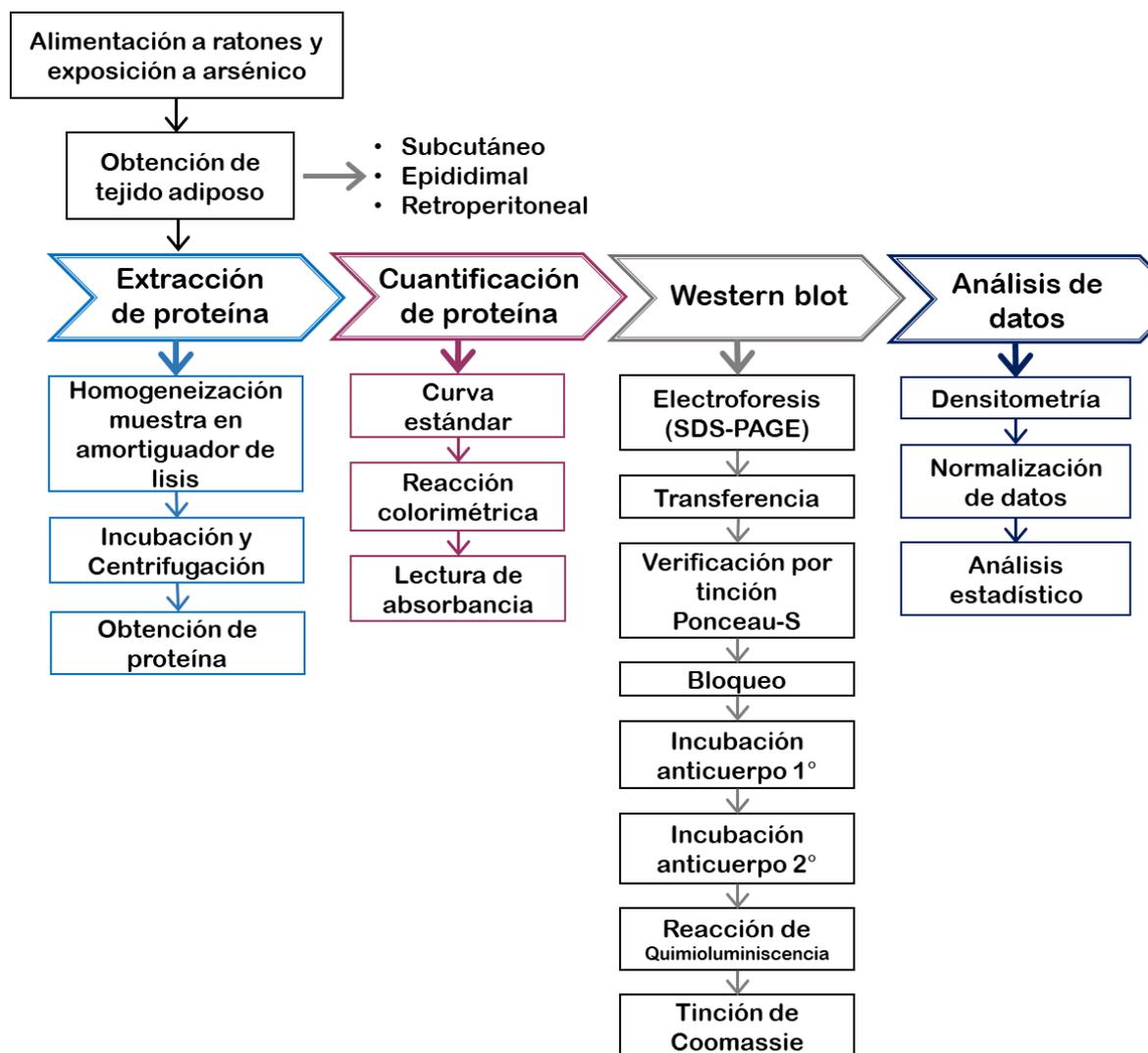
## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar el grado de expresión de la proteína perilipina-1 y su respectiva fosforilación de activación en el residuo de serina 522 en tejido adiposo blanco subcutáneo y visceral de ratones en ayuno alimentados con dieta control o alta en grasa y con y sin exposición crónica a arsénico en el agua de bebida.

Determinar el grado de expresión de la proteína Akt y su respectiva fosforilación de activación en el residuo de serina 473 en tejido adiposo blanco subcutáneo y visceral de ratones en ayuno alimentados con dieta control o alta en grasa y con y sin exposición crónica a arsénico en el agua de bebida.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La estrategia general de las etapas que constituyeron este proyecto se describe brevemente en la Figura 4.



**Figura 4: Metodología en diagrama de bloques. El diseño experimental y la obtención de tejidos se realizaron previo al desarrollo del presente trabajo. El proyecto se dividió en 4 etapas principales que se muestran en las flechas centrales y cada una consistió de subpasos individuales. SDS-PAGE (siglas en inglés de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio), 1° (primario), 2° (secundario).**

## 1. Modelo y diseño experimental

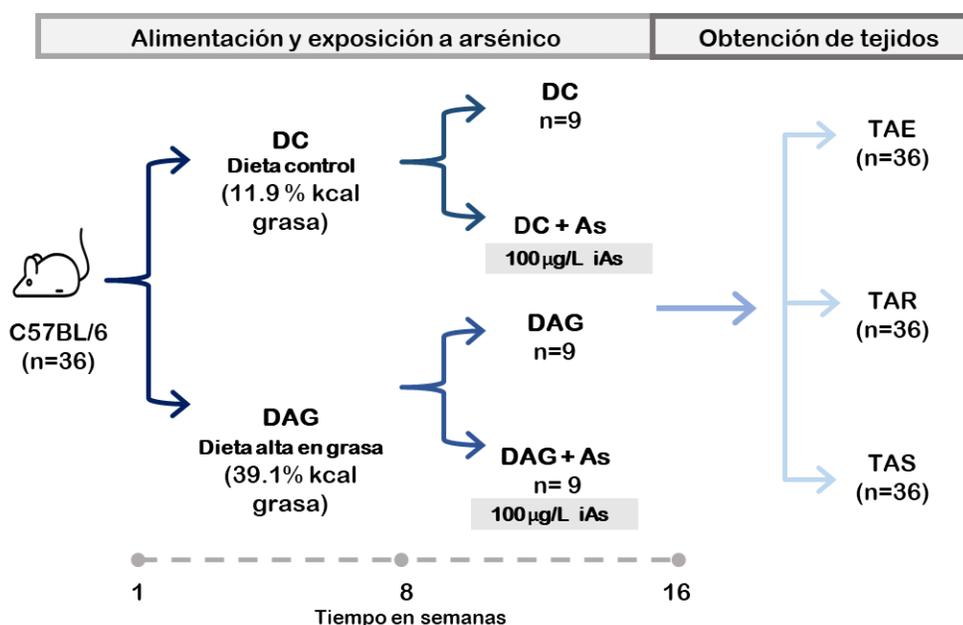
Las muestras del estudio fueron obtenidas previamente por el grupo de trabajo del laboratorio B249 del departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM a partir del siguiente estudio experimental. El diseño consistió en alimentar por 8 semanas a ratones macho de la cepa C57BL/6 con dieta control (DC) (11.9% kcal de grasa) (n=18) o con dieta alta en grasa (DAG) (39.1% kcal de grasa) (n=18), ambas dietas de la marca Testa Diet (DC #5TJS y DAG #57JN). (Protocolo número 162 aprobado por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma de México, Xochimilco). En la Tabla 2 se resume el contenido energético y la composición de ácidos grasos de ambas dietas.

*Tabla 2: Composición de las dietas*

<b>Composición energética</b>		
<b>Macronutriente</b>	<b>Dieta control</b>	<b>Dieta alta en grasa</b>
<b>Proteína (% kcal)</b>	15.9	15.8
<b>Grasa (% kcal)</b>	11.9	39.1
<b>Hidratos de carbono (% kcal)</b>	72.2	45.1
<b>Composición de ácidos grasos</b>		
<b>Ácido graso</b>	<b>Dieta control</b>	<b>Dieta alta en grasa</b>
<b>Colesterol (ppm)</b>	1.323	1.707
<b>Ácido linoleico (%)</b>	0.44	1.70
<b>Ácido linolénico (%)</b>	0.04	0.16
<b>Ácido araquidónico (%)</b>	0.01	0.02
<b>Ácidos grasos Omega-3 (%)</b>	0.06	0.23
<b>Ác. Grasos saturados totales (%)</b>	2.03	7.92
<b>Ác. Grasos insaturados totales (%)</b>	1.61	6.28
<b>Ác. Grasos poliinsaturados totales (%)</b>	0.80	3.14
<b>Fuentes de ácidos grasos provenientes de la dieta</b>		
<b>Fuente</b>	<b>Dieta control</b>	<b>Dieta alta en grasa</b>
<b>Lardo (%)</b>	30.3	30.3
<b>Aceite vegetal (%)</b>	30.3	30.3
<b>Grasa de leche (%)</b>	30.3	30.3
<b>Aceite de soya (%)</b>	6.4	6.4
<b>Aceite de maíz (%)</b>	2.7	2.7

Posteriormente, por otras 8 semanas, la mitad de cada grupo se le administraron 100  $\mu\text{g/L}$  de arsénico inorgánico en el agua de bebida, lo que sería aproximadamente igual a 20  $\mu\text{g/L}$  aproximadamente en humanos, debido a que la tasa de metabolismo del arsénico es mayor en los roedores (Castriota *et al.*, 2020 B) junto con la dieta inicial. En total resultaron cuatro grupos experimentales (n=9 cada uno).

Al cabo de las 16 semanas del estudio, luego de 6 horas de ayuno se llevó a cabo la eutanasia de los ratones y se extrajeron los diferentes tipos de tejido adiposo blanco de cada ratón: subcutáneo (n=36), visceral epididimal (n=36) y visceral retroperitoneal (n=36), sumando un total de 108 muestras. Las muestras fueron enjuagadas en solución salina (NaCl 0.9%) y posteriormente criopreservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. La Figura 5 esquematiza el diseño experimental.



**Figura 5: Diseño experimental gráfico.** Grupos experimentales a lo largo del tiempo del estudio, alimentados con dos diferentes dietas y con la exposición a arsénico inorgánico (iAs). Al término del estudio se obtuvieron tres tejidos adiposos blancos para cada grupo. Dieta control (DC), dieta control con arsénico (DC-As), dieta alta en grasa (DAG), dieta alta en grasa con arsénico (DAG-As). Tejido adiposo epididimal (TAE), tejido adiposo retroperitoneal (TAR) y tejido adiposo subcutáneo (TAS).

## 2. Extracción de proteína de tejido adiposo blanco

Se tomaron ~100 mg de cada muestra de tejido congelado, se colocaron en un tubo de ensayo de 13x75 cm que previamente contenía 300  $\mu$ L del buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) para extracción (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, Igepal 1%, SDS 0.1% y desoxicolato de sodio 1%) en agua desionizada en presencia de un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche Cat. 11836153001), NaF 1 mM y  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM y con ayuda de un taladro motorizado se homogeneizó las muestras, (Apéndice A para más información de reactivos). Un vez homogeneizadas las muestras se traspasaron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se dejaron incubar en hielo por 40 min y en seguida se centrifugaron las muestras a 15700 RCF, a 4°C por 15 min. Se recuperó el extracto proteico a partir del sobrenadante, evitando la toma de grasa localizada en la interfase, y se depositó en un tubo nuevo. En todo momento la manipulación de las muestras se realizó en hielo.

## 3. Cuantificación de proteína

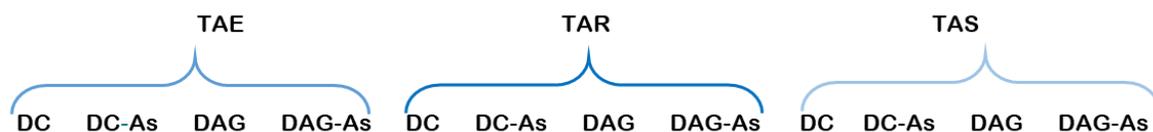
La cuantificación de proteína se realizó con la técnica de Lowry mediante el kit *DC<sup>TM</sup> Protein Assay* (Reactivos A, B y S) (Bio-Rad Cat. 5000112). Dicha metodología consta de una reacción colorimétrica capaz de detectar concentraciones de proteína de forma lineal hasta 2 mg/mL. Las muestras se analizaron mediante una curva estándar de calibración de 0.125 – 2 mg/mL con albúmina de suero bovino (BSA). En una placa de 96 pozos se colocaron 5  $\mu$ L de cada estándar de la curva, de muestra, o agua desionizada como blanco, y con una pipeta multicanal se agregaron 25  $\mu$ L del reactivo A' (mezcla del reactivo A (NaOH y tartrato de cobre) con el reactivo S (SDS)) y 200  $\mu$ L del reactivo B (reactivo de Folin). Este tratamiento se realizó para cada pozo que contenía ya sea un volumen de blanco, muestra o estándares de calibración, todos por duplicado. Finalmente, se dejó reposar la placa por 15 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. En seguida se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro iMark<sup>TM</sup> Microplate Absorbance Reader (BioRad) a una longitud de onda de 750 nm.

Dado que las placas eran sólo de 96 pozos y se cuantificaron 108 muestras por duplicado, fue necesario emplear más de una placa, no obstante, en cada una de ellas se preparó una

curva estándar que sirvió para calcular las concentraciones de proteína a partir de la ecuación de la recta.

Con la finalidad de estandarizar la técnica de Western blot para los diferentes anticuerpos, cuidando que las inmunoreacciones no estuvieran saturadas, una vez que todas las muestras estaban cuantificadas, se prepararon los *pools* o mezcla de los tres tejidos TAS, TAR y TAE, cada uno a una concentración de 0.55 mg/mL de proteína. Se prepararon los *pools* o mezcla de muestras con las 9 muestras de los 4 grupos experimentales (36 cada uno) para los tres tejidos experimentales.

Para el análisis de las muestras, también se prepararon *pools* por cada uno de los 4 grupos experimentales (n= 9 ratones c/uno) dieta control (DC), dieta control con arsénico (DC-As), dieta alta en grasa (DAG) y dieta alta en grasa con arsénico (DAG-As) para cada uno de los 3 tejidos adiposos (epididimal, retroperitoneal y subcutáneo) a una concentración de 0.55  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 6).



**Figura 6: Preparación de muestras en pools por tejido.** Cada pool tiene una concentración de proteína total de 0.55  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y una n=9. Dieta control (DC), dieta control con arsénico (DC-As) dieta alta en grasa (DAG), dieta alta en grasa con arsénico (DAG-As). Tejido adiposo epididimal (TAE), tejido adiposos retroperitoneal (TAR) y tejido adiposo subcutáneo (TAS).

## 4. Western blot

### 4.1 SDS-PAGE

Las muestras de proteínas se desnaturalizaron con temperatura a 95°C por 5 minutos en buffer Laemmli 4X y  $\beta$ -mercaptoetanol, electroforesis se resolvió en geles de poliacrilamida

en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12%, de 1.5 mm de grosor y con 10 pozos. Se preparó un gel por cada tejido adiposo en donde se cargó el *pool* o mezcla de muestras de cada grupo experimental por duplicado. La alineación de proteínas se llevó a cabo a 75 V por 30 min y la separación a 100 V por 90 min, aproximadamente, en buffer de corrida (Tris-Base 250 mM, glicina 1.92 M, SDS 1%, pH 8.3). En cada gel se cargaron 5  $\mu$ L del marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standard (Bio-Rad, Cat. 161-0375).

## **4.2 Transferencia**

La proteína de los geles se transfirió a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.2  $\mu$ m y de baja auto fluorescencia (Bio-Rad Cat. 162-0177) en condiciones húmedas a 4°C, empleando el buffer de transferencia Shafer-Nielsen frío (Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.00375%, metanol 20%) a 100 V por 1 h.

## **4.3 Confirmación de transferencia por tinción con Ponceau-S**

Terminada la transferencia, las membranas se tiñeron unos minutos con una solución de 0.2% de Ponceau-S (Sigma Aldrich Cat. P3504-10G), en 0.5% de ácido acético mientras que los geles se tiñeron con Azul de Coomassie al % para verificar la transferencia de las proteínas desde el gel hacia la membrana.

## **4.4 Bloqueo**

Las membranas lavadas en buffer TBS con tween 20 (Sigma, Cat P7949) al 0.1% (TBS-T) y sin Ponceau-S se bloquearon con TBS-T y leche en polvo baja en grasa al 5% (Bio-Rad Cat. 170-6404) por 1 hora.

## **4.5 Incubación de anticuerpo primario y secundario**

Los anticuerpos primarios se incubaron a 4°C toda la noche y al siguiente día se dejaron incubar por 1 hora a 25°C. Después de 3 lavados de 10 minutos con TBS-T a 25°C, se realizó la incubación de los anticuerpos secundarios correspondientes por 1.5 horas a 25°C. Los anticuerpos con los que se trabajó fueron los siguientes: anti-perilipina (Cell Signaling 9349) a una dilución 1:1,000; anti-perilipina-1 fosforilada ser 522 (Vala Sciences 4856) a una

dilución 1:1,500; anti Akt (Cell Signaling 9272) a una dilución 1:1,000; y anti Akt-1 fosforilada ser 473 (Cell Signaling 9018) a una dilución 1:500. Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (Anti-mouse Cat. GtxMu-003-DHRPX y Anti-rabbit Cat. GtxRb-003-DHRPX, ImmunoReagents, Inc), para perilipina, p-perilipina-1, Akt se utilizaron a una dilución de 1:3,500 y para pAkt una dilución de 1:2000 (ver Apéndice B para la identificación de los anticuerpos). Todos los anticuerpos fueron preparados en la solución de bloqueo.

#### **4.6 Reacción de quimioluminiscencia**

La detección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia mediante el reactivo de Immobilon® ECL (Merck Millipore, Cat. WBKL50100) en el fotodocumentador GelLogic (Kodak), con exposición simultánea de los 4 grupos experimentales (DC, DC-As, DAG, DAG-As) y 3 tejidos adiposos para lograr una comparación relativa entre ellos.

#### **4.7 Tinción de la membrana con Azul de Coomassie como control de cargado**

Una vez realizadas las reacciones de quimioluminiscencia, las membranas se tiñeron con Azul de Coomassie (Thermo Fisher Scientific Cat. 20278) con el objetivo de visualizar el bandeo de proteína total transferida y analizarla mediante densitometría y con ello normalizar los datos.

### **5. Análisis de datos**

#### **5.1 Densitometría óptica y normalización de datos**

Las imágenes obtenidas en el fotodocumentador GelLogic se analizaron en el software de Bio-Rad Image Lab 6.1 (Hercules, Ca, EUA). El análisis consistió en obtener valores numéricos que representen la señal de la proteína de interés. Se hizo un análisis de densidad óptica y se descartó el fondo de la membrana para asegurar que el valor numérico correspondía sólo a la señal de la proteína. Los resultados presentados se obtuvieron primero normalizando la proteína de interés entre la proteína total cargada, esto es, la densitometría óptica de la membrana con anticuerpo entre la densitometría óptica de la membrana teñida con azul de Coomassie. Posteriormente, para determinar la proporción de proteína

fosforilada (activación) se dividió la densitometría óptica de la proteína fosforilada (previamente también normalizada al control de carga) entre su proteína total, es decir, perilipina ser 522 entre perilipina total y pAkt ser 473 entre Akt total.

## **5.2 Análisis estadístico**

Los datos de las muestras se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de la media de cuatro experimentos individuales por duplicado. Las diferencias entre los cuatro grupos experimentales se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA, del inglés analysis of variance) seguida de la prueba de comparaciones múltiples Fischer-LSD. Se consideró una diferencia significativa con un valor de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó empleando el software GraphPad Prism 8.0.1 (San Diego, CA, EUA).

## RESULTADOS

### 1. Estandarización de cantidad de anticuerpo y proteína para Western blot

La Tabla 3 resume las diluciones de anticuerpo evaluadas para cada proteína de forma inicial, así como la dilución final seleccionada. De inicio, todas las diluciones se probaron con 20  $\mu\text{g}$  de proteína y para cada tejido. En esta etapa se identificó la dilución de anticuerpo que permitiera detectar la mejor señal, sin que la señal se saturara pero que tampoco fuera demasiado tenue. De igual forma, la Tabla 3 resume las cantidades de proteína total que se probaron para cada proteína. Se identificó que la cantidad que proporcionó la señal quimioluminiscente más adecuada fue la de 20  $\mu\text{g}$ .

*Tabla 3: Estandarización de concentración de anticuerpo primario para cada proteína evaluada en los tres tejidos.*

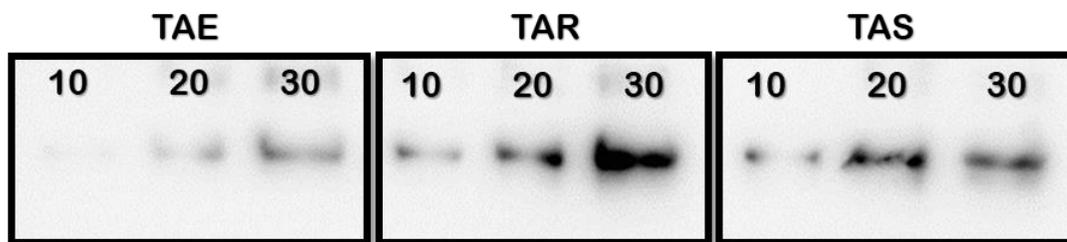
Proteína	Dilución de anticuerpo primario	Dilución final seleccionada
Perilipina total	1:1,000 1:500	1:1,000
Perilipina ser 522	1:2,000 1:750	1:1,500
Akt total	1:2,000 1:1,000 1:500	1:1,000
pAkt ser 473	1:1,000 1:500	1:500

*Tabla 4: Estandarización de la cantidad de proteína evaluada en los tres tejidos*

Proteína	Cantidad de proteína evaluada	Cantidad final seleccionada
Perilipina total	10, 20, 30 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{g}$
Perilipina ser 522	10, 20, 30 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{g}$
Akt total	10, 20, 30 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{g}$
pAkt ser 473	10, 20, 30 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{g}$

En la Figura 7 se observan las detecciones representativas de los tres tejidos adiposos que se realizaron para corroborar las condiciones previamente estandarizadas por el grupo de trabajo del anticuerpo primario de perilipina total a una dilución de anticuerpo de 1:1,000 en un blot con gradiente proteína.

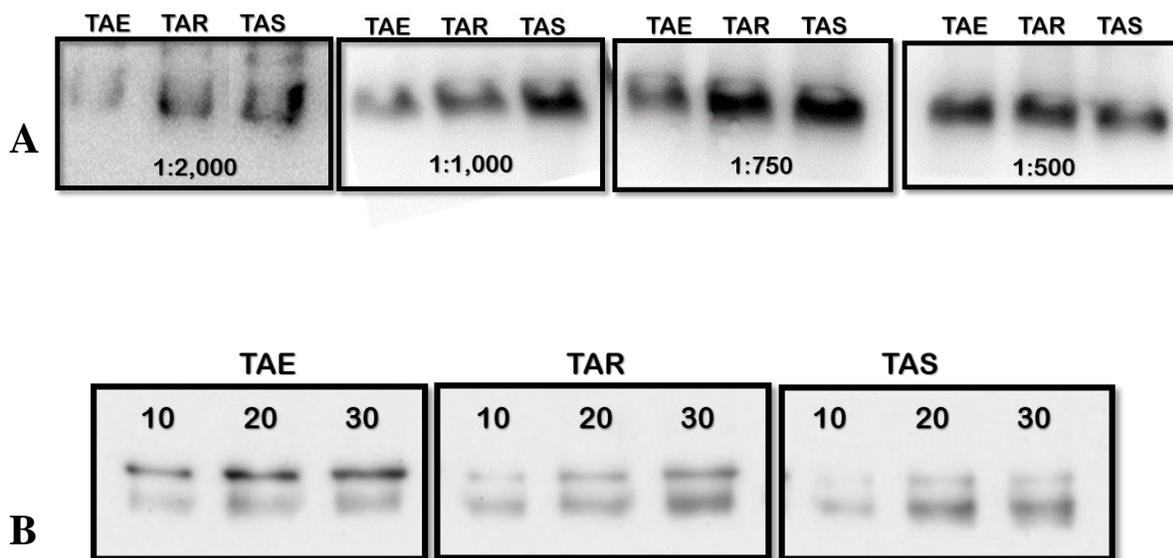
Se evaluaron 10, 20 y 30  $\mu\text{g}$  del *pool* de proteína de todas las muestras en cada uno de los 3 tejidos y se eligió la mejor señal, la que asegurara detectar la señal promedio de la proteína en un rango intermedio con el objetivo de poder detectar muestras con menor o mayor cantidad de proteína de interés de forma lineal. Se estableció que la cantidad de 20  $\mu\text{g}$  es adecuada, ya que se observan las señales de perilipina de forma intermedia, a diferencia de 10  $\mu\text{g}$  que no se detectan en TAE y los 30  $\mu\text{g}$  en TAR se ven muy saturados.



**Figura 7. Estandarización de las condiciones para detectar perilipina total.-.** La inmunodetección de perilipina se llevó a cabo con el anticuerpo diluido 1:1,000 (dilución previamente estandarizada en el laboratorio) con un gradiente de proteína total (10, 20 y 30  $\mu\text{g}$ ) evaluado en los tres tejidos. Tejido adiposo epididimal (TAE), tejido adiposo retroperitoneal (TAR), tejido adiposo subcutáneo (TAS). Las muestras son un *pool* de las diferentes condiciones experimentales.

En la Figura 8A se presentan las imágenes de la estandarización del anticuerpo primario para p-perilipina ser 522 y como se puede observar, con las diluciones más concentradas de 1:500, 1:750 y 1:1,000 las señales de las bandas de proteína se ven muy similares entre ellas, mientras que con la dilución más baja (1:2,000) se logra apreciar con mayor claridad las diferencias en la abundancia de la proteína entre los tres tejidos pero con un poco de ruido de fondo, por lo que se seleccionó la dilución de 1:1,500 para trabajar .

En la Figura 8B se observa la estandarización de cantidad de proteína. Nuevamente y al igual que para la proteína total de perilipina, se decidió trabajar con 20  $\mu$ g de proteína total, ya que con ésta se pueden observar las bandas en los tres tejidos.

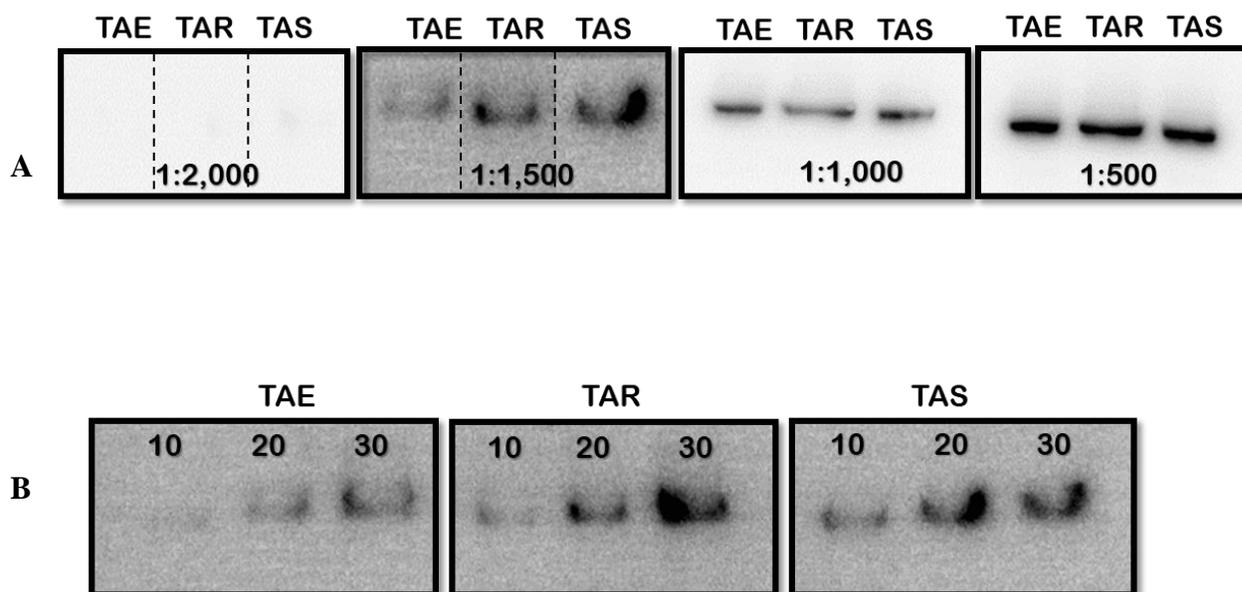


**Figura 8. Estandarización de las condiciones para detectar p-perilipina 522.** A. Se presentan las membranas con las que se evaluaron las distintas diluciones de anticuerpo contra de p-perilipina 522 en orden de menor (1:2000) a mayor concentración (1:500) en el tejido adiposo epididimal (TAE) en el retroperitoneal (TAR) y en el subcutáneo (TAS). Las muestras son un pool de las diferentes condiciones experimentales. B. Se presenta el gradiente de proteína total (10, 20 y 30  $\mu$ g) evaluado en los tres tejidos. Tejido adiposo epididimal (TAE), tejido adiposo retroperitoneal (TAR), tejido adiposo subcutáneo (TAS). Las muestras son un pool de las diferentes condiciones experimentales.

En la Figura 9A se observan las detecciones representativas que se realizaron para Akt total. Como se puede ver, con la concentración más diluida de anticuerpo (1:2,000), la proteína Akt es indetectable para cualquiera de los tres tejidos. Por el contrario, la dilución más concentrada de anticuerpo (1:500) muestra una señal saturada. Tanto las diluciones intermedias 1:1,500 y 1:1,000 muestran una señal adecuada. De tal forma que se seleccionó

como dilución final 1:1,000 ya que tiene menor ruido de fondo y con ello se facilita la realización de las densitometrías.

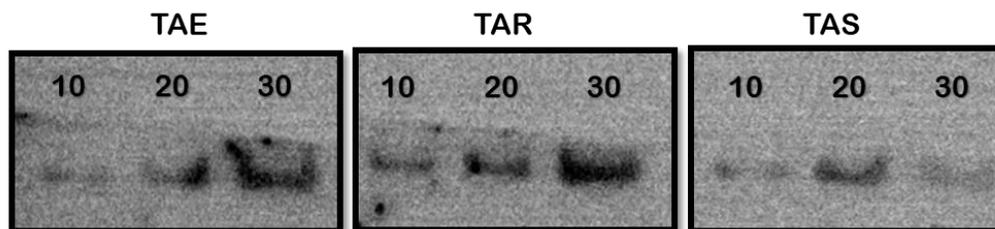
Respecto a la cantidad de proteína total de Akt, al igual que para las proteínas anteriores, se seleccionaron 20  $\mu\text{g}$  del *pool* de proteína ya que se observa una señal intermedia, ni demasiado tenues ni saturadas para los tres tejidos, mientras que los 10  $\mu\text{g}$  en TAE no se detectan bien y con 30  $\mu\text{g}$  se satura un poco en TAR (Figura 9B).



**Figura 9. Estandarización de las condiciones para detectar Akt total.** A. Se presentan las membranas con las que se evaluaron las distintas diluciones de anticuerpo contra Akt en orden de menor (1:2000) a mayor concentración (1:500) en el tejido adiposo epididimal (TAE) en el retroperitoneal (TAR) y en el subcutáneo (TAS). Las muestras son un pool de las diferentes condiciones experimentales. Las líneas punteadas sobre las diluciones de 1:2000 y 1:1,500 indican cortes en los carriles de un mismo blot en el que originalmente estas muestras en particular quedaban alejadas. B. Se muestra el gradiente de proteína total (10, 20 y 30  $\mu\text{g}$ ) evaluado en los tres tejidos con una dilución de anticuerpo de 1:1000. Tejido adiposo epididimal (TAE), tejido adiposo retroperitoneal (TAR), tejido adiposo subcutáneo (TAS). Las muestras son un pool de las diferentes condiciones experimentales.

En la Figura 10 se presenta la inmunodetección de pAkt ser 473 con la dilución de anticuerpo de 1:500, estandarizada previamente en el laboratorio, en un blot con gradiente de proteína. Dado que dicha proteína se expresa poco, la imagen obtenida en el fotodocumentador muestra algo de ruido de fondo. Se muestra el gradiente de la concentración de total para la

detección de la proteína pAkt ser 473. Para esta proteína se seleccionaron también 20  $\mu$ g ya que es la señal que mejor se detecta en los tres tejidos, a comparación de 10  $\mu$ g que casi no se distingue en TAE ni TAS, o bien para 30  $\mu$ g que casi no se distinguen en TAS.



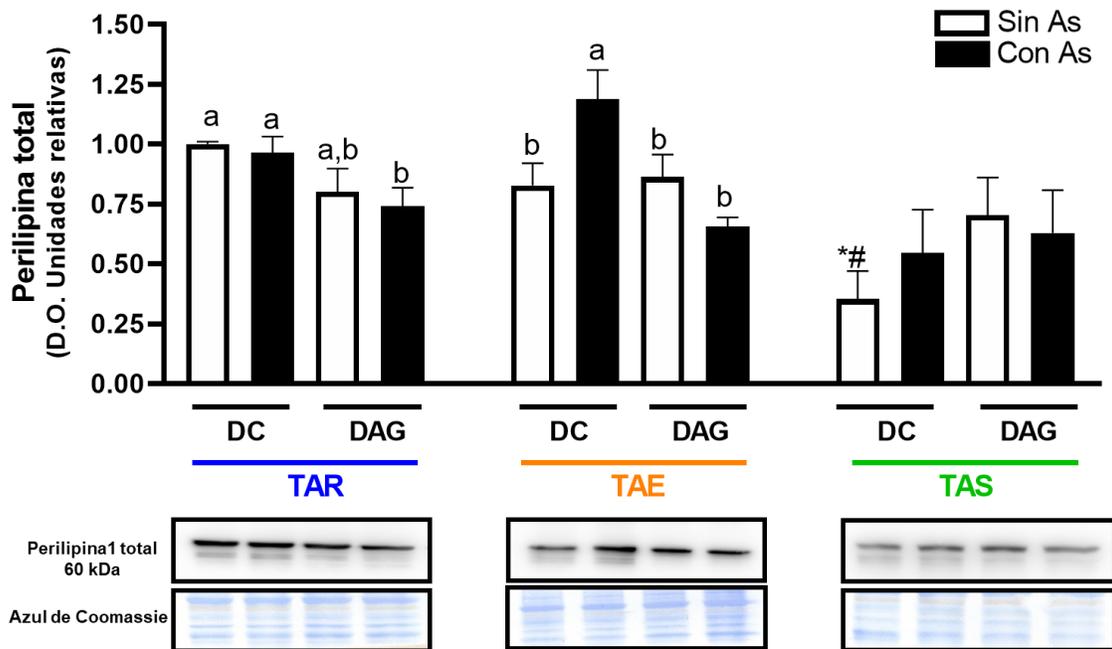
**Figura 10. Estandarización de las condiciones para detectar pAkt 473.** Se presentan las membranas con la dilución de anticuerpo de 1:500 (dilución previamente estandarizada por el grupo de trabajo) en el tejido adiposo epididimal (TAE) en el retroperitoneal (TAR) y en el subcutáneo (TAS). Las muestras son un pool de las diferentes condiciones experimentales.

En resumen, en las Tablas 3 y 4, así como las figuras 7-10 se presentan las pruebas necesarias realizadas para establecer las condiciones óptimas de las 4 proteínas a evaluar por medio de Western blot en los cuatro grupos experimentales que permitieron hacer el experimento reproducible.

## **2. Abundancia de la proteína perilipina-1 en los tejidos adiposos de los ratones con tratamiento**

Con el fin de evaluar la regulación positiva de la lipólisis estimulada en uno de sus sitios estratégicos, se evaluó en primer lugar la abundancia de perilipina total bajo el efecto de la dieta alta en grasa con y sin exposición a 100 µg/L de arsenito en agua (Figura 11).

De manera fisiológica, el TAS presenta menor abundancia de perilipina total en comparación con el TAR y TAE. En cuanto a las diferencias entre grupos, en el TAR la combinación DAG-As disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) la abundancia de perilipina total en un 26% con respecto a la condición control (DC). En cambio, en el TAE sólo el arsénico DC-As indujo de manera significativa ( $p < 0.05$ ) la abundancia de perilipina total en un 42%. Por el contrario, en el TAS no se observan diferencias entre ninguno de los cuatro grupos, por lo que en este tejido no se observa el efecto del arsénico, de la dieta alta en grasa o de la combinación de ambos (Figura 11).

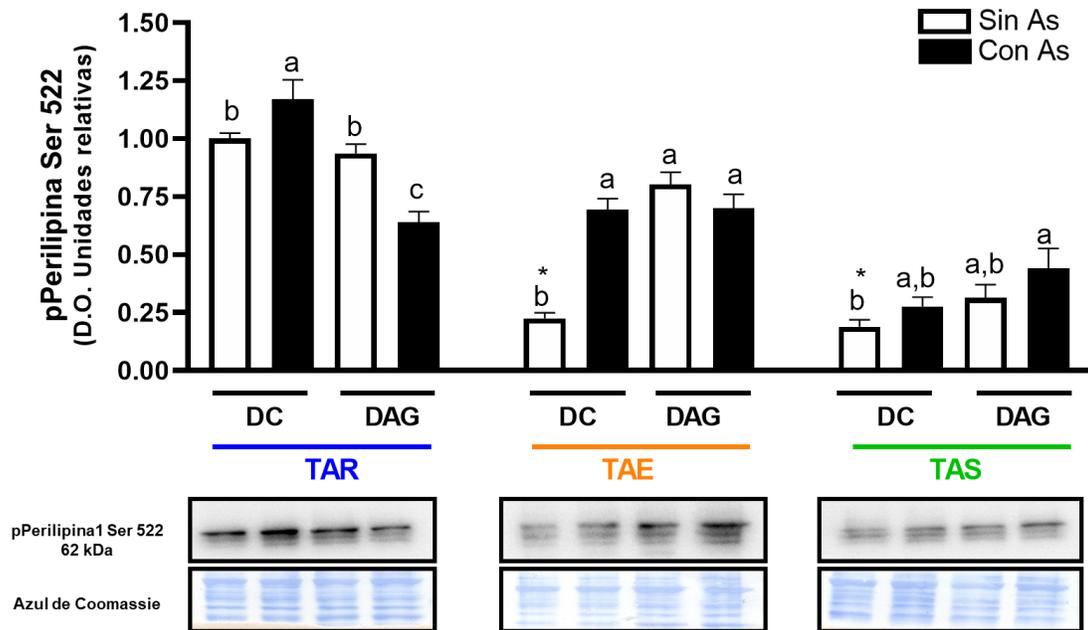


**Figura 11. Abundancia de la proteína perilipina-1 total.**- Tejido adiposo retroperitoneal (TAR), tejido adiposo epididimal (TAE) y tejido adiposo subcutáneo (TAS) expuestos a dieta control (DC) y a dieta alta en grasa (DAG), sin exposición a arsénico (barras blancas) y con exposición a 100 µg/L de arsenito de sodio (barras negras). En la parte inferior se encuentran los blots representativos de Perilipina total con un peso molecular de 62 kDa y la tinción de la proteína total con azul de Coomassie para la normalización. Media ± EEM de 4 experimentos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, post hoc LSD-Fisher, donde  $a > b$ ,  $p < 0.05$ . (\*) Diferencias estadísticas respecto al grupo control (DC) de TAR. (#) Diferencias estadísticas respecto al grupo control (DC) de TAE.

### **3. Abundancia de la proteína perilipina fosforilada en el residuo ser 522 en los tejidos adiposo de los ratones con tratamiento.**

Posteriormente, se evaluó la activación de la lipólisis estimulada a través de la fosforilación de activación de la proteína perilipina en el sitio de serina 522 tras la exposición a una dieta alta en grasa con y sin 100 µg/L arsenito en el agua de bebida (Figura 12).

De manera fisiológica, el TAR es el tejido con mayor abundancia de p-perilipina 522 en aproximadamente un 80% más con respecto a TAE y TAS. En cuanto a las diferencias entre grupos, en TAR se encontró que el arsénico por sí sólo (DC-As) induce una mayor abundancia significativa ( $p < 0.05$ ) de p-perilipina 522 con respecto al control en un 17%, mientras que cuando se combina DAG-As se reduce de forma significativa ( $p < 0.05$ ) en aproximadamente una tercera parte. En el TAE, los grupos con arsénico DC-As, DAG y la combinación de ambos (DAG-As), elevan de manera significativa ( $p < 0.05$ ) la abundancia de p-perilipina 522 con una marcada magnitud de aproximadamente 3 veces, sin ser diferentes entre ellas tres. En el TAS se observó que sólo la combinación DAG-As induce un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de aproximadamente el doble de proteína fosforilada con respecto al DC (Figura 12).

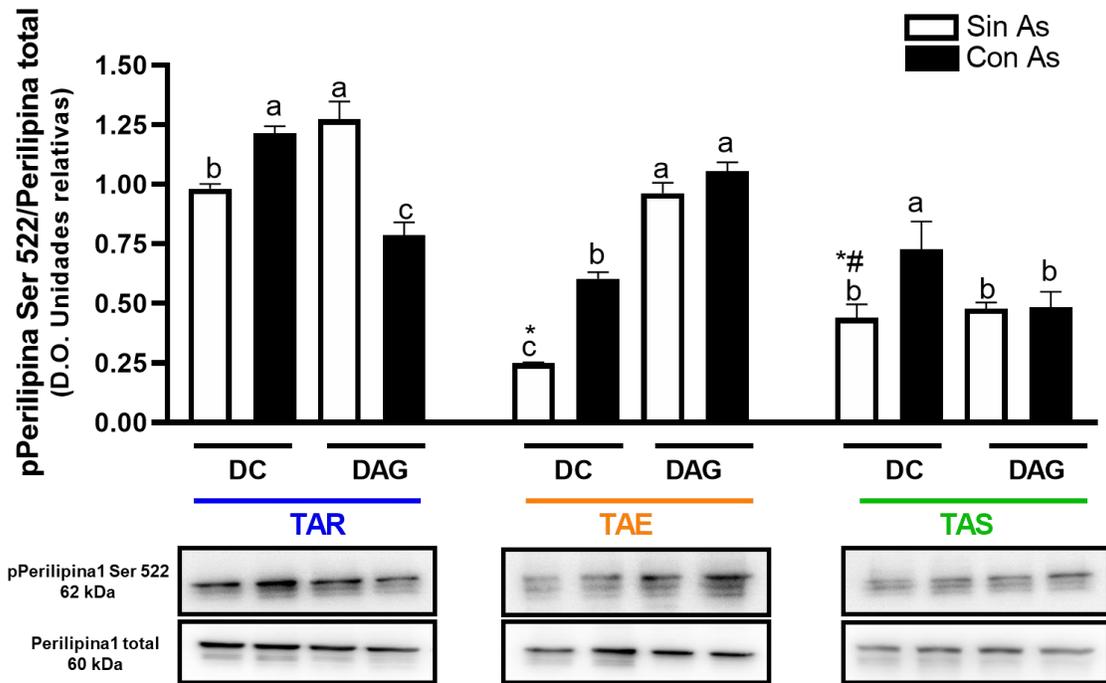


**Figura 12. Abundancia de la proteína p-perilipina 522.**- Tejido adiposo retroperitoneal (TAR), tejido adiposo epididimal (TAE) y tejido adiposo subcutáneo (TAS) expuestos a dieta control (DC) y a dieta alta en grasa (DAG), sin exposición a arsénico (barras blancas) y con exposición a 100 µg/L de arsenito de sodio (barras negras). En la parte inferior se encuentran los blots representativos de p-perilipina 522 con un peso molecular de 62 kDa y la tinción de la proteína total con azul de Coomassie para la normalización. Media ± EEM de 4 experimentos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, post hoc LSD-Fisher,  $a > b > c$ ,  $p < 0.05$ . (\*) Diferencias estadísticas respecto al grupo control (DC) de TAR.

#### **4. Proporción de perilipina fosforilada (Ser522) respecto a la perilipina total en los tejidos adiposos de los ratones con tratamiento**

Con el fin de determinar la proporción proteína fosforilada activada con respecto a la proteína total, se determinó la relación p-perilipina ser 522/perilipina (Figura 13).

De manera fisiológica se puede observar que en el TAR hay una mayor proporción de proteína activada con respecto a TAE en un 75% y a TAS en un 57%. Se pueden observar diferencias importantes entre los 4 grupos experimentales de cada tejido. En el TAR, se encontró que en DC-As y la DAG, cada uno de manera individual, inducen una activación de perilipina significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) y en la misma magnitud de aproximadamente un 25% con respecto a DC. Por el contrario, la combinación DAG-As produce un efecto contrario que disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) la proporción activada de perilipina en un 22%, con respecto a la condición control. En el TAE, el DC-As duplica la proporción de activación de p-perilipina mientras que la DAG y la combinación DAG-As aumentan ( $p < 0.05$ ) aproximadamente 3 veces más. En el TAS, sólo en DC-As se aumenta la proporción de activación de p-perilipina de manera significativa ( $p < 0.05$ ) en un 63% (Figura 13).

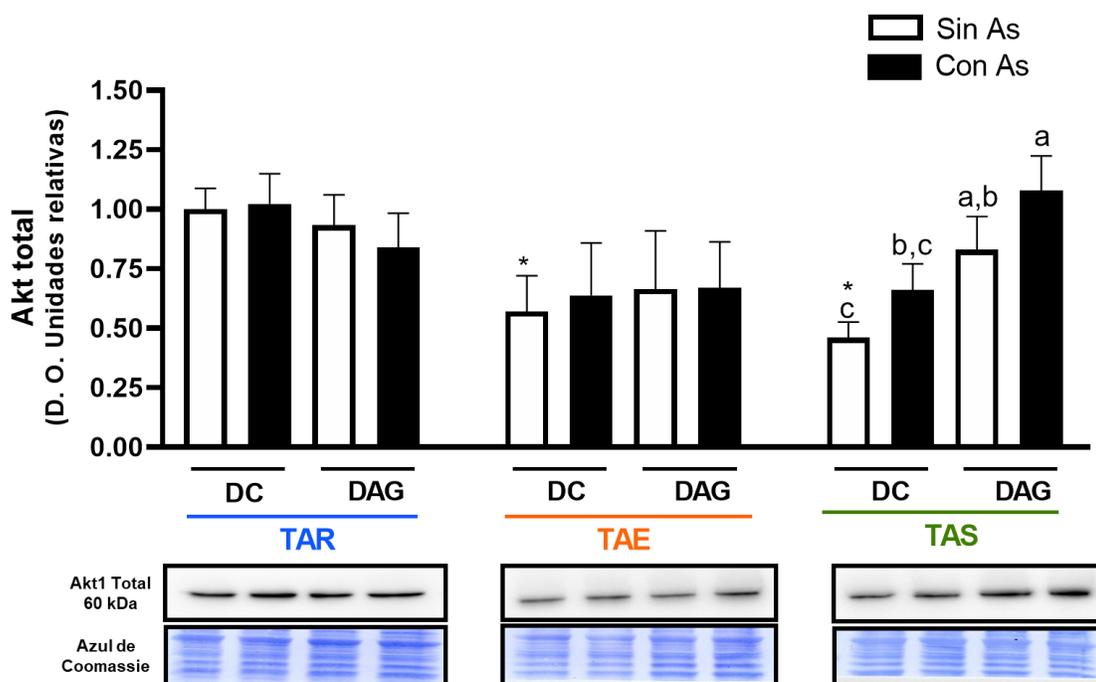


**Figura 13. Proporción fosforilada de p-perilipina 522 respecto a perilipina total.-** Tejido adiposo retroperitoneal (TAR), tejido adiposo epididimal (TAE) y tejido adiposo subcutáneo (TAS) expuestos a dieta control (DC) y a dieta alta en grasa (DAG), sin exposición a arsénico (barras blancas) y con exposición a 100 µg/L de arsenito de sodio (barras negras). En la parte inferior se encuentran los blots representativos la pPerilipina Ser 522 sobre la Perilipina total, con un peso molecular de 62 kDa y 60 kDa, respectivamente. Media ± EEM de 4 experimentos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, post hoc LSD-Fisher,  $a > b > c$ ,  $p < 0.05$ . (\*) Diferencias estadísticas respecto al grupo control (DC) de TAR. (#) Diferencias estadísticas respecto al grupo control (DC) de TAE.

## **5. Abundancia de la proteína Akt-1 en los tejidos adiposos de los ratones con tratamiento.**

Con el objetivo de evaluar la vía de señalización y resistencia a los efectos anti lipolíticos de la insulina, primero se determinó el efecto de los dos tipos de dieta con y sin exposición a 100 µg/L de arsenito en el agua de bebida sobre la abundancia de la proteína Akt total (Figura 14).

De manera fisiológica se puede observar que el TAR tiene casi el doble de abundancia de Akt total de forma significativa con respecto a TAE y TAS. En cuanto al efecto entre los grupos experimentales, tanto en el TAR como en el TAE no se encontraron diferencias en la abundancia de Akt total entre los cuatro grupos. Por el contrario, en el TAS la DAG casi duplica la abundancia de Akt y la combinación DAG-As aumenta Akt aproximadamente 1.3 veces, ambos casos de forma significativa ( $p < 0.05$ ) (Figura 14).

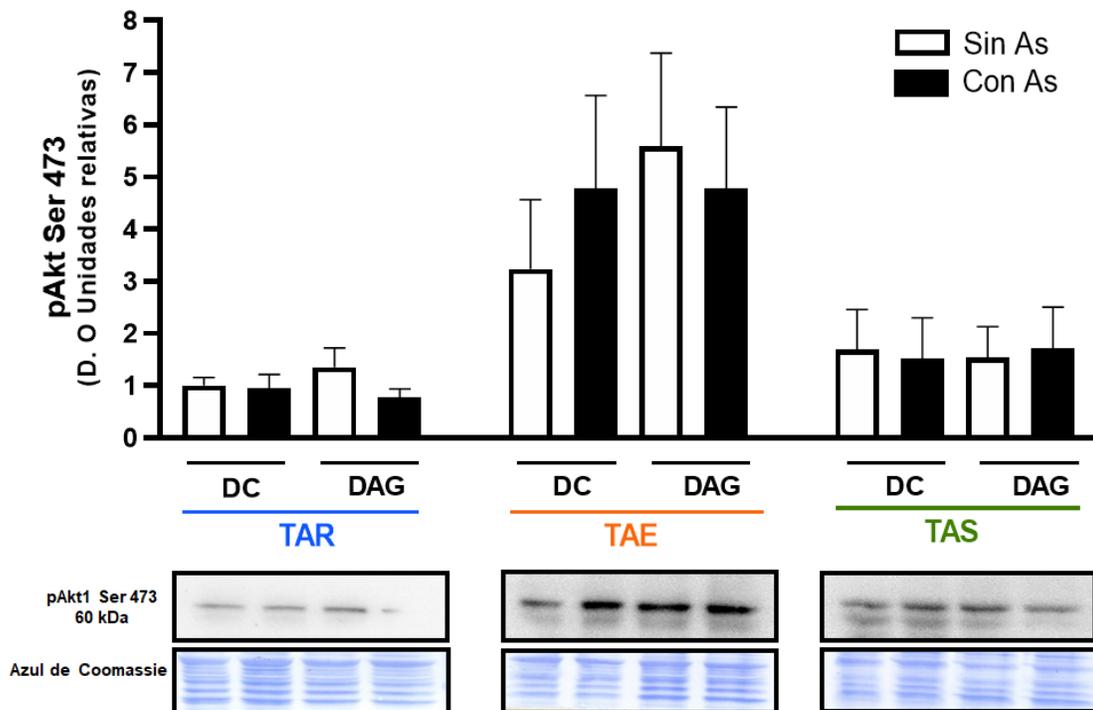


**Figura 14. Abundancia de la proteína Akt total.-** Tejido adiposo retroperitoneal (TAR), tejido adiposo epididimal (TAE) y tejido adiposo subcutáneo (TAS) expuestos a dieta control (DC) y a dieta alta en grasa (DAG), sin exposición a arsénico (barras blancas) y con exposición a 100  $\mu\text{g/L}$  de arsenito de sodio (barras negras). En la parte inferior se encuentran los blots representativos de Akt total con un peso molecular de 60 kDa y la tinción de la proteína total con azul de Coomassie para la normalización. Media  $\pm$  EEM de 4 experimentos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, post hoc LSD-Fisher, donde  $a > b > c$ ,  $p < 0.05$ . (\*) Diferencias estadísticas respecto al grupo control (DC) de TAR.

## **6. Abundancia de la proteína Akt fosforilada en el residuo ser 473 en los tejidos adiposos de los ratones con tratamiento**

Dado que la cantidad de Akt activado por fosforilación en condiciones de ayuno nos habla del proceso de resistencia a la insulina, también se evaluó la abundancia de la proteína fosforilada Akt en el sitio de activación ser 473, como sitio estratégico de la vía de señalización de la insulina y efecto anti lipolítico de la insulina (Figura 15).

De manera fisiológica entre los tres tejidos en las DC, no se observan diferencias significativas. Sin embargo, en TAE la abundancia de pAkt de manera general tiende a ser mayor que en los otros dos tejidos. En TAR, el grupo DAG-As muestra una tendencia a disminuir con respecto a los otros 3 grupos experimentales. Por el contrario, en TAE tanto en la condición DC-As, DAG, así como la combinación DAG-As, muestran una tendencia a aumentar con respecto al DC (Figura 15).

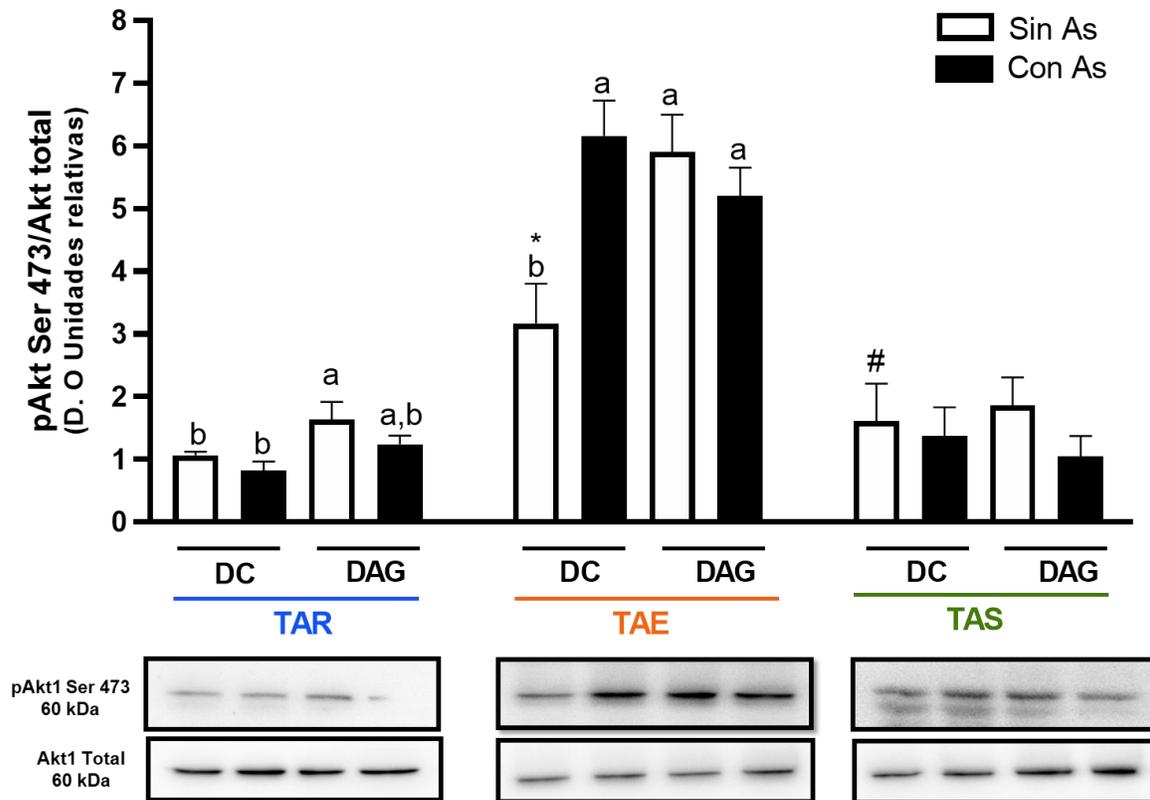


**Figura 15. Abundancia de la proteína pAkt 473.-** Tejido adiposo retroperitoneal (TAR), tejido adiposo epididimal (TAE) y tejido adiposo subcutáneo (TAS) expuestos a dieta control (DC) y a dieta alta en grasa (DAG), sin exposición a arsénico (barras blancas) y con exposición a 100 µg/L de arsenito de sodio (barras negras). En la parte inferior se encuentran los blots de pAkt Ser 473 con un peso molecular de 60 kDa y la tinción de la proteína total con azul de Coomassie para la normalización. Media ± EEM de 4 experimentos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, post hoc LSD-Fisher,  $p < 0.05$ .

## **7. Proporción de Akt fosforilada (ser 473) respecto a Akt total en los tejidos adiposos de los ratones con tratamiento.**

Con el fin de evaluar la proporción de proteína fosforilada activada en el sitio de ser 473 con respecto a la total se determinó la relación pAkt/Akt total para los tres tejidos (Figura 16).

En cuanto a las diferencias a nivel fisiológico, es decir, para el grupo DC, el TAE expresa el triple de proteína fosforilada con respecto a TAR y 1.5 veces más que el TAS. En lo que respecta a las diferencias entre grupos, para el TAR se encontró que sólo la DAG eleva la proporción fosforilada y activada de Akt en un 59%. En cambio, en TAE, el arsénico por sí solo DC-As, DAG y la combinación de ambos DAG-As incrementan la activación de pAkt significativamente ( $p < 0.05$ ) al doble que la condición control sin diferencias entre estos tres grupos. Por el contrario, en TAS no se observa el efecto de activación por el arsénico, la dieta o ambas (Figura 16).



**Figura 16. Proporción fosforilada de pAkt 473 respecto a Akt total.-** Tejido adiposo retroperitoneal (TAR), tejido adiposo epididimal (TAE) y tejido adiposo subcutáneo (TAS) expuestos a dieta control (DC) y a dieta alta en grasa (DAG), sin exposición a arsénico (barras blancas) y con exposición a 100 µg/L de arsenito de sodio (barras negras). En la parte inferior se encuentran los blots de la pAk Ser 473 sobre la Akt total, ambas con un peso molecular de 60 kDa. Media ± EEM de 4 experimentos independientes por duplicado. ANOVA de una vía, post hoc LSD-Fisher,  $a > b$ ,  $p < 0.05$ . (\*) Diferencias estadísticas respecto al grupo control (DC) de TAR. (#) Diferencias estadísticas respecto al grupo control (DC) de TAE.

## DISCUSIÓN

La primera parte de este trabajo consistió en validar y estandarizar la concentración de proteína total y la dilución de los anticuerpos que se emplearon para los Western blots. Esta etapa es de gran importancia dado que aun cuando los proveedores proporcionan información general sobre la concentración a usar de los anticuerpos, y la cantidad de proteína recomendada, existen variaciones que dependen de las condiciones de cada experimento y el tipo de tejido a evaluar, las cuales afectan el rendimiento del anticuerpo y la linealidad de los datos, lo cual repercute sobre el análisis e interpretación de los resultados. Por ello, se debe validar de forma experimental que los anticuerpos la concentración utilizada sea la óptima para cada proteína de interés (Pillai-Kastoori et al., 2020). Por otro lado, la cantidad de proteína total a cargar en el gel depende de cada muestra y es importante establecerla para conocer la sensibilidad del método así como para evitar de igual forma que la señal se sature o se queme por exceso de anticuerpo o bien no se detecte la proteína y esto afecte el análisis de los datos. De manera general se prueba la linealidad de la señal con un cargado de proteína en un rango de 5 a 50  $\mu\text{g}$ , en este estudio en particular se probaron de 10 a 30  $\mu\text{g}$  y la mejor señal fue la intermedia, es decir, 20  $\mu\text{g}$ .

Este paso de estandarización lleva un tiempo considerable ya que se deben de evaluar diferentes combinaciones de concentración de proteína total y diluciones de anticuerpo para cada proteína de interés a evaluar, para asegurarse que todas las muestras tengan las mejores condiciones que asegure contar con un método sensible para detectar variaciones entre las muestras.

La perilipina-1 es uno de los sitios estratégicos que activan la lipólisis estimulada por lo que se evaluó de manera individual la abundancia de perilipina total, su fosforilación en serina 522 y se calculó la proporción fosforilada de activación para cada tejido bajo la hipótesis que la dieta alta en grasa disminuye dicha la proporción de activación y, dicho efecto negativo se ve exacerbado en combinación con arsénico, produciendo como resultado una disminución en la lipólisis estimulada, la cual fue detectada previamente a través de la medición del índice de lipólisis.

Fisiológicamente se observó que TAE y TAR, los tejidos viscerales, tienen más perilipina total que TAS. El TAR tiene más proteína fosforilada en la serina 522 y tanto TAR como TAE conservan una mayor relación de activación perilipina 522/perilipina total con respecto a TAS, lo cual puede indicar que son los depósitos con mayor capacidad para realizar lipólisis estimulada. En apoyo a lo anterior, se ha descrito en la literatura que el tejido adiposo visceral tiene una mayor actividad lipolítica estimulada por catecolaminas ya que tiene mayor cantidad de beta adrenoreceptores en comparación con el tejido subcutáneo (Arner, 1995).

En este estudio la perilipina total presentó únicamente una tendencia a disminuir en el grupo alimentado sólo con DAG con respecto al grupo control, lo que contrasta con Bae y colaboradores (2017), quienes observaron una disminución de perilipina tejido adiposo visceral abdominal de ratones C57BL/6. Sin embargo, en el trabajo de Bae et al. (2017) la exposición a la DAG fue de 22 semanas (vs 16 semanas de este trabajo) y con mayor contenido de grasa en la dieta (45% kcal de grasa). Del mismo modo, Gaidhu y colaboradores (2010) también observaron una disminución de perilipina en ratones de la misma cepa alimentados por 8 semanas con un mucho mayor contenido de grasa en la dieta (60% kcal de grasa). No obstante, es interesante recalcar que la combinación DAG-As es suficiente para disminuir la abundancia de perilipina únicamente en TAR mientras que en TAE aumenta la abundancia por efecto del únicamente del arsénico (DC-As).

En el presente trabajo, los resultados observados en TAR revelan que no hay una disminución por efecto del arsénico (DC-As) sobre la abundancia de perilipina mientras que en TAE sí ocurre un efecto por el arsénico (DC-As), elevando la abundancia de perilipina. Estos resultados difieren con lo descrito por Garciafigueroa y colaboradores (2013), quienes encontraron que la misma concentración de 100 µg/mL de arsénico por 5 semanas disminuye la abundancia de perilipina del tejido epididimal de ratones C57BL/6. Estas diferencias pudieran deberse a otros factores como el tipo de dieta, el ayuno, o el ciclo de luz/obscuridad, sin embargo, son datos que no se muestran en el trabajo. Adicionalmente, en el trabajo sólo se realizó un solo western blot con todas las muestras de los ratones y pareciera que tuvieron problemas técnicos, ya que en los extremos de la membrana sí se aprecian bandas.

Al estimar la proporción de perilipina total activada en serina 522, se demostró que en el TAR ocurre una disminución de manera combinada por la DAG-As. Lo anterior coincide con los resultados previamente obtenidos por este laboratorio donde se encontró que la relación de activación/inactivación pHSL Ser 660/pHSL Ser 655 también disminuye en DAG-As de TAR. (Tello-Casillas, 2020). Los resultados de fosforilación tanto de perilipina como de HSL evaluados a nivel molecular explican la disminución del índice de lipólisis por DAG-As a nivel sistémico, visto previamente en el laboratorio (Calderón-Du Pont, en proceso). Estos datos en conjunto aportan evidencia que el tejido visceral retroperitoneal es el que contribuye en mayor medida al efecto negativo de la combinación entre DAG y As sobre la lipólisis estimulada, característica del ayuno.

Una posible forma de evaluar el efecto que tiene la combinación de DAG-As sobre el tejido adiposo, sería mediante la evaluación de PKA, la cual es la enzima que fosforila y activa tanto a perilipina como HSL durante la lipólisis estimulada. Se describe en la literatura que los adipocitos viscerales y subcutáneos de pacientes humanos con obesidad presentan una disminución en la actividad de PKA tanto en la lipólisis basal como en la estimulada y, de igual forma, ambos tejidos presentan una disminución en la actividad lipolítica (evaluada a través de la liberación de glicerol), inclusive es más pronunciado sobre el tejido visceral (Mantovani et al., 2009). De tal forma que si el exceso de tejido adiposo característico de la obesidad ya ejerce un efecto sobre PKA, se podría evaluar el efecto combinado con arsénico.

En el tejido adiposo la proteína Akt al igual que en el músculo e hígado es uno de los sitios estratégicos en la vía de señalización de insulina. La fosforilación en el residuo de serina 473 es la señal de activación en este caso para inhibir la lipólisis estimulada. Al activarse Akt, por un lado, activa a la PDE la cual incrementa los valores de AMP a partir del AMPc. Como consecuencia se activa la cinasa AMPK y esta fosforila a la HSL en su sitio de inactivación. Por otro lado, la Akt también activa a la fosfatasa PP1 la cual elimina las fosforilaciones de activación en la perilipina y en HSL, frenando así la lipólisis presente en el ayuno. Durante el ayuno, con concentraciones muy bajas de insulina, Akt debe de estar mínimamente activada (Liu et al., 2009).

En el presente estudio se evaluó el efecto de la dieta alta en grasa con y sin exposición a arsénico bajo la hipótesis que la dieta alta en grasa aumenta la fosforilación de Akt en la serina 473 en el estado de ayuno y, dicho efecto negativo se ve exacerbado en combinación con arsénico como indicador de resistencia al efecto anti lipolítico de la insulina en el tejido adiposo. De tal forma que se evaluó la abundancia de las proteínas de manera individual, es decir, Akt total, Akt fosforilada Ser 473 y más importante, la proporción fosforilada o de activación. Al observar la relación de activación entre la proteína total y fosforilada en TAE se observó que sí hay una mayor proporción de activación en los grupos DC-As, DAG y DAG-As con respecto a DC aunque no se observa el efecto combinado del arsénico con la dieta alta en grasa. En lo que respecta al TAR sólo se observó que hay una mayor proporción fosforilada en el grupo DAG. Estos resultados, particularmente el aumento de la proporción fosforilada o activada por la DAG en TAR y TAE concuerdan con lo reportado por Liu et al, quienes demuestran que en estado basal y en presencia de resistencia a la insulina hay un aumento de pAkt ser 473 normalizado a Akt tanto en hígado como músculo gastrocnemio de ratones C56BL/6 alimentados por cuatro semanas con una dieta de casi 60% de kcal de grasa (Liu et al., 2009), sugiriendo resistencia a la insulina.

No obstante, los resultados difieren con lo encontrado por Li y colaboradores (2019), quienes evaluaron también pAKT ser 473 en el tejido adiposo de ratones de la cepa C57BL/6J en estado de ayuno por 24 horas luego de 12 semanas bajo una dieta alta en grasa (60% de kcal de grasa). Ellos demostraron que el índice de resistencia a la insulina en tejido adiposo (ADIPO-IR, del inglés Adipose tissue insulin resistance index) aumenta cerca de 10 veces en los animales alimentados con DAG junto con una disminución en el mensajero de Akt como en la proporción de Akt fosforilada, con respecto a los ratones con dieta control. Sin embargo, sus resultados no son del todo comparables con los de este trabajo ya que el contenido de grasa en la dieta es mucho mayor al igual que las horas de ayuno, ya que las 24 h de ayuno que tenían los animales al momento de obtener los tejidos pudieron influir en el metabolismo. Adicionalmente, Li y colaboradores (2019) , no especifican el tipo de tejido adiposo blanco evaluado y los ratones eran más jóvenes que los que se presentan en este trabajo. Del mismo modo, Bae y colaboradores (2016) también evaluaron pAkt ser 473 en músculo soleo de ratas Sprague-Dawley alimentadas por 15 semanas con una dieta alta en grasa (40% de kcal de grasa) y reportan valores elevados del modelo homeostático para

evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR, del inglés homeostasis model assessment-estimated insulin resistance) junto con una disminución de pAkt Ser 473 en el músculo. Sin embargo, cabe destacar que eran ratones de otra cepa y de menor edad a los descritos en este trabajo.

Por otro lado, se sabe que el arsénico a concentraciones de 25 y 50 mg/L perturba la homeostasis de glucosa en ratones C57BL/6 al mantener elevada la glucosa postprandial y, tras una dieta alta en grasa (58% kcal de grasa) el mismo efecto se mantiene (Paul et al., 2011). A nivel molecular Paul y colaboradores demostraron *in vitro* en adipocitos 3T3-L1 que con concentraciones elevadas de arsénico inorgánico (50  $\mu$ M por 4 h) se disminuye la fosforilación de activación de Akt tras la activación de la vía de la insulina (Paul, Harmon, et al., 2007A).

En relación a los resultados obtenidos en este trabajo, considerando el estado de ayuno, y que la concentración de arsénico que se utilizó es ambientalmente relevante (100  $\mu$ g/L), en TAE se observa que los grupos DC-As, DAG y DAG-As son los que mantienen más elevado la proporción fosforilada de activación de Akt, indicando que la vía se encuentra activa en un estado dónde no debería, es decir, la vía se encuentra desensibilizada y por lo tanto en el postprandio es probable que exista resistencia a los efectos anti lipolíticos de la insulina. Sin embargo, cabe mencionar que no se observó el efecto exacerbado ocasionado por la combinación de dieta alta en grasa y arsénico. Con base en el antecedente del laboratorio, donde se observó a nivel sistémico que la combinación de DAG-As aumenta la resistencia a la insulina del tejido a adiposo, evaluado a través de dos índices, con estas mediciones a nivel molecular se demuestra que en parte el TAE contribuye a dicha resistencia a la insulina más no muestra el efecto exacerbado por efecto de la combinación de dieta alta en grasa y arsénico juntos.

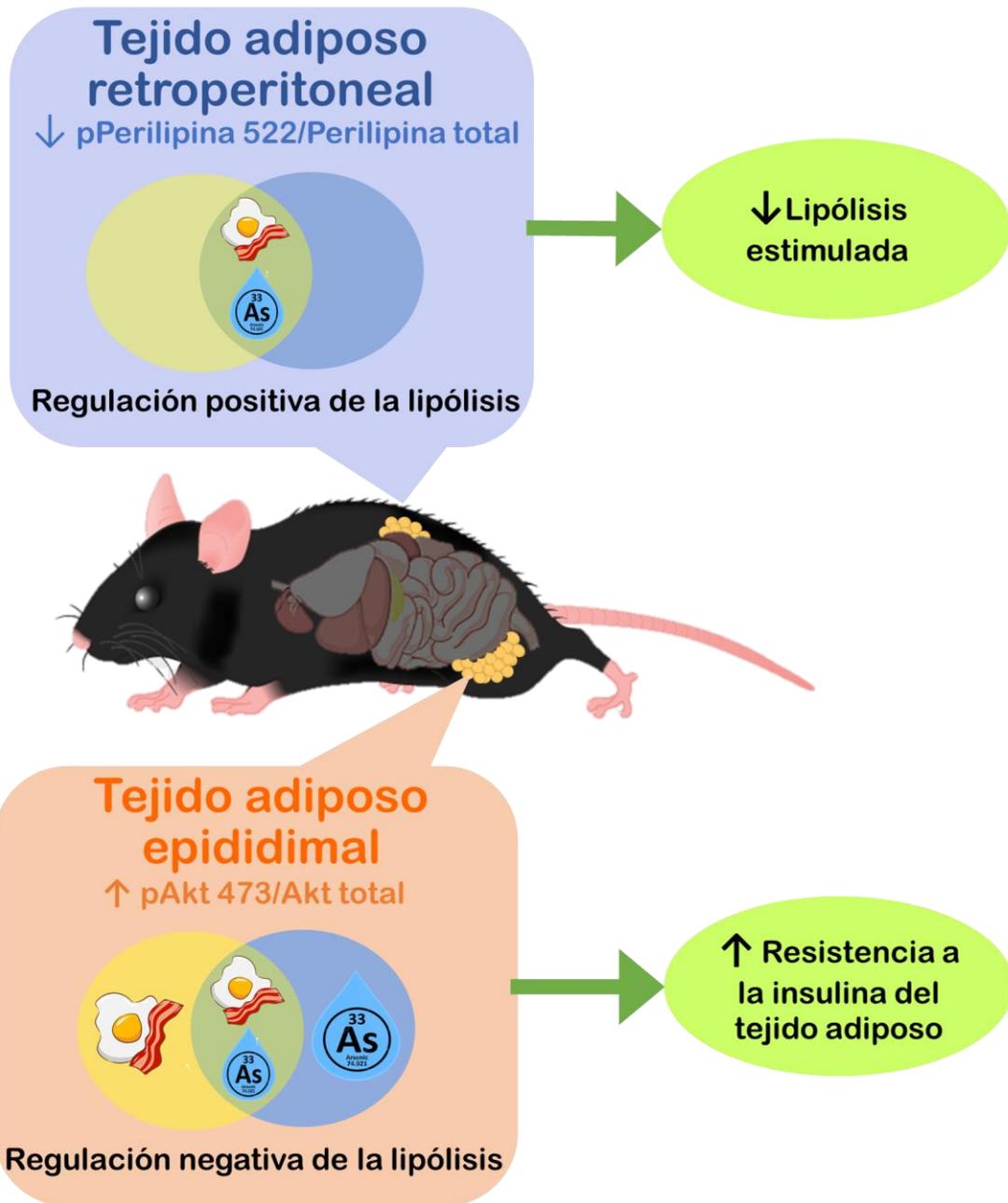
En explicación a lo anterior, PDK es una de las proteínas que participa en la vía de señalización de la insulina y en su estado activo es la mediadora río arriba que se encarga de fosforilar a Akt. Ya se ha reportado que en adipocitos 3T3-L1 tratados *in vitro* con 50  $\mu$ M de arsénico inorgánico por 4 h e insulina, la actividad de PDK disminuye y con ello disminuye también la proporción fosforilada de Akt en ser 473 y en consecuencia también la captura de glucosa (Paul, Harmon, et al., 2007A). Con base en este antecedente y sabiendo

que son muy pocos los estudios que evalúan la resistencia a los efectos anti lipolíticos de la insulina en ayuno, sería importante evaluar el efecto del arsénico y la dieta alta en grasa sobre PDK-1 con el fin de determinar si se encuentra elevada y con ello se pudiera explicar el aumento de la proporción fosforilada de pAkt en TAE.

Sin embargo, para tener un panorama más amplio del efecto de la dieta alta en grasa con y sin arsénico y poder comparar sobre el comportamiento del metabolismo de ácidos grasos y la resistencia a los efectos anti lipolíticos de la insulina en el tejido adiposo, a futuro se podría evaluar a las proteínas de la vía de señalización de insulina tanto en ayuno como en postprandio.

## **CONCLUSIONES**

En el tejido adiposo retroperitoneal la regulación positiva de la lipólisis, evaluada a través de la proporción de perilipina fosforilada en la serina 522, se disminuye principalmente por efecto de la combinación entre la dieta alta en grasa y el arsénico, lo cual se traduce en una disminución de la lipólisis estimulada. En el tejido adiposo epididimal la regulación negativa de la lipólisis, evaluada a través de la proporción de Akt fosforilada en la serina 473, aumenta por el arsénico, la dieta alta en grasa y la combinación de ambos aumentan, lo que sugiere que es el tejido que más contribuye a la resistencia del efecto anti lipolítico de la insulina en el tejido adiposo. La regulación de la lipólisis es diferente entre los tipos de tejidos adiposos viscerales y el subcutáneo, donde los mayores efectos negativos se producen en los viscerales, aunque dicha regulación es heterogénea en cada uno de los depósitos viscerales.



**Figura 17: Conclusión gráfica.-** En los tejidos adiposos de ratones macho C57BL/6 se encontró que la lipólisis estimulada disminuye por efecto de la combinación entre dieta alta en grasa con arsénico, principalmente en el tejido adiposo retroperitoneal. La resistencia a la insulina del tejido adiposo se presenta por efecto de la dieta alta en grasa, el arsénico y la combinación de ambos, principalmente en el tejido adiposo epididimal.

## **PERSPECTIVAS**

- Evaluar en el postprandio el efecto del arsénico en combinación con la DAG sobre la lipólisis estimulada y el efecto anti lipolítico de la insulina en tejido adiposo blanco.
- Evaluar la activación de PKA por los efectos de la DAG y con arsénico que ayuden a explicar la disminución de la proporción fosforilada de perilipina y HSL río arriba.
- Evaluar la interacción entre ATGL y su coactivador CGI58 con el fin de estudiar el efecto de la disminución de la activación de perilipina río abajo en la vía de la lipólisis estimulada.
- Evaluar la actividad de la cinasa PDK que ayude a explicar el aumento en la proporción fosforilada de Akt en la vía de señalización de insulina.
- Evaluar la actividad de fosfodiesterasa PDE, la activación de fosfatasa PP1 y la cinasa AMPK, con el fin de estudiar la resistencia al efecto anti lipolítico de la insulina en el tejido adiposo.

## REFERENCIAS

1. Agency for Toxic Substances and Disease, (ASTDR). (2010). *What is Arsenic?* [https://www.atsdr.cdc.gov/csem/arsenic/what\\_arsenic.html](https://www.atsdr.cdc.gov/csem/arsenic/what_arsenic.html)
2. Ahangarpour, A., Alboghobeish, S., Orooijan, A. A., Zeidooni, L., Samimi, A., & Afshari, G. (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. Ahangarpour, A., Alboghobeish, S., Rezaei, M., Javad-Khodayar, M., Akbar-Orooijan, 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.
4. Ahangarpour, A., Orooijan, A. A., Alboghobeish, S., Khorsandi, L., & Moradi, M. (2019). Toxic Effects of Chronic Exposure to High-Fat Diet and Arsenic on the Reproductive System of the Male Mouse. *Journal of Family and Reproductive Health Email:*, 13(4), 181–190.
5. Ahangarpour, A., Orooijan, A. A., Rezaei, M., Khodayar, M. J., & Alboghobeish, S. (2017). Effects of butyric acid and arsenic on isolated pancreatic islets and liver mitochondria of male mouse. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 10(1), 44–53.
6. Ahangarpour, A., Zeidooni, L., Samimi, A., Alboghobeish, S., Khorsandi, L., & Moradi, M. (2018). Chronic exposure to arsenic and high fat diet additively induced cardiotoxicity in male mice. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 47. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.220967>
7. Ahmad, S. I., & Imam, S. K. (2016). *Obesity* (S. I. Ahmad & S. K. Imam (eds.)). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19821-7>
8. Alboghobeish, S., Pashmforosh, M., Zeidooni, L., Samimi, A., & Rezaei, M. (2019). High fat diet deteriorates the memory impairment induced by arsenic in mice: a sub chronic in vivo study. *Metabolic Brain Disease*, 34(6), 1595–1606. <https://doi.org/10.1007/s11011-019-00467-4>
9. Arner, P. (1995). Differences in Lipolysis between Human Subcutaneous and Omental Adipose Tissues. *Annals of Medicine*, 27(4), 435–438. <https://doi.org/10.3109/07853899709002451>
10. Arner, P. (1999). Catecholamine-induced lipolysis in obesity. *International Journal of Obesity*, 23(1), 10–13. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0800789>
11. Arner, P. (2005). Human fat cell lipolysis: Biochemistry, regulation and clinical role. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 19(4), 471–482. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.07.004>
12. Bae, J. Y., Shin, K. O., Woo, J., Woo, S. H., Jang, K. S., Lee, Y. H., & Kang, S. (2016). Exercise and dietary change ameliorate high fat diet induced obesity and insulin resistance via mTOR signaling pathway. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, 20(2), 28–33. <https://doi.org/10.20463/jenb.2016.06.20.2.4>
13. Bae, Ju Yong, Woo, J., Roh, H. T., Lee, Y. H., Ko, K., Kang, S., & Shin, K. O. (2017). The effects of detraining and training on adipose tissue lipid droplet in obese mice after chronic high-fat diet. *Lipids in Health and Disease*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0398-x>

14. Beale, E. G., Hammer, R. E., Antoine, B., & Forest, C. (2004). Disregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *15*(3), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.02.006>
15. Bikman, B. T., & Summers, S. A. (2011). Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(11), 4222–4230. <https://doi.org/10.1172/JCI57144>
16. Bjørndal, B., Burri, L., Staalesen, V., Skorve, J., & Berge, R. K. (2011). Different Adipose Depots: Their Role in the Development of Metabolic Syndrome and Mitochondrial Response to Hypolipidemic Agents. *Journal of Obesity*, *2011*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2011/490650>
17. Bolsoni-Lopes, A., & Alonso-Vale, M. I. C. (2015). Lipolysis and lipases in white adipose tissue – An update. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, *59*(4), 335–342. <https://doi.org/10.1590/2359-3997000000067>
18. Bundschuh, J., Armienta, M. A., Morales-Simfors, N., Alam, M. A., López, D. L., Delgado Quezada, V., Dietrich, S., Schneider, J., Tapia, J., Sracek, O., Castillo, E., Marco Parra, L.-M., Altamirano Espinoza, M., Guimarães Guilherme, L. R., Sosa, N. N., Niazi, N. K., Tomaszewska, B., Lizama Allende, K., Bieger, K., ... Ahmad, A. (2021). Arsenic in Latin America: New findings on source, mobilization and mobility in human environments in 20 countries based on decadal research 2010-2020. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *51*(16), 1727–1865. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1770527>
19. Bundschuh, J., Litter, M. I., Parvez, F., Román-ross, G., Nicolli, H. B., Jean, J., Liu, C., López, D., Armienta, M. A., Guilherme, L. R. G., Gomez, A., Cornejo, L., Cumbal, L., Toujaguez, R., & Rica, C. (2012). One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. *The Science of the Total Environment*, *429*, 2–35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.024>
20. Calderón-DuPont, D., Romero-Córdoba, S., Tello-Casillas, J. K., Espinosa-Soberanis, A., Guerrero, B., Contreras, A. V., Morán-Ramos, S., & Díaz-Villaseñor, A. (Enviado 2022). Impaired white adipose tissue fatty acid metabolism in mice fed a high-fat diet worsened by arsenic exposure, primarily affecting retroperitoneal adipose tissue (Manuscript Draft).
21. Castriota, F., Acevedo, J., Ferreccio, C., Smith, A. H., Liaw, J., Smith, M. T., & Steinmaus, C. (2018). Obesity and increased susceptibility to arsenic-related type 2 diabetes in Northern Chile. *Environmental Research*, *167*(510), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.07.022>
22. Castriota, F., Rieswijk, L., Dahlberg, S., La Merrill, M. A., Steinmaus, C., Smith, M. T., & Wang, J. (2020A). A State-of-the-Science Review of Arsenic’s Effects on Glucose Homeostasis in Experimental Models. *Environmental Health Perspectives*, *128*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1289/EHP4517>
23. Castriota, F., Zushin, P.-J. H., Sanchez, S. S., Phillips, R. V., Hubbard, A., Stahl, A., Smith, M. T., Wang, J.-C., & La Merrill, M. A. (2020B). Chronic Arsenic Exposure Impairs Adaptive Thermogenesis in Male C57BL/6J Mice. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, *318*(5), E667–E677. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00282.2019>
24. Cebrian, M. E., Albores, A., Aguilar, M., & Blakely, E. (1983). Chronic arsenic poisoning in the North of Mexico. *Human Toxicology*, *2*(1), 121–133. <https://doi.org/10.1177/096032718300200110>

25. Ceja-Galicia, Z. A., Daniel, A., Salazar, A. M., Pánico, P., Ostrosky-Wegman, P., & Díaz-Villaseñor, A. (2017). Effects of arsenic on adipocyte metabolism: Is arsenic an obesogen? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 452(May), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.05.008>
26. Chait, A., & den Hartigh, L. J. (2020). Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7(February), 1–41. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>
27. Cignarelli, A., Genchi, V., Perrini, S., Natalicchio, A., Laviola, L., & Giorgino, F. (2019). Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 759. <https://doi.org/10.3390/ijms20030759>
28. Cinti, S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(5), E977–E986. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00183.2009>
29. Clifford, G. M., McCormick, D. K. T., Londos, C., Vernon, R. G., & Yeaman, S. J. (1998). Dephosphorylation of perilipin by protein phosphatases present in rat adipocytes. *FEBS Letters*, 435(1), 125–129. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01052-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01052-7)
30. Cook, A., & Cowan, C. (2009). Adipose. *StemBook*, 1–18. <https://doi.org/10.3824/stembook.1.40.1>
31. de Ferranti, S., & Mozaffarian, D. (2008). The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences. *Clinical Chemistry*, 54(6), 945–955. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.100156>
32. Díaz-Villaseñor, A., Burns, A. L., Salazar, A. M., Sordo, M., Hirirart, 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>
33. 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  $\beta$ -cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 214(1), 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.11.015>
34. Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., & Raptis, S. A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93(SUPPL. 1), S52–S59. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70014-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70014-6)
35. Dover, E. N., Beck, R., Huang, M. C., Douillet, C., Wang, Z., Klett, E. L., & Stýblo, M. (2018). Arsenite and methylarsonite inhibit mitochondrial metabolism and glucose-stimulated insulin secretion in INS-1 832/13  $\beta$  cells. *Archives of Toxicology*, 92(2), 693–704. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2074-y>
36. Drobna, Z., Styblo, M., & Thomas, D. J. (2009). An Overview of Arsenic Metabolism and Toxicity. *Current Protocols in Toxicology*, 42(431), 1–9. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0431s42>
37. Farkhondeh, T., Samarghandian, S., & Azimi-Nezhad, M. (2019). The role of arsenic in obesity and diabetes. *Journal of Cellular Physiology*, 234(8), 12516–12529. <https://doi.org/10.1002/jcp.28112>
38. Frühbeck, G. (2008). Overview of Adipose Tissue and Its Role in Obesity and Metabolic Disorders. En K. Yang (Ed.), *Adipose Tissue Protocols (Methods in Molecular Biology)* (2nd Ed., Vol. 456, pp. 1–22). Human Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-245-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-245-8_1)

39. Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J.-A., Fernández, S., & Rodríguez, A. (2014). Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutrition Research Reviews*, 27(1), 63–93. <https://doi.org/10.1017/S095442241400002X>
40. Fu, J., Woods, C. G., Yehuda-Shnaidman, E., Zhang, Q., Wong, V., Collins, S., Sun, G., Andersen, M. E., & Pi, J. (2010). Low-Level Arsenic Impairs Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cells: Involvement of Cellular Adaptive Response to Oxidative Stress. *Environmental Health Perspectives*, 118(6), 864–870. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901608>
41. Gaidhu, M. P., Anthony, N. M., Patel, P., Hawke, T. J., & Ceddia, R. B. (2010). Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: Role of ATGL, HSL, and AMPK. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 298(4), 961–971. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00547.2009>
42. García-Rico, L., Valenzuela-Rodríguez, M. P., Meza-Montenegro, M. M., & Lopez-Duarte, A. L. (2020). Arsenic in rice and rice products in Northwestern Mexico and health risk assessment. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 13(1), 25–33. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1678672>
43. 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>
44. Gasevic, D., Kohli, S., Khan, N., & Lear, S. A. (2014). Abdominal Adipose Tissue and Insulin Resistance: The Role of Ethnicity. En R. R. Watson (Ed.), *Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity* (pp. 125–140). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407869-7.00012-X>
45. Ghibaudi, L., Cook, J., Farley, C., van Heek, M., & Hwa, J. J. (2002). Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obesity research*, 10(9), 956–963. <https://doi.org/10.1038/oby.2002.130>
46. González-Muniesa, P., Martínez-González, M.-A., Hu, F. B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., Moreno, L. A., Bray, G. A., & Martínez, J. A. (2017). Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17034. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>
47. Green, A. (2006). Principles of Molecular Medicine. En M. S. Runge & C. Patterson (Eds.), *Principles of Molecular Medicine* (2nd Ed.). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-59259-963-9>
48. Grün, F., & Blumberg, B. (2006). Environmental obesogens: Organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology*, 147(6), 50–55. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1129>
49. Grün, F., & Blumberg, B. (2009). Endocrine disruptors as obesogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304(1–2), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.018>
50. Gutiérrez-Alcalá, R. (2019, abril 30). *Normal, la presencia de arsénico en el agua mineral*. Gaceta UNAM. <https://www.gaceta.unam.mx/normal-la-presencia-de-arsenico-en-el-agua-mineral/>
51. Hariri, N., & Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*, 23(2), 270–299. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000168>
52. Healthy Babies Bright Futures. (2017). *Arsenic in 9 Brands of Infant Cereal*. <https://www.hbbf.org/arsenic-infant-rice-cereal>

53. Heindel, J. J. (2019). History of the Obesogen Field: Looking Back to Look Forward. *Frontiers in Endocrinology*, 10(January), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00014>
54. Heindel, J. J., Blumberg, B., Cave, M., Machtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M. A., Nadal, A., Palanza, P., Panzica, G., Sargis, R., & Vandenberg, L. N. (2017). Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reproductive Toxicology*, 68, 3–33. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.10.001>
55. 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(903), 61–66. <https://doi.org/10.4081/monaldi.2018.903>
56. Hou, Y., Xue, P., Woods, C. G., Wang, X., Fu, J., Yarborough, K., Qu, W., Zhang, Q., Andersen, M. E., & 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>
57. Huang, C. F., Yang, C. Y., Chan, D. C., Wang, C. C., Huang, K. H., Wu, C. C., Tsai, K. S., Yang, R. Sen, & Liu, S. H. (2015). Arsenic exposure and glucose intolerance/insulin resistance in estrogen-deficient female mice. *Environmental Health Perspectives*, 123(11), 1138–1144. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408663>
58. Ibrahim, M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews*, 11(1), 11–18. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x>
59. Instituto Nacional de Salud Pública. (2018). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*. <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/informes.php>
60. International Agency for Research on Cancer, & World Health Organization. (2012). A review of human carcinogens. Part C: Arsenic, metals, fibres, and dusts/ IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2009: Lyon, France). En *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. (Vol. 100C). International Agency for Research on Cancer.
61. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2011). Evaluation of certain contaminants in food: seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. En *WHO Technical Report Series*. WHO Press.
62. Li, H., Yu, L., & Zhao, C. (2019). Dioscin attenuates high-fat diet-induced insulin resistance of adipose tissue through the IRS-1/PI3K/Akt signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 19(2), 1230–1237. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9700>
63. Liu, H.-Y., Hong, T., Wen, G.-B., Han, J., Zuo, D., Liu, Z., & Cao, W. (2009). Increased basal level of Akt-dependent insulin signaling may be responsible for the development of insulin resistance. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 297, 898–906. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00374.2009.-A>
64. Liu, S., Guo, X., Wu, B., Yu, H., Zhang, X., & Li, M. (2014). Arsenic induces diabetic effects through beta-cell dysfunction and increased gluconeogenesis in mice. *Scientific Reports*, 4(1), 6894. <https://doi.org/10.1038/srep06894>
65. Liu, T., Liang, X., Lei, C., Huang, Q., Song, W., Fang, R., Li, C., Li, X., Mo, H., Sun, N., Lv, H., & Liu, Z. (2020). High-Fat Diet Affects Heavy Metal Accumulation and Toxicity to Mice Liver and Kidney Probably via Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 11(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01604>

66. Luo, L., & Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *Journal of Endocrinology*, 231(3), R77–R99. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0211>
67. Luong, Q., & Lee, K. Y. (2018). The Heterogeneity of White Adipose Tissue. En *Adipose Tissue* (pp. 177–206). InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76898>
68. Mantovani, G., Bondioni, S., Alberti, L., Gilardini, L., Invitti, C., Corbetta, S., Zappa, M. A., Ferrero, S., Lania, A. G., Bosari, S., Beck-Peccoz, P., & Spada, A. (2009). Protein kinase A regulatory subunits in human adipose tissue: Decreased R2B expression and activity in adipocytes from obese subjects. *Diabetes*, 58(3), 620–626. <https://doi.org/10.2337/db08-0585>
69. Martin, E. M., Stýblo, M., & Fry, R. C. (2017). Genetic and epigenetic mechanisms underlying arsenic-associated diabetes mellitus: a perspective of the current evidence. *Epigenomics*, 9(5), 701–710. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0097>
70. McDonough, P. M., Maciejewski-Lenoir, D., Hartig, S. M., Hanna, R. A., Whittaker, R., Heisel, A., Nicoll, J. B., Buehrer, B. M., Christensen, K., Mancini, M. G., Mancini, M. A., Edwards, D. P., & Price, J. H. (2013). Differential Phosphorylation of Perilipin 1A at the Initiation of Lipolysis Revealed by Novel Monoclonal Antibodies and High Content Analysis. *PLoS ONE*, 8(2), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055511>
71. Morigny, P., Boucher, J., Arner, P., & Langin, D. (2021). Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. *Nature Reviews Endocrinology*, 17(5), 276–295. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00471-8>
72. Mustieles, V., & Arrebola, J. P. (2020). How polluted is your fat? What the study of adipose tissue can contribute to environmental epidemiology. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 74(5), 401–407. <https://doi.org/10.1136/jech-2019-213181>
73. Nielsen, T. S., Jessen, N., Jørgensen, J. O. L., Møller, N., & Lund, S. (2014). Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *Journal of Molecular Endocrinology*, 52(3), R199–R222. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0277>
74. Organización Mundial de la Salud. (2018). *Arsénico*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>
75. Organización Mundial de la Salud. (2020). *Obesidad y Sobrepeso*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
76. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos. (2020). *Overweight or obese population (indicator)*. <https://doi.org/10.1787/86583552-en>
77. Padmaja-Divya, S., Pratheeshkumar, P., Son, Y.-O., Vinod Roy, R., Andrew Hitron, J., Kim, D., Dai, J., Wang, L., Asha, P., Huang, B., Xu, M., Luo, J., & Zhang, Z. (2015). Arsenic Induces Insulin Resistance in Mouse Adipocytes and Myotubes Via Oxidative Stress-Regulated Mitochondrial Sirt3-FOXO3a Signaling Pathway. *Toxicological Sciences*, 146(2), 290–300. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv089>
78. Paul, D. S., Harmon, A. W., Devesa, V., Thomas, D. J., & Styblo, M. (2007A). 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>

79. Paul, D. S., Hernández-Zavala, A., Walton, F. S., Adair, B. M., Dědina, J., Matoušek, T., & Stýblo, M. (2007B). Examination of the effects of arsenic on glucose homeostasis in cell culture and animal studies: Development of a mouse model for arsenic-induced diabetes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222(3), 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.01.010>
80. Paul, D. S., Walton, F. S., Saunders, R. J., & Stýblo, M. (2011). Characterization of the Impaired Glucose Homeostasis Produced in C57BL/6 Mice by Chronic Exposure to Arsenic and High-Fat Diet. *Environmental Health Perspectives*, 119(8), 1104–1109. <https://doi.org/10.1289/ehp.1003324>
81. PHE Centre for Radiation Chemical and Environmental Hazards. (2016). Arsenic Toxicological Overview. En *Compendium of Chemical Hazards: Arsenic*. <https://doi.org/10.4324/9780203994559-14>
82. Pillai-Kastoori, L., Heaton, S., Shiflett, S. D., Roberts, A. C., Solache, A., & Schutz-Geschwender, A. R. (2020). Antibody validation for Western blot: By the user, for the user. *Journal of Biological Chemistry*, 295(4), 926–939. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010472>
83. Podgorski, J., & Berg, M. (2020). Global threat of arsenic in groundwater. *Science*, 368(6493), 845–850. <https://doi.org/10.1126/science.aba1510>
84. Poret, J. M., Souza-Smith, F., Marcell, S. J., Gaudet, D. A., Tzeng, T. H., Braymer, H. D., Harrison-Bernard, L. M., & Primeaux, S. D. (2018). High fat diet consumption differentially affects adipose tissue inflammation and adipocyte size in obesity-prone and obesity-resistant rats. *International Journal of Obesity*, 42(3), 535–541. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.280>
85. Quansah, R., Armah, F. A., Essumang, D. K., Luginaah, I., Clarke, E., Marfoh, K., Cobbina, S. J., Nketiah-Amponsah, E., Namujju, P. B., Obiri, S., & 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>
86. Ritter, O., Jelenik, T., & Roden, M. (2015). Lipid-mediated muscle insulin resistance: different fat, different pathways? *Journal of Molecular Medicine*, 93(8), 831–843. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1310-2>
87. Rosas, I., Belmont, R., Armienta, A., & Baez, A. (1999). Arsenic Concentrations in Water, Soil, Milk and Forage in Comarca Lagunera, Mexico. *Water, Air, and Soil Pollution*, 112, 133–149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1005095900193>
88. Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2014). Review What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell*, 156(1–2), 20–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>
89. Schoettl, T., Fischer, I. P., & Ussar, S. (2018). Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *The Journal of Experimental Biology*, 221(Suppl 1), 1–17. <https://doi.org/10.1242/jeb.162958>
90. Secretaría de Salud. (2000). *Modificación a la NOM-127-SSA1-1994. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.* Diario Oficial de la Federación. [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=2063863&fecha=31/12/1969](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=2063863&fecha=31/12/1969)
91. Secretaría de Salud. (2015). *NORMA Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2015, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias.* [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5420977&fecha=22/12/2015](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5420977&fecha=22/12/2015)

92. Sethi, J. K., & Vidal-Puig, A. J. (2011). Adipose Tissue Development, Structure and Function. En R. S. Ahima (Ed.), *Metabolic Basis of Obesity* (pp. 53–68). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1607-5>
93. Smith, U., & Kahn, B. B. (2016). Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. *Journal of Internal Medicine*, 280(5), 465–475. <https://doi.org/10.1111/joim.12540>
94. 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>
95. Summers, S. A., Whiteman, E. L., & Birnbaum, M. J. (2000). Insulin signaling in the adipocyte. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 24(Suppl 4), S67-70. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801509>
96. Świdarska, E., Strycharz, J., Wróblewski, A., Szemraj, J., Drzewoski, J., & Śliwińska, A. (2018). Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake. En L. Szablewski (Ed.), *Blood Glucose Levels* (pp. 1–18). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73823>
97. Szablewski, L. (2019). Introductory Chapter: Adipose Tissue. En *Adipose Tissue - An Update* (p. 3). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88420>
98. Sztalryd, C., & Brasaemle, D. L. (2017). The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(10), 1221–1232. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.009>
99. Sztalryd, C., & Kimmel, A. R. (2014). Perilipins: Lipid droplet coat proteins adapted for tissue-specific energy storage and utilization, and lipid cytoprotection. *Biochimie*, 96, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.08.026>
100. Tello-Casillas, J. K. (2020). *Efecto del Arsénico en Presencia de una Dieta Alta en Grasa Sobre el Metabolismo Lipolítico del Tejido Adiposo Visceral y Subcutáneo* [Tesis de Maestría]. Universidad Anáhuac.
101. Trouba, K. J., Wauson, E. M., Vorce, R. L., & Trouba, C. H. (2000). Sodium Arsenite Inhibits Terminal Differentiation of Murine C3H 10T1/2. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 168(1), 25–35. <https://doi.org/10.1006/taap.2000.9012>
102. Veiga-Lopez, A., Pu, Y., Gingrich, J., & Padmanabhan, V. (2018). Obesogenic Endocrine Disrupting Chemicals: Identifying Knowledge Gaps. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(9), 607–625. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.06.003>
103. Walton, F. S., Harmon, A. W., Paul, D. S., Drobna, 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>
104. Wauson, E. M., Langan, A. S., & Vorce, R. L. (2002). Sodium arsenite inhibits and reverses expression of adipogenic and fat cell-specific genes during in vitro adipogenesis. *Toxicological Sciences*, 65(2), 211–219. <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.2.211>

105. Wilson, D., Hooper, C., & Shi, X. (2012). Arsenic and lead in juice: Apple, citrus, and apple-base. *Journal of Environmental Health*, 75(5), 14–21.
106. Xue, P., Hou, Y., Zhang, Q., Woods, C. G., Yarborough, K., Liu, H., Sun, G., Andersen, M. E., & Pi, J. (2011). Prolonged inorganic arsenite exposure suppresses insulin-stimulated AKT S473 phosphorylation and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes: Involvement of the adaptive antioxidant response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(2), 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.024>
107. Yadav, S., Anbalagan, M., Shi, Y., Wang, F., & Wang, H. (2013). Arsenic inhibits the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells by down-regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma and CCAAT enhancer-binding proteins. *Toxicology in Vitro*, 27(1), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.012>
108. Zhang, C., Fennel, E. M. J., Douillet, C., & Stýblo, M. (2017). Exposures to arsenite and methylarsonite produce insulin resistance and impair insulin-dependent glycogen metabolism in hepatocytes. *Archives of Toxicology*, 91(12), 3811–3821. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2076-9>
109. Zwick, R. K., Guerrero-Juarez, C. F., Horsley, V., & Plikus, M. V. (2018). Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metabolism*, 27(1), 68–83. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.002>

## APÉNDICE A: REACTIVOS

*Tabla 5: Información comercial de los reactivos*

Nombre	Casa comercial	No. Catálogo
PVDF	Bio-Rad	162-0177
Acrilamida	Bio-Rad	1610101
Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250)	Thermo Fisher Scientific	20278
Bis acrilamida	Bio-Rad	161-0201
cOmplete mini (Inhibidores de proteasas)	Roche	11836153001
Desoxicolato de sodio	Sigma	
Glicina	Sigma	G8898
Igepal ® CA-630	Sigma	I8896
Immobilon® ECL	Merck Millipore	WBKL50100
Laemmli 4X	Bio-Rad	161-0747
Leche baja en grasa (Blotting-Grade Blocker)	Bio-Rad	170-6404
Metanol grado HPLC	Karal	2100
NaCl	J.T Baker	3624-05
Ponceau-S	Sigma Aldrich	P3504-10G
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standard	Bio-Rad	161-0375
Protein Assay Kit	Bio-Rad	5000112
Reactivo A	Bio-Rad	500-0113
Reactivo B	Bio-Rad	500-011
Reactivo S	Bio-Rad	500-0115
SDS	Bio-Rad	1610301
Tris-Base	Bio-Rad	161-0719
Tris-HCl	Promega	
Tween ® 20	Sigma	P7949
β-mercaptoetanol	Bio-Rad	161-0710

**Bio-Rad, Inc.** Hercules, California, EUA.

**Merck Millipore** Burlington, Massachussets, EUA.

**Karal** León, Guanajuato, México.

**Roche** Basilea, Suiza.

**Sigma San Louis, Missouri, EUA**

**Thermo Fisher Scientific** Waltham, Massachusetts, EUA.

## APÉNDICE B: ANTICUERPOS

*Tabla 6: Información comercial de los anticuerpos*

<b>Anticuerpo</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>No. Catálogo</b>	<b>PM (kDa)</b>	<b>Secundario</b>
Perilipin-1 (D1D8) XP®	Cell Signaling	9349	62	Anti-rabbit
Anti-P-Perilipin 1-Serine 522	Vala Sciences	4856	57	Anti-mouse
anti Akt-1	Cell Signaling	9272	60	Anti-rabbit
Phospho-Akt1 (Ser473) (D7F10) XP®	Cell Signaling	9018	60	Anti-rabbit
Anti-mouse	ImmunoReagents, Inc)	GtxMu-003-DHRPX	N/A	NA
Anti-rabbit	ImmunoReagents, Inc	GtxRb-003-DHRPX	N/A	NA

**Cell Signaling Technology**, Danvers, Massachusetts, EUA

**Vala Sciences**, San Diego, California, EUA

**ImmunoReagents, Inc.** Raleigh, Carolina del Norte, EUA