



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

“Morfohistología y cantidad de triglicéridos acumulados en el tejido adiposo subcutáneo 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

BRENDA ANDREA GUERRERO VILLEGAS



Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
VOCAL: ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ
SECRETARIO: ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR
1er. SUPLENTE: SOFÍA MORÁN RAMOS
2° SUPLENTE: EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ASESOR DEL TEMA: ANDREA SACHI DIAZ VILLASEÑOR

firma)

SUSTENTANTE : GUERRERO VILLEGAS BRENDA ANDREA

firma)

DEDICATORIAS

A COY POR SER LAS COLUMNAS DE MI TEMPLO, POR ENSEÑARME CON SU AMOR Y CON SU EJEMPLO. QUE EL HECHO DE HABER COINCIDIDO EN ESTA VIDA ES ALGO QUE AGRADECERÉ POR EL RESTO DE MI VIDA.

A MIS HERMANOS DANIEL Y CYNTHIA POR ACONSEJARME, POR ESTAR SIEMPRE CONMIGO Y POR SIEMPRE ANIMARME CON SUS MILES DE TONTERÍAS.

A MI MAMÁ POR TODAS ESA NOCHES DE DESVELO EN LAS QUE ME HICISTE COMPAÑÍA Y ESA TAZA DE CAFÉ QUE NUNCA FALTO.

A MI PAPÁ POR SIEMPRE ALENTARME A CUMPLIR MIS SUEÑOS Y POR CONFIAR EN MÍ.

A MI PRIMO ALE POR SU APOYO Y AMOR INCONDICIONAL.

A MI PRIMA YAYA POR SU PACIENCIA, ENSEÑANZA, COMPAÑÍA Y ALENTARME A SIEMPRE SEGUIR ADELANTE.

A BERTHA, EDUARDO, JUAN Y CAMILA POR HACERME SENTIR PARTE DE SU FAMILIA Y REGALARME UN SEGUNDO HOGAR.

A MIS AMIGOS LUPITA, RICARDO Y FER PORQUE SIN USTEDES ESTE CAMINO NO HABRÍA SIDO EL MISMO.

“HAY UNA SALIDA QUE ESPERA POR CADA LABERINTO EN EL QUE TE METAS, ERES UNO MIENTRAS LA BUSCAS Y PASAS A SER OTRO EN CUANTO LA ENCUENTRAS” – CHOJIN

AGRADECIMIENTOS

A LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM) POR EL APOYO ECONÓMICO MEDIANTE EL PROYECTO DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLOGÍA (PAPIIT) CON NUMERO IN216420.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT) POR EL APOYO ECONÓMICO CON NUMERO 304038.

A LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

AL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

A MI TUTORA, DRA. ANDREA DÍAS VILLASEÑOR POR EL APOYO BRINDADO, POR SUS CONSEJOS, PACIENCIA Y CONFIANZA DURANTE EL DESARROLLO DEL PROYECTO

A MI COMPAÑERA DIANA CALDERÓN, POR ENSEÑARME MUCHO DE ESTE PROYECTO Y SER UNA GRAN INSPIRACIÓN PARA CONVERTIRME EN UNA CIENTÍFICA EJEMPLAR.

ÍNDICE

• 1.....	Resumen	1
• 2. Introducción		3
• 3. Antecedentes		5
3.1. Sobrepeso y obesidad		5
3.2. Disfuncionalidad del Tejido Adiposo Blanco en la obesidad.....		6
3.4. Exposición a arsénico		9
• 4. Planteamiento del problema y Justificación		12
• 5. Hipótesis		13
• 6. Objetivo general		13
6.1. Objetivos específicos.....		13
• 7. Diseño experimental.....		14
8.1. Animales, dieta y exposición a arsénico.....		15
8.2. Ganancia de peso.....		16
8.3. Consumo de alimento.....		16
8.4. Obtención de tejido adiposo blanco subcutáneo		16
8.5. Estrategia experimental.....		18
8.6. Histologías.....		18
8.7 Número Relativo de adipocitos		19
8.8. Determinación de triglicéridos en tejido adiposo blanco subcutáneo		19
8.9. Cuantificación de triglicéridos		19
8.10. Análisis estadístico.....		20
• 9. Resultados		21
9.1. Ganancia de peso corporal y cantidad de tejido adiposo blanco subcutáneo (TAS).....		21
9.2. Histologías del tejido adiposo subcutáneo (TAS)		24
9.3. Tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo subcutáneo.....		25
9.4. Contenido de triglicéridos por adipocito.....		27
• 11. Conclusión.....		32
• 12. Perspectivas		33
• 13. Referencias		34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño experimental.....	14
Figura 2. Estrategia experimental.....	18
Figura 3. Porcentaje de tejido adiposo blanco subcutáneo (TAS) en función del peso corporal.....	22
Figura 4. Consumo de alimento en gramos al día por ratón.....	23
Figura 5. Consumo de energía (kcal) al día por ratón.....	23
Figura 6. Histologías del tejido adiposo subcutáneo	24
Figura 7. Tamaño de adipocitos del tejido adiposo subcutáneo	25
Figura 8. Frecuencia relativa del tamaño de adipocitos en el tejido adiposo subcutáneo	26
Figura 9. Número relativo de adipocitos en el tejido adiposo subcutáneo.....	27
Figura 10. Contenido de triglicéridos por adipocito.	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución y Composición de la Dieta cambiar la tabla a blanco y negro	15
Tabla 2. Fuentes de grasa en las dietas	16
Tabla 3. Ganancia de peso corporal con respecto al peso inicial	21

1. Resumen

Los diferentes depósitos de tejido adiposo blanco (subcutáneo y visceral), además de tener una localización distinta, tienen características metabólicas que varían entre ellos respondiendo de forma diferente a condiciones fisiológicas y patológicas, como en la obesidad y el síndrome metabólico. La obesidad es una enfermedad causada por el aumento de la masa de células adiposas blancas, debido a un incremento en el número de adipocitos (hiperplasia) o por el agrandamiento de los adipocitos por la acumulación de triglicéridos (hipertrofia), siendo la hipertrófica la que se encuentra asociada con la desregulación metabólica, favoreciendo la lipotoxicidad y la resistencia a la insulina.

Una de las funciones más importantes del tejido adiposo subcutáneo es la amortiguación metabólica, ya que tiene la capacidad de expandirse en respuesta a una ingesta excesiva de energía. Sin embargo, la capacidad de atenuación para almacenar adecuadamente los triglicéridos en el tejido adiposo subcutáneo podría ser de relevancia fisiopatológica, ya que si existe una incapacidad para expandirse adecuadamente, esto da como resultado un aumento en el depósito de grasa en el tejido adiposo visceral.

Dentro de los principales factores de riesgo para la obesidad y enfermedades metabólicas crónicas, se encuentra principalmente la ingesta de alimentos con alto contenido energético, proveniente de los hidratos de la grasa o de carbohidratos. Sin embargo, otro de los factores son los contaminantes ambientales que actúan como disruptores del metabolismo. Si bien el arsénico es un diabetógeno, sin embargo, aún no se sabe con detalle el efecto que tiene sobre el tejido adiposo.

De tal manera que el objetivo de este estudio fue conocer los efectos de la combinación de una dieta alta en grasa con arsénico sobre la acumulación de triglicéridos y el tamaño y cantidad de adipocitos en el tejido adiposo subcutáneo.

Para ello se usaron 36 ratones machos de la cepa C57BL/6 de 8 semanas de edad, lo cuales fueron primero divididos en 2 grupos por 8 semanas (dieta control y dieta alta en grasa). Al término de esas 8 semanas, la mitad de cada grupo fue expuesta a arsenito de sodio (100 µg/L) en el agua de bebida durante 8 semanas adicionales, manteniendo cada grupo su dieta respectiva. En la semana 16 se aplicó eutanasia a los ratones y se obtuvo el tejido adiposo subcutáneo, el cual funciona como un amortiguador metabólico impidiendo el aumento de tejido adiposo visceral y lipotoxicidad en otros órganos lo cual genera resistencia a la insulina y otras alteraciones metabólicas. En dicho tejido

adiposo subcutáneo se evaluó por medio de las histologías el tamaño de adipocitos y la cantidad relativa de ellos, así como la cantidad de triglicéridos acumulados.

Los resultados muestran que los ratones alimentados con la dieta alta en grasa acumulan una mayor cantidad de triglicéridos en el tejido adiposo subcutáneo, generando un mayor número de adipocitos hipertróficos, en comparación con los ratones alimentados con dieta control. Sin embargo, el arsénico exacerba el efecto de la dieta alta en grasa, incrementando aún más la cantidad de triglicéridos almacenados y por consecuencia aumentando el porcentaje de adipocitos hipertróficos, particularmente aquellos con un área de $8-20 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ en el tejido adiposo subcutáneo.

A partir de estos datos se concluye que la exposición a arsénico incrementa el crecimiento hipertrófico del tejido adiposo subcutáneo ocasionado por la dieta alta en grasa, mediante un mayor acumulo de triglicéridos.

2. Introducción

La OMS describe a la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial prevenible, la cual se caracteriza por un exceso de grasa acumulada ocasionando el crecimiento del tejido adiposo blanco (TAB) ya sea por hipertrofia o hiperplasia [1]. De tal forma que el TAB es un órgano metabólico central en la regulación de la homeostasis energética de todo el organismo que se afecta de forma característica en el proceso de la obesidad [2]. El acúmulo excesivo de triglicéridos (TG) en el TAB de tipo visceral genera cambios metabólicos asociados a la resistencia a la insulina, así como alteraciones en la lipólisis y en la secreción de adipocinas [1]. Mientras que el TAB de tipo subcutáneo funciona como un amortiguador metabólico evitando el acumulo de grasa en el TAB de tipo visceral así como la lipotoxicidad sistémica.

Dentro de los principales factores de riesgo para la obesidad y las enfermedades metabólicas crónicas, se encuentra la ingesta de alimentos con alto contenido energético, ya sea ricos en grasa o en hidratos de carbono, así como la disminución de la actividad física. Sin embargo, estos factores por sí solos no explican por completo la etiología de dichas enfermedades metabólicas y han fracasado en su prevención y / o tratamiento. Por lo tanto, otros factores de riesgo podrían estar implicados en la etiología de la obesidad [3].

Existen contaminantes ambientales y químicos catalogados como disruptores químicos del metabolismo con capacidad de producir una alteración endocrina debido a que interfieren con las acciones de las hormonas, actuando como obesógenos y/o diabetógenos [4]. El arsénico (As) , un carcinógeno humano [5], ha sido también catalogado como un diabetógeno [6, 7], y es considerado como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y neurológicas, disfunciones hepáticas y renales [8]. La principal fuente de exposición a este metaloide es a través del agua de bebida, en donde se estima que más de 300 millones de personas en 70 países, incluyendo México, se encuentran expuestas por arriba de la norma internacional de 10 µg/L [9], de los cuales en algunos países se han reportado niveles de hasta 5000 mg/L [10] es decir, 500 veces más que el límite internacional.

A pesar de la capacidad diabetógena que se sabe tiene el As, se desconoce a profundidad si pudiera también alterar la funcionalidad del tejido adiposo blanco subcutáneo (TAS), y actuar así como un factor de riesgo para el desarrollo de la obesidad.

Algunas teorías recientes han propuesto que el estado de nutrición de los individuos actúa como modulador de los efectos de los contaminantes ambientales, ya sea como protector o potenciador [11]. Sin embargo, aún no existe evidencia suficiente que compruebe si el As altera el tamaño y la cantidad de triglicéridos acumulados en adipocitos del TAB, en particular el subcutáneo, ni el efecto que tiene al combinarse con una dieta alta en grasa (DAG).

3. Antecedentes

3.1. Sobrepeso y obesidad

La obesidad se caracterizan por la acumulación anormal y excesiva de grasa corporal y se acompaña de alteraciones metabólicas que incrementan el riesgo para desarrollar comorbilidades tales como: hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, así como algunas neoplasias en mama, endometrio, colon y próstata, entre otras (NOM-008-SSA3-2010) [12].

La obesidad es una enfermedad crónica que se produce por un desequilibrio entre la energía ingerida y la energía gastada. Se considera el resultado de la combinación de factores genéticos con una alimentación inadecuada y falta de actividad física regular. Este exceso de energía se almacena en los adipocitos del TAB, los cuales aumentan en tamaño (hipertrofia), en número (hiperplasia) o ambos [1, 13].

La obesidad puede diagnosticarse mediante el índice de masa corporal (IMC), que está determinado por el peso dividido entre la altura en metros cuadrados (kg/m^2), siendo considerados con sobrepeso aquellos individuos con un $\text{IMC} >25 \text{ kg}/\text{m}^2$ y con obesidad con un $\text{IMC} >30 \text{ kg}/\text{m}^2$ [14].

En México, el aumento progresivo en la prevalencia de sobrepeso y obesidad es preocupante. De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016, en niños (5 a 11 años) la prevalencia combinada fue de 33.2% , de la cual el 17.9% correspondió al sobrepeso y el 15.3% a obesidad, mientras que para adolescentes (12-19 años) la prevalencia combinada fue del 36.3%, teniendo el sobrepeso una prevalencia del 22.4% y la obesidad del 13.9%. En adultos (>20 años), la prevalencia combinada fue del 71.2 %, representando el sobrepeso el 39.2% y la obesidad el 33.3% [15].

3.2. Disfuncionalidad del Tejido Adiposo Blanco en la obesidad

Existen 3 tipos de tejido adiposo: 1) El TAB el cual se encarga de la homeostasis energética, sintetizando y liberando ácidos grasos mediante los procesos de lipogénesis y lipólisis, respectivamente, así como de la liberación de diferentes hormonas y citocinas, denominadas adipocinas [16]; 2) El tejido adiposo pardo, que se encuentra en menor proporción y es principalmente termogénico, por lo que es específico de mamíferos [17, 18] y 3) el tejido adiposo beige, el cual es TAB con adipocitos pardos y se ha visto que se induce en respuesta al frío y al ejercicio y cuenta también con actividad termogénica [19].

El TAB se compone principalmente de adipocitos, así como de pre-adipocitos, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y leucocitos, y cada vez es más reconocida su importancia sobre la regulación metabólica sistémica [20].

Los adipocitos blancos tienen una alta capacidad para almacenar energía en forma de TG. El adipocito blanco maduro se caracteriza por tener forma esférica, diámetros muy variables, y una única y voluminosa vacuola de grasa que constituye más del 90 % de su volumen total [21]. Posee una gran plasticidad estructural, pues el volumen de su vacuola grasa puede incrementarse o disminuir, dependiendo del estado funcional[22]. De todos los tipos celulares que conforman el TAB, el adipocito maduro es el principal efector de los procesos lipídicos como lipogénesis y lipólisis, los cuales se encuentran regulados por diversos agentes hormonales y bajo la influencia de otros órganos y sistemas[23].

La obesidad es la patología más frecuente asociada al TAB, la cual se caracteriza por el crecimiento exacerbado de dicho tejido a través de un incremento en el número (hiperplasia) y/o tamaño de los adipocitos (hipertrofia) [1]. Esta desregulación en el tejido adiposo por el incremento en la acumulación excesiva de TG se asocia a desórdenes sistémicos y trastornos metabólicos relacionados con la obesidad [24, 25], como síndrome metabólico, diabetes tipo 2, hipertensión y la acumulación ectópica de grasa en diversos tejidos y órganos, conocida como lipotoxicidad [26].

La hipertrofia o aumento en el tamaño de los adipocitos, es el resultado del excedente de energía que se deposita eficientemente en forma de TG en los adipocitos a través de los procesos de *lipogénesis de novo* o bien debido a un aumento en la captura de TG circulantes, provenientes de la dieta y/o de

otros órganos. Este aumento en el almacenamiento de TG en los adipocitos aumenta el tamaño de la vacuola lipídica, lo que resulta en hipertrofia [27]. El TAB también puede aumentar por hiperplasia, al incrementar el número de adipocitos presentes en el tejido adiposo, lo cual sucede por medio de la estimulación de la adipogénesis, en donde los pre-adipocitos continúan su diferenciación hasta adipocitos maduros aumentando la capacidad de almacenar una mayor cantidad de grasa en el tejido [1, 13].

Anatómicamente, en humanos el TAB comprende 2 depósitos principales: tejido adiposo subcutáneo (TAS) y el tejido adiposo visceral (TAV). El TAV se encuentra en la cavidad abdominal rodeando a los órganos internos y se subdivide en depósitos mesentérico, omental, perirrenal y peritoneal, mientras que el TAS se extiende por todo el cuerpo debajo de la piel [28].

Actualmente, se sabe que los diferentes depósitos de tejido adiposo (subcutáneo y visceral), además de tener una localización distinta, tienen características metabólicas que varían entre ellos respondiendo de forma diferente a condiciones fisiológicas y patológicas, como en la obesidad y el síndrome metabólicos [29, 30].

El TAS constituye la mayor parte de la masa adiposa del cuerpo y una de sus funciones más importantes es el de la amortiguación metabólica, ya que tiene la capacidad de expandirse en respuesta a una ingesta excesiva de energía. De esta manera, ejerce cierta protección contra disfunciones metabólicas, ya que la grasa queda almacenada de manera no tóxica para el resto del organismo, evitando la aparición y el crecimiento del TAV y evitando la lipotoxicidad en órganos como el músculo, hígado y páncreas, lo cual promovería la resistencia a la insulina y el déficit en la secreción de dicha hormona [31, 32].

La expansión del TAB puede ocurrir tanto por hipertrofia como por hiperplasia, y esto se cree que se encuentra regulado tanto por cuestiones genéticas como por el tipo de estímulo sobre energético [1]. Tanto la hipertrofia como la hiperplasia provocan un incremento en la masa corporal del organismo, sin embargo, la obesidad hipertrófica es la que se encuentra asociada con la desregulación del tejido adiposo [33]. En la obesidad por crecimiento hipertrófico del tejido adiposo, los adipocitos existentes llegan a su nivel máximo de almacenamiento de grasa lo que afecta la capacidad de estas células para acumular triglicéridos, favoreciendo dislipoproteinemias tales como

niveles altos de TG, niveles bajos de colesterol HDL e incremento de ácidos grasos libres en circulación [23].

La capacidad de atenuación para almacenar adecuadamente los TG en el TAS podría ser de relevancia fisiopatológica, ya que si existe una incapacidad para expandir adecuadamente el TAS, ya sea por el número de células grasas y/o por el tamaño de la vacuola lipídica, esto da como resultado un aumento en el depósito de grasa en el TAV y de forma ectópica en tejidos no adiposos como el hígado, el músculo esquelético y/o el páncreas, lo que lleva a efectos lipotóxicos [19, 34] y al desarrollo de complicaciones metabólicas [35, 36]. Por lo tanto, la distribución de la grasa, más que la masa grasa total, juega un papel importante en el desarrollo de la obesidad y sus enfermedades asociadas [37].

El aumento en el TAV causa complicaciones metabólicas asociadas al hígado, como esteatosis hepática y/o resistencia a la insulina hepática, en parte debido a que drena a la vena porta, y llegan de forma directa al hígado niveles más altos de ácidos grasos [38, 39]. Por tales razones, el TAV se ha asociado con complicaciones metabólicas y aumento del riesgo para desarrollar diabetes tipo 2, hiperlipidemia y enfermedades cardiovasculares [28].

3.3. Alimentación y dieta alta en grasa

La industrialización y el crecimiento económico de la sociedad moderna han llevado a cambios en el estilo de vida de las personas. Un fenómeno es el consumo creciente y excesivo de alimentos con alto contenido energético, proveniente de los hidratos de carbono o de grasa, que pueden llevar eventualmente al desarrollo de la obesidad debido a la afectación del sistema homeostático.

La DAG puede alterar tanto a la mucosa como a la microbiota gastrointestinales, induciendo daño debido a un aumento en el número y/o tamaño de los adipocitos, por lo que es un factor de riesgo importante para el desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2, un estado caracterizado por una inflamación crónica de bajo grado generada por aumento en la secreción de TNF- α , IL-1, IL-6, y la acumulación de macrófagos proinflamatorios en el tejido adiposo [40, 41].

En investigaciones previas, sujetos que consumieron una DAG, presentaron un incremento inicial de la acumulación de tejido adiposo, sin que el peso corporal aumentara significativamente; sin

embargo, después de tres semanas se encontró un aumento del peso corporal e hipertrofia de los adipocitos del TAV [42]. Adicionalmente, se ha demostrado en roedores, con el modelo de obesidad inducida por dieta, que el consumo crónico de dietas obesogénicas, además de favorecer el aumento del tejido adiposo y el incremento del peso corporal, también induce alteraciones metabólicas [43].

3.4. Exposición a arsénico

El aumento en la disponibilidad a alimentos de alto contenido energético y la disminución de los niveles de actividad física se han identificado como los principales factores de riesgo para la creciente prevalencia de sobrepeso, obesidad y enfermedades metabólicas crónicas en los últimos 30 años {Bhurosy, 2012}. Sin embargo, estos factores por sí solos no explican completamente el fenómeno y han fallado en la prevención y/o en el tratamiento de estas enfermedades metabólicas. Por lo tanto, otros factores de riesgo podrían estar involucrados en la etiología de la obesidad [3].

Se ha propuesto que varios contaminantes ambientales y productos químicos, la mayoría de ellos catalogados como disruptores endocrinos, son capaces de alterar e interferir con las acciones hormonales, actuando como obesógenos y/o diabetógenos {Gore, 2015;Grun, 2009;Holtcamp, 2012;Kuo, 2013} Incluso, con el fin de incluir a más enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad, el término de disruptores endocrinos se ha ido modificando y en la actualidad a este tipo de compuestos con capacidad de intervenir en el desarrollo de obesidad, diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, esteatosis hepática y síndrome metabólico, se les conoce como Disruptores Químicos del Metabolismo (también conocidos como MDC por sus siglas en inglés) [4, 44].

Diversos compuestos han demostrado alterar la diferenciación de los adipocitos, y varios disruptores químicos del metabolismo modulan la fisiología de los adipocitos [45]. Sin embargo, el As no se ha definido como un obesógeno, a pesar de que es un factor de riesgo considerable para el desarrollo de diabetes tipo 2 y de que existe cierta evidencia de datos en relación con algunos efectos sobre TAB [3].

La contaminación del agua por As es un factor de riesgo para diferentes tipos de enfermedades, incluyendo cáncer de pulmón, piel, vejiga y enfermedades cardiovasculares así como neurológicas.

El As puede generar alteraciones en el metabolismo de la glucosa, induciendo diabetes y resistencia a la insulina [46].

El impacto global en la salud pública por concentraciones de As elevadas en los suministros de agua, se destaca por un número creciente de países en todo el mundo que reportan altas concentraciones en agua de uso. En América Latina, el problema de la contaminación del agua con concentraciones elevadas de As se conoce en 14 de los 20 países: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Cuba, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Perú y Uruguay, considerando que el límite internacional permisible es de 10 $\mu\text{g/L}$ establecido por agencias internacionales [47].

En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) bajó el valor del límite permisible de As para agua de 50 $\mu\text{g/L}$ a 10 $\mu\text{g/L}$. A pesar del nuevo límite internacional permisible de As en el agua estipulado por la OMS el número de personas expuestas a este metaloide aumentó varias veces más en varios países, debido a que en estos lugares no se han llevado acciones pertinentes para disminuir la exposición. En América Latina, este nuevo valor de referencia de As se convirtió en ley en el siguiente orden cronológico: Honduras (1995), Costa Rica (1997), El Salvador (1997), Colombia (1998), Guatemala (1998), Nicaragua (1999), Panamá (1999), Bolivia (2004), Brasil (2005), Argentina (2007) y Chile (2008). Otros países latinoamericanos como Uruguay, Perú y Venezuela todavía mantienen el límite de 50 $\mu\text{g/L}$. México, en particular, tiene un límite regulatorio de 25 $\mu\text{g/L}$ para agua de uso (NOM-127-SSA1-1994 modificada) [48] y de 10 $\mu\text{g/L}$ para agua y hielos para consumo humano envasado (NOM-201-SSA1-2015) [49]. El problema del agua contaminada por As en México destaca hasta el momento a 19 estados, los cuales incluyen Baja California Sur, Baja California Norte, Hidalgo, Durango, Coahuila, Zacatecas, Morelos, Aguascalientes, Michoacán, Guerrero, Tabasco, Chihuahua, Sonora, Puebla, Nuevo León, Jalisco, Oaxaca, Guanajuato y San Luis Potosí. De estos lugares, se estima que hay 450,000 personas expuestas a concentraciones mayores a 50 $\mu\text{g/L}$ de As [47].

El As también se ha encontrado en una variedad de alimentos y productos industrializados como el jugo de manzana, el pollo, el vino y la cerveza [50-52]. La Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. (FDA) encontró As en casi todas las 193 marcas probadas de arroz, alimentos para bebés de arroz y cereales de arroz [53]. El As es muy común en sitios de residuos industriales y ocupa el primer lugar en la lista de prioridades de los sitios de residuos peligrosos en términos de toxicidad y prevalencia de exposición [54].

Un estudio mostró que en ratones expuestos a As por tres semanas a través del agua de bebida a una concentración de 100 $\mu\text{g/L}$, generó hipertrofia de los adipocitos del tejido adiposo epididimal (considerado visceral) [55]. De tal forma que si el As inhibe la adipogénesis (crecimiento del tejido adiposo por hiperplasia) y propicia el aumento de tamaño de los adipocitos (hipertrofia), el fenotipo generado podría ocasionar “obesidad metabólicamente no sana o con complicaciones” [1].

Adicionalmente, varios estudios tanto en humanos [11], como en roedores [56, 57] han mostrado que el tipo de alimentación es un factor importante en los efectos de diversos contaminantes, incluyendo el As. Algunos trabajos han demostrado asociaciones entre la prevalencia o la gravedad de los efectos sobre la salud relacionados con el As y los indicadores de estado alimentario y nutricional en roedores [58].

4. Planteamiento del problema y Justificación

Dentro de los mecanismos novedosos que subyacen tras la etiología de la obesidad y la resistencia a la insulina, se encuentra la disfuncionalidad del TAB, la cual puede generarse por un alto contenido de grasa en la dieta; sin embargo, otros factores ambientales también podrían contribuir de forma importante. Hoy en día se reconoce que la alimentación funciona como un modulador positivo o negativo de diferentes disruptores químicos del metabolismo a los que nos encontramos expuestos los cuales pueden incrementar el riesgo a desarrollar obesidad, diabetes tipo 2 o síndrome metabólico. Uno de estos disruptores químicos del metabolismo es el As, al que se encuentran expuestas alrededor de 300 millones de personas a nivel mundial, incluyendo México, a través del agua natural contaminada y de la actividad antropogénica. El As es un diabetógeno, sin embargo, se ha estudiado muy poco su efecto a nivel del TAB. En los pocos estudios realizados se ha estudiado principalmente el TAV de la región epididimal, mientras que no se han hecho estudios en el TAS para evaluar el efecto que tiene el As sobre el acúmulo de TG en dicho tejido y determinar si genera hipertrofia de los adipocitos. Adicionalmente, resulta importante estudiar cómo se modula el efecto del As por la cantidad de grasa ingerida a través de la dieta en el TAS ya que este compartimiento de tejido adiposo funciona como un amortiguador metabólico que impide la expansión del TAV y la lipotoxicidad sistémica .

Por tanto, el propósito de este estudio fue determinar el efecto que tiene el As al combinarse con una DAG sobre el tamaño y/o la cantidad de adipocitos de en el TAS, así como la cantidad de TG acumulados, con la finalidad de identificar el tipo de expansión que sufre el TAS ante la combinación de ambos estímulos.

5. Hipótesis

El As potencia el efecto sobre el aumento en la acumulación de los triglicéridos inducido por la dieta alta en grasa, generando hipertrofia de los adipocitos del tejido adiposo blanco subcutáneo.

6. Objetivo general

Determinar el efecto del As en combinación con una dieta alta en grasa sobre la expansión del tejido blanco subcutáneo.

6.1. Objetivos específicos

- Determinar la cantidad de adipocitos del tejido adiposo blanco subcutáneo de los ratones.
- Identificar el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo blanco subcutáneo de los ratones.
- Evaluar la cantidad de triglicéridos acumulados en el tejido adiposo blanco subcutáneo de los ratones.

7. Diseño experimental

Diseño Experimental

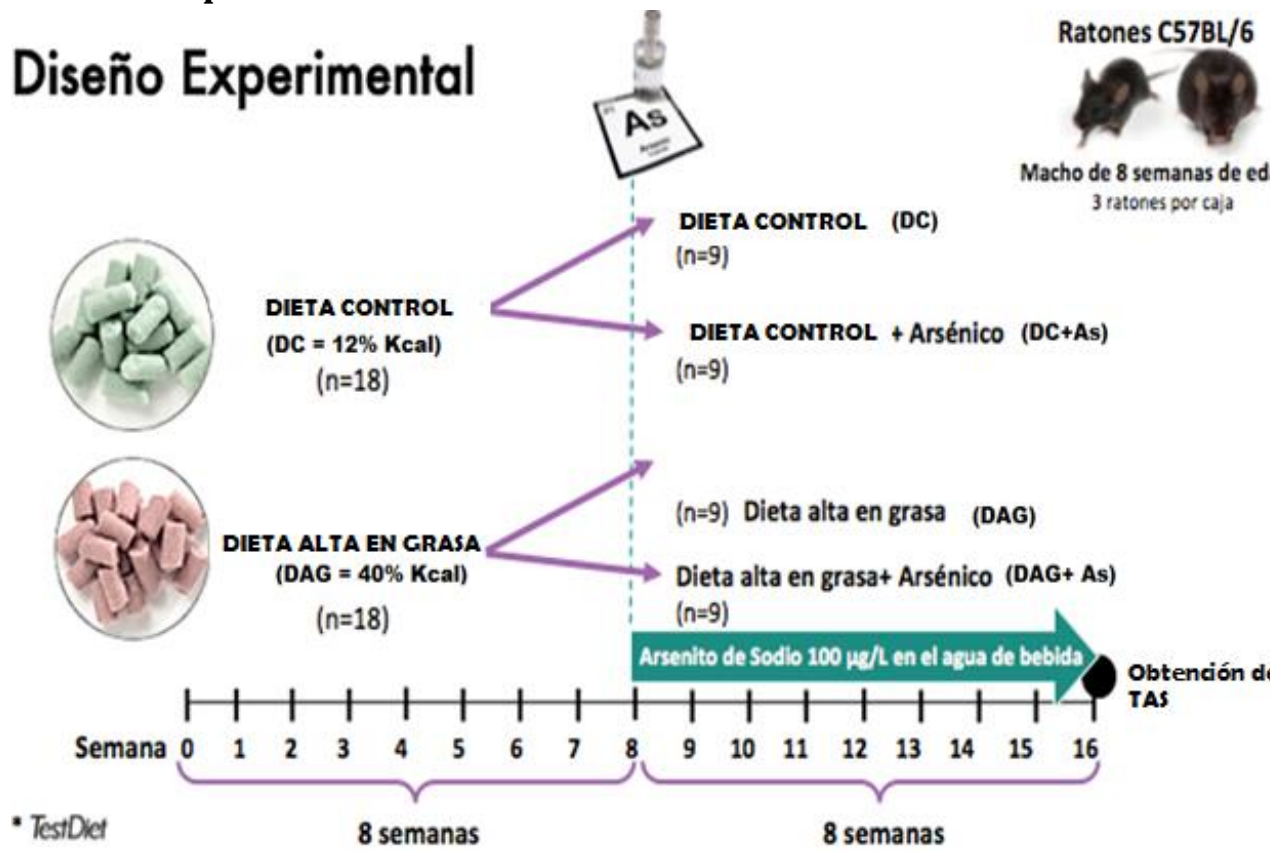


Figura 1. Diseño experimental. Dieta control (DC), Dieta alta en grasa (DAG), arsénico (As). *Diets comerciales Test Diet

8. Metodología

8.1. Animales, dieta y exposición a arsénico

A pesar de que esta tesis comenzó al término de las 16 semanas que duró el estudio con los animales, a continuación se muestran los detalles de la alimentación y la exposición con As. Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 macho (Charles-Rivers, adquiridos a través del bioterio de la UAM-X) (n=36), de 8 semanas de edad (22 g de peso aproximadamente). El estudio fue aprobado con protocolo de investigación no. 162 por el comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco (UAM-X) y se trabajó cumpliendo con la norma oficial mexicana de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-Z00-1999). Los ratones se colocaron en tríos en cajas de polipropileno con filtro de aire, humedad y temperatura controlada, periodos luz/obscuridad 12/12 horas, con alimento y agua *ad libitum*. Los animales fueron alimentados por 8 semanas con dieta control (12% kcal de grasa, 3.89 kcal/g) (TestDiet, CAT. 5TJS, St. LOUIS, MO, USA) o dieta alta en grasa tipo occidental (39% kcal de grasa, 4.55 kcal/g) (TestDiet, CAT. 5TJN, St. LOUIS, MO, USA) siendo en su mayoría grasa saturada (Tablas 1 y 2). Como se puede observar en la tabla 1. La dieta control contiene 11.9% de kcal provenientes de la grasa, lo cual es lo recomendado para ratones de esa edad.

Tabla 1. Distribución y Composición de la Dieta

DIETAS	DC		DAG	
CONTENIDO ENERGÉTICO (kcal/g)	3.89		4.55	
	% kcal	g/ 100 g	% kcal	g/ 100 g
DISTRIBUCIÓN ENERGÉTICA				
Carbohidratos	72.2	70.1	45.1	51.3
Proteína	15.9	15.5	15.8	18
Grasas	11.9	5.1	39.1	19.8
CONTENIDO DE GRASA*				
A.G. Saturados		2.03		7.92
A.G. Monoinsaturados		1.61		6.28
A.G. Poliinsaturados		1.35		5.25
Colesterol		0.13		0.15

Dieta control (DC), dieta alta en grasa (DAG).

***Contenido de grasa con respecto al total de la dieta.**

Tabla 2. Fuentes de grasa en las dietas

	DC	DAG
Manteca vegetal (%)	30	30
Manteca de cerdo (%)	30	30
Grasa de la leche (%)	30	30
Aceite de soya (%)	7	7
Aceite de Maíz (%)	3	3

Dieta control (DC), dieta alta en grasa (DAG).

Posteriormente, la mitad de cada grupo se expuso durante otras 8 semanas adicionales a 100 µg/L de arsenito de sodio a través del agua de bebida en botellas de vidrio, con cambio de agua dos veces a la semana para evitar la oxidación del arsénico, manteniendo cada grupo sus dietas originales, quedando así cuatro grupos experimentales (n=9 c/uno) (Figura 1):

- a) dieta control (DC)
- b) dieta control + arsénico (DC-As)
- c) dieta alta en grasa (DAG)
- d) dieta alta en grasa + arsénico (DAG-As).

8.2. Ganancia de peso

Se evaluó el peso de los animales por medio de una balanza digital una vez a la semana. La ganancia de peso se determinó por la diferencia entre el peso final de los animales y los gramos del peso inicial.

8.3. Consumo de alimento

Se evaluó una vez por semana la cantidad de alimento ingerido en promedio de cada 3 ratones por caja, mediante la diferencia entre los gramos de alimento que se colocaron la vez anterior en el comedero menos los gramos de alimento restantes. Con estos datos se obtuvieron los g de consumo total y se dividió entre los días de la semana y entre los 3 ratones que se encontraban en cada caja.

8.4. Obtención de tejido adiposo blanco subcutáneo

Al final del estudio (16 semanas), tras un ayuno de 6 h, se llevó a cabo la eutanasia bajo sedación con isoflurano y por disección se obtuvo el TAS. Después de la resección, los tejidos se pesaron y

se enjuagaron con solución salina al 0.9% fría; una porción se fijó en paraformaldehído al 4 % para el posterior análisis histológico y el resto se congeló inmediatamente a -70°C para la obtención posterior de triglicéridos.

Una vez obtenido el TAS de los ratones se siguió la siguiente estrategia experimental.

8.5. Estrategia experimental

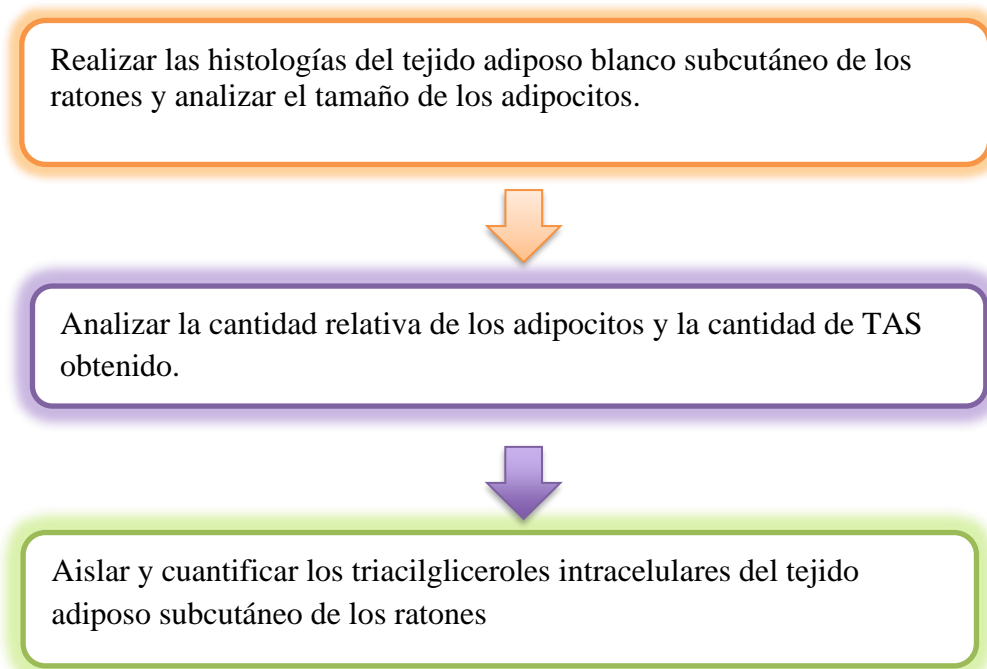


Figura 2. Estrategia experimental para el análisis de histologías del TAS sobre la cantidad de adipocitos y la cuantificación de TG.

8.6. Histologías

La sección del TAS fijado en paraformaldehído, se deshidrató, se embebió en bloques de parafina que fueron cortados 6 μm y las laminillas se tiñeron con hematoxilina y eosina, para observar las membranas y núcleos de los adipocitos (Servicio externo del INMEGEN). Posteriormente se analizaron al microscopio (Zeiss, Axio scope.A1) acoplado a una cámara canon SLR (EOS1000D) con un aumento de 20X. Se analizó una laminilla por animal del tejido adiposo subcutáneo, considerando 2 campos diferentes en cada una de ellas. Se tomaron las fotografías de las histologías para realizar el análisis del tamaño de los adipocitos por medio del software Adiposoft 1.16 image j, CIMA, Universidad de Navarra (imagej.ned/adiposoft). El directorio de salida contuvo un archivo de Excel con la lista de adipocitos de todas las imágenes, con su área y parámetros, y un directorio denominado como el directorio de entrada original que contenía todas las imágenes segmentadas.

8.7 Número Relativo de adipocitos

El número relativo de adipocitos se calculó tomando en cuenta el promedio del área de adipocitos y el peso total del TAS, como se muestra a continuación:

$$N. R. = \left[\frac{\text{Promedio de área de adipocitos } (\mu\text{m})^2}{\text{Peso del tejido } (\mu\text{g})} \right]$$

N.R. = número relativo de adipocitos

8.8. Determinación de triglicéridos en tejido adiposo blanco subcutáneo

La obtención de triglicéridos se hizo de acuerdo a la metodología descrita por Okuno [59]. Brevemente, se pesó entre 0.040-0.045 g de TAS congelado, se colocó en 200 μL de solución amortiguadora TG (NaCl 150 mM, Tritón X-100 0.1% y Tris Base 10 mM) precalentado a 40-50°C en tubos eppendorf de 1.5 mL. El tejido se homogenizó con un taladro para microtubos (Sigma/Andrich, Cat: Z359955-1EA, Missouri, USA) durante 1 min. Se transfirieron los 200 μL de solución amortiguadora con tejido a tubos eppendorf de 2 mL que contenían 1.8 mL de solución amortiguadora de TG precalentado a 40-50°C. Se homogenizó la solución y se tomó una alícuota de 50 μL para cuantificar lo concentración de triglicéridos por medio de un ensayo enzimático colorimétrico (ELItech Clinical Systems Triglycerides Mono SL New).

8.9. Cuantificación de triglicéridos

Se colocaron 3 μL de la solución blanco (agua), de la solución estándar o de las muestras en placas de 96 pozos. Se añadieron a los pozos 300 μL de reactivo y se incubaron las placas durante 10 min a 37°C. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm en un espectrofotómetro de placa (iMark BioRad, California, USA) y la concentración de TG se calculó de la siguiente manera:

$$\text{TG } \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = (\text{Absorbancia de la muestra} / \text{Absorbancia del estándar}) \times 200 \text{ mg/dL}$$

$$\text{TG (mg)} = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} * 100000 = \frac{\text{mg}}{\mu\text{L}} * 2000$$

$$\text{TG totales} = \frac{\text{TG (mg)}}{\text{Peso de muestra (g)}} \times \text{Peso del TAS (g)}$$

$$\text{TG por adipocito (mg)} = \frac{\text{TG totales de TAS (mg)}}{\text{Número relativo de adipocitos}}$$

8.10. Análisis estadístico

Se presenta la media \pm el error estándar de la media. Se aplicó la prueba de normalidad de D'angostino. Las diferencias entre los grupos se establecieron con análisis de varianza (ANOVA) de una vía y ANOVA de una vía de medidas repetidas solo para la ganancia de peso, consumo de alimento y consumo de energía. Para determinar las diferencias entre los grupos se utilizó la prueba Post-hoc Fisher de diferencia mínima significativa (LSD). En todos los casos un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo, donde $a > b > c > d$ (GraphPad Prism v6).

9. Resultados

9.1. Ganancia de peso corporal y cantidad de tejido adiposo blanco subcutáneo (TAS)

El porcentaje de ganancia de peso corporal que fue obtenido previamente al comienzo de esta tesis, muestra que éste se vio afectado por el tipo de dieta, ya que la DAG generó mayor ganancia de peso que la DC. Sin embargo, el peso corporal también se vio afectado por el consumo de As. De los cuatro grupos evaluados, el grupo que presentó la mayor ganancia de peso porcentual fue el de los ratones alimentados con DAG y expuestos a As (Tabla 3). Se puede observar que los ratones expuestos a As, a pesar de consumir una DC, incrementaron significativamente su porcentaje de ganancia de peso con respecto a los ratones alimentados con la misma DC, pero sin As.

Tabla 3. Ganancia de peso corporal con respecto al peso inicial.

Ganancia de peso	g	%
DC	11.14^d	50.94^d
DC-As	12.38^c	58.79^c
DAG	22.04^b	103.04^b
DAG-As	23.11^a	104.25^a

Dieta Control (DC), Dieta Control + Arsénico (DC-As), Dieta alta en grasa (DAG), Dieta alta en grasa + Arsénico (DAG-As). Letras diferentes muestran diferencias significativas a>b>c>d, analizado con ANOVA de una vía de medidas repetidas con Post-hoc Fisher LSD p<0.05.

De igual forma la cantidad de TAS en los ratones alimentados con la DAG fue alrededor del doble de forma significativamente estadística en comparación con los animales alimentados con la DC; sin embargo, no se observó ningún efecto del arsénico (Figura 3).

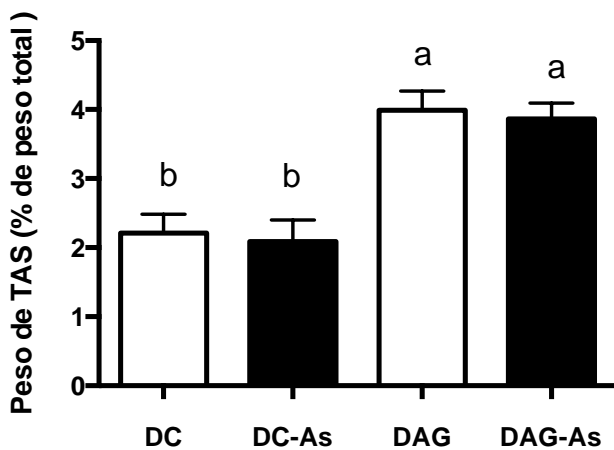


Figura 3. Porcentaje de tejido adiposo blanco subcutáneo (TAS) en función del peso corporal

Dieta Control (DC), Dieta Control + Arsénico (DC-As), Dieta alta en grasa (DAG), Dieta alta en grasa + Arsénico (DAG-As). Letras diferentes muestran diferencias significativas $a > b$, analizado con ANOVA de una vía con Post-hoc Fisher LSD, $p < 0.05$.

A pesar de que los animales de los 4 grupos experimentales consumieron la misma cantidad de alimento en gramos (Figura 4), existe una diferencia significativa en el consumo de energía al día entre los grupos de ratones alimentados con DC y DAG (Figura 5). De tal forma que, a pesar de que cada grupo de ratones consumió la misma cantidad de alimento (Figura 4), aquellos alimentados con DAG tuvieron un mayor consumo de energía que se vio reflejado tanto en la ganancia del peso corporal como en la cantidad del TAS (Tabla 3).

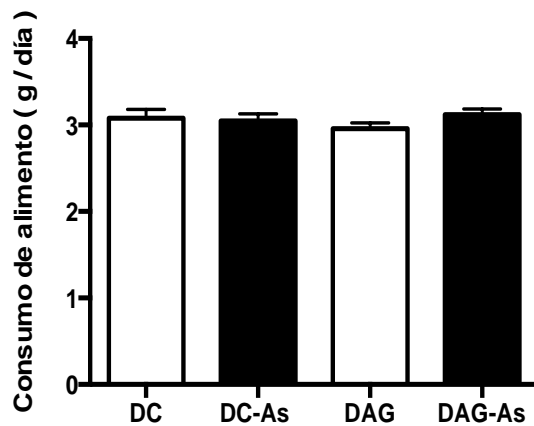


Figura 4. Consumo de alimento en gramos al día por ratón

Dieta Control (DC), Dieta Control + Arsénico (DC-As), Dieta alta en grasa (DAG), Dieta alta en grasa + Arsénico (DAG-As). Analizado con ANOVA de una vía de medidas repetidas con Post-hoc Fisher LSD.

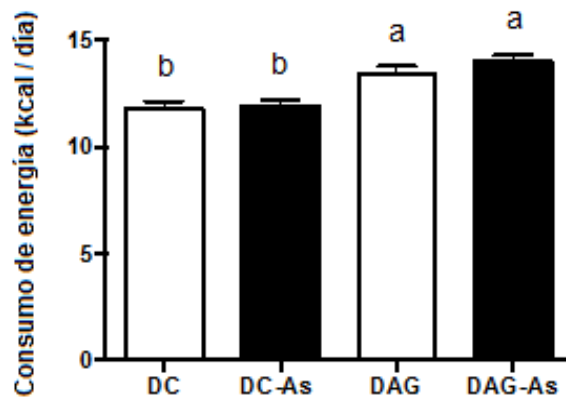


Figura 5. Consumo de energía (kcal) al día por ratón

Dieta Control (DC), Dieta Control + Arsénico (DC-As), Dieta alta en grasa (DAG), Dieta alta en grasa + Arsénico (DAG-As). Letras diferentes muestran diferencias significativas $a > b$ analizado con ANOVA de una vía de medidas repetidas con Post-hoc Fisher LSD, $p < 0.05$.

9.2. Histologías del tejido adiposo subcutáneo (TAS)

En las imágenes analizadas sobre las histologías de TAS (Figura 6) se puede observar el efecto que tuvo la DAG, ya que los adipocitos de los ratones alimentados con la DAG presentaron hipertrofia (mayor tamaño de adipocitos y menor cantidad de adipocitos por área) en comparación con los adipocitos de los ratones alimentados con la DC. Algo similar sucedió entre los ratones alimentados con la DAG y la DAG+As, puesto que los adipocitos de los ratones alimentados con la DAG+As tuvieron un tamaño mayor en comparación con los ratones alimentados con la DAG. Sin embargo, este efecto no se observó entre los ratones alimentados con la DC y la DC+As, donde el As no mostró ninguna diferencia con la dieta control. Por lo tanto, se podría suponer que el As exacerbó los efectos que generó la DAG más no influyó con una dieta control. Con el fin de evaluar estos hallazgos de manera cuantitativa, se analizó el tamaño de los adipocitos.

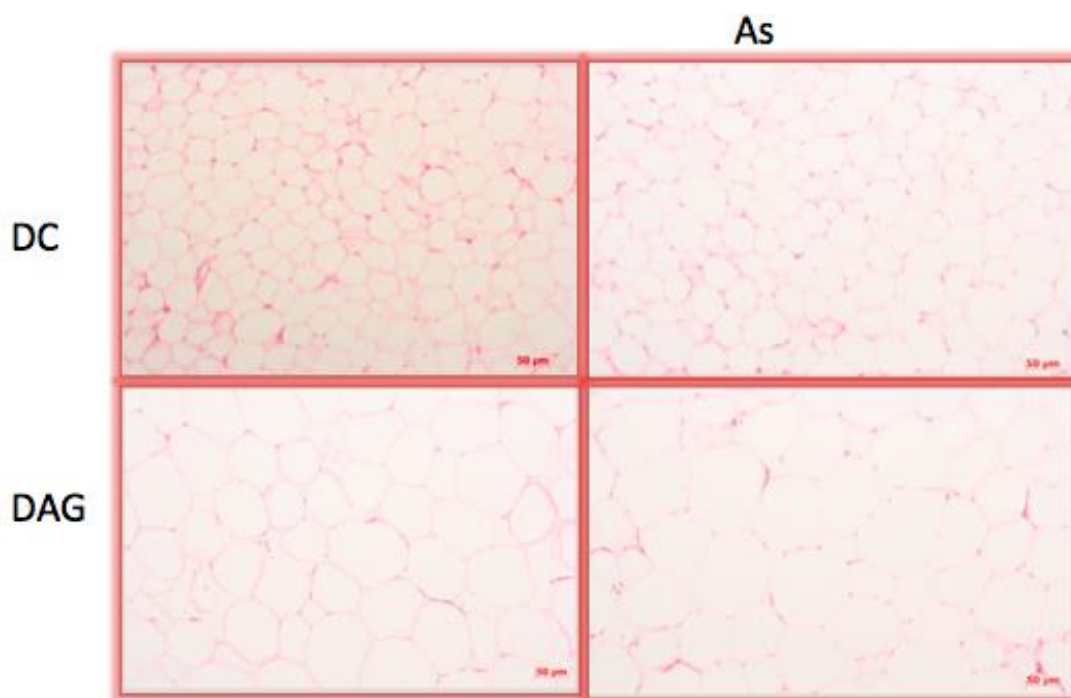


Figura 6. Histologías del tejido adiposo subcutáneo con tinción de H y E, 20X, escala 50 µm. Dieta Control (DC), Dieta alta en grasa (DAG), Arsénico (As).

9.3. Tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo subcutáneo

Para conocer la distribución del tamaño de los adipocitos y corroborar si realmente existía una hipertrofia en los adipocitos del TAS en los ratones alimentados con la DAG y expuestos a As, se evaluó el tamaño de los adipocitos en las histologías del TAS. Los ratones alimentados con la DAG tuvieron adipocitos significativamente más grandes que los alimentados con la DC; en el grupo que además recibió As este efecto se exacerbó de forma significativa (Figura 7).

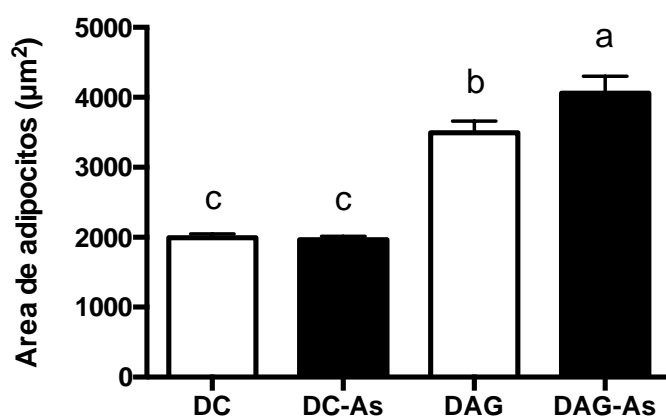


Figura 7. Tamaño de adipocitos del tejido adiposo subcutáneo

Dieta Control (DC), Dieta Control + Arsénico (DC-As), Dieta alta en grasa (DAG), Dieta alta en grasa + Arsénico (DAG-As). Letras diferentes muestran diferencias significativas $a > b > c$, analizado con ANOVA de una vía con Post-hoc Fisher LSD, $p < 0.05$

Con la finalidad de ampliar el análisis sobre el tamaño de los adipocitos en el TAS, se hizo un análisis de frecuencia relativa del tamaño de los adipocitos por rangos de tamaño, ya que al microscopio se observó una gran variedad en los tamaños de las células

El análisis de la frecuencia relativa del tamaño de los adipocitos mostró que los adipocitos del TAS de los ratones alimentados con la DAG tuvo un mayor porcentaje de adipocitos de $6-8 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ en comparación con la DC (11% vs 2%, respectivamente), así como en el rango de $8-20 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ (9% vs 1%, respectivamente), considerándolos hipertróficos ya que el tamaño promedio de adipocitos

subcutáneos en la cepa C57BL/6 es de $2 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ {Parrlee, 2014}. Sin embargo, en aquellos ratones alimentados con la DAG y además expuestos a As, se exacerbó este efecto, aumentando el número de adipocitos con un área en el rango de $8-20 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, con un cambio de frecuencia del 9% con la DAG al 14% en combinación con el As. Mientras que el número de adipocitos pequeños ($< 2 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) disminuyó únicamente por efecto de la DAG (Figura 8).

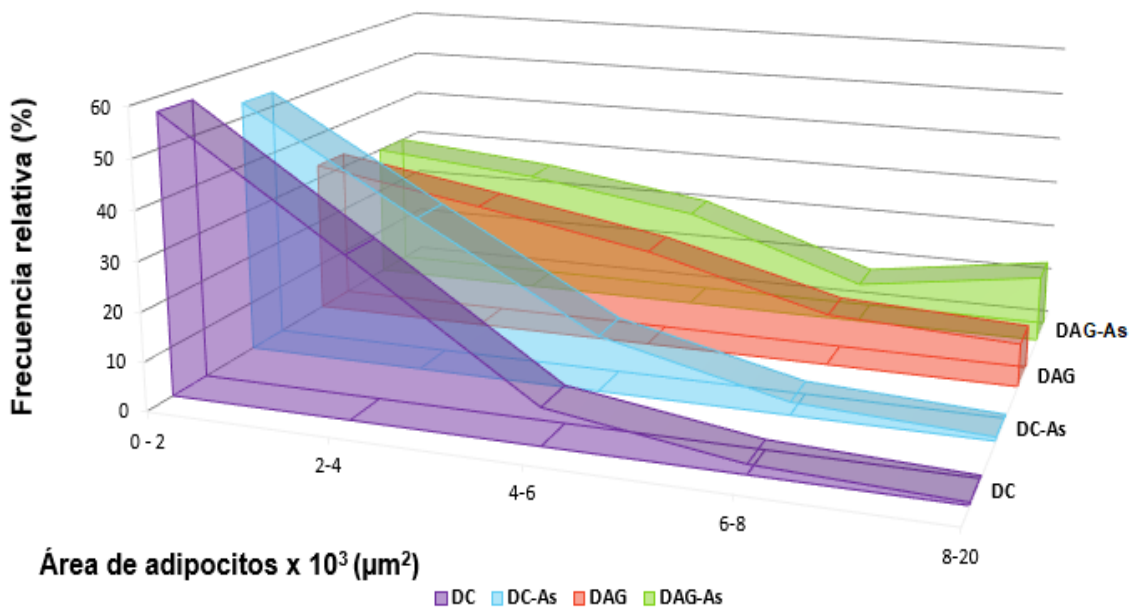


Figura 8. Frecuencia relativa del tamaño de adipocitos en el tejido adiposo subcutáneo

Dieta Control (DC), Dieta Control + Arsénico (DC-As), Dieta alta en grasa (DAG), Dieta alta en grasa + Arsénico (DAG-As).

Con el objetivo de corroborar si realmente los adipocitos de los ratones alimentados con la DAG habían presentado un crecimiento del tejido adiposo por hipertrofia, se analizó el número relativo de adipocitos (Figura 9), el cual se obtiene a partir del promedio del área de los adipocitos (Figura 7) entre el peso total del TAS. El análisis mostró que los cuatro grupos experimentales presentaron el mismo número relativo de adipocitos, indicando que la expansión del tejido adiposo no ocurrió por hiperplasia

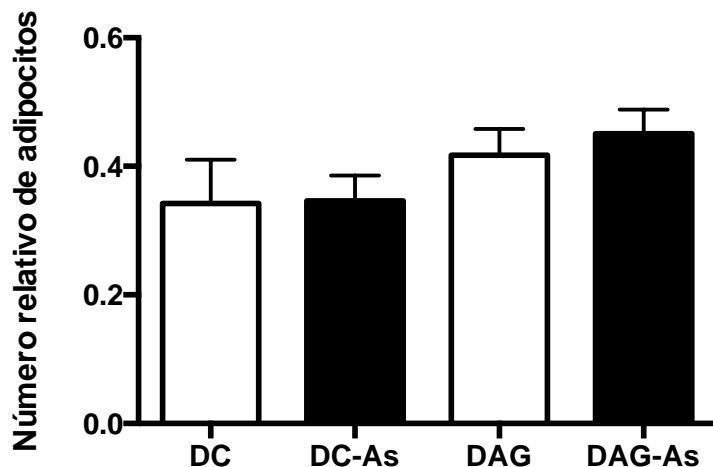


Figura 9. Número relativo de adipocitos en el tejido adiposo subcutáneo

Dieta Control (DC), Dieta Control + Arsénico (DC-As), Dieta alta en grasa (DAG), Dieta alta en grasa + Arsénico (DAG-As).

9.4. Contenido de triglicéridos por adipocito

De forma concordante con los resultados del tamaño de los adipocitos, la cantidad de TG intracelulares almacenados en los adipocitos del TAS fue significativamente mayor en los ratones alimentados con la DAG que en los ratones que recibieron la DC (Figura 10). Sin embargo, la adición de arsénico a la DAG exacerbó significativamente el acúmulo de triglicéridos en los adipocitos, lo cual explica la hipertrofia observada.

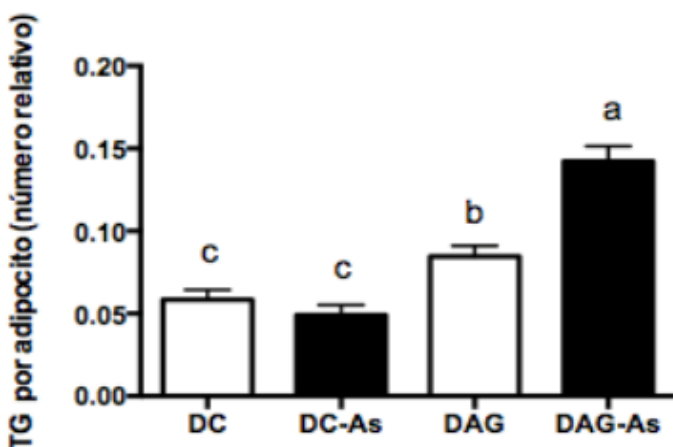


Figura 10. Contenido de triglicéridos por adipocito.

Dieta Control (DC), Dieta Control + Arsénico (DC-As), Dieta alta en grasa (DAG), Dieta alta en grasa + Arsénico (DAG-As). Letras diferentes muestran diferencias significativas $a > b > c$, $p < 0.05$.

10. Discusión

Los datos presentados indican que el As potencia el efecto de la DAG sobre el aumento en la acumulación de los TG en el TAS, generando hipertrofia de los adipocitos de este tejido.

El As tuvo una gran influencia en relación a la ganancia de peso, ya que en ambas dietas hubo un incremento ligero pero significativo en aquellos animales que fueron expuestos al As comparado con sus respectivos controles.

Los ratones alimentados con la DC y con la DAG consumieron la misma cantidad de alimento al día, de tal modo que se puede descartar que el aumento de peso se haya debido a un mayor consumo de alimento. Sin embargo, el consumo de energía fue mayor en los ratones alimentados con la DAG, lo cual es lógico debido a que esta dieta tiene una mayor densidad energética que la DC.

El crecimiento de TAB, ya sea por aumento en el número de adipocitos (hiperplasia) y/o por el tamaño de adipocitos (hipertrofia) son características importantes del TAB. En un estudio *in vivo* en el que se expuso a ratones a arsenito (100 µg/L) durante 5 semanas se demostró una reducción en el número de adipocitos por campo provenientes del tejido adiposo epididimal, por lo que estos resultados sugieren que el tratamiento con As ocasiona que haya una mayor cantidad de adipocitos hipertróficos [55]. Estas observaciones concuerdan con los resultados del presente estudio, ya que, tal como se mostró anteriormente, tanto en los estudios histológicos como en el análisis del TAS, se demostró que el tamaño de los adipocitos de los ratones alimentados con la DAG fue mayor que el de los ratones alimentados con la DC. A su vez, los ratones alimentados con la DAG y expuestos a As, tuvieron un mayor tamaño de adipocitos subcutáneos que los alimentados con la DAG, pero sin exposición a As. Esto indica una hipertrofia en los adipocitos del TAS causada por la DAG, siendo este efecto potenciado por la exposición a As.

Por otro lado, para saber si realmente estos adipocitos eran hipertróficos, ya que en algunas histologías se apreciaban tanto adipocitos pequeños como adipocitos grandes, considerando que el valor promedio de adipocitos del TAS en ratones de la cepa C57BL/6 es de $2 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ [72] se evaluó el % de frecuencia relativa. De manera congruente con el dato correspondiente al % de frecuencia relativa, se identificó que la DAG generó el desarrollo de una mayor cantidad de adipocitos hipertróficos. Sin embargo, en aquellos ratones alimentados con la DAG y expuestos a As, se exacerbó este efecto, en donde incluso aumentó el % de los adipocitos de mayor tamaño ($8-20 \times 10^3$

μm^2). Al evaluar el número relativo de adipocitos, se observó que los 4 grupos experimentales mostraban valores similares, por lo tanto la diferencia en el crecimiento del TAS por los diferentes tratamientos radica en la distribución de los tamaños de adipocitos. Este análisis también pudo haberse obtenido midiendo la cantidad de células a través de la cantidad de ADN que hay en el TAS, sin embargo, se descartó esta opción debido a que el valor resultante iba a estar sobreestimado ya que el TAS no solo se encuentra formado por adipocitos, sino que también contiene una variedad de tipos celulares, tales como pre-adipocitos, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y leucocitos, entre otros [20].

El aumento en la masa adiposa puede ser el resultado de varios factores: un aumento en el tamaño de los adipocitos, crecimiento por hipertrofia, y/o por aumento en el número de adipocitos (crecimiento por hiperplasia), este último a través de la adipogénesis. La adipogénesis es el proceso de diferenciación celular por el cual los pre-adipocitos dan lugar a los adipocitos y éstos comienzan a almacenar lípidos, particularmente en forma TG [60].

Al evaluar la cantidad de TG almacenados en los adipocitos del TAS, se encontró que los ratones alimentados con la DAG en combinación con As, tuvieron un aumento significativo en la cantidad de TG en comparación con cualquiera de los otros tratamientos, lo cual concuerda con el mayor aumento en el tamaño de los adipocitos, ya que al tener mayor acúmulo de TG debe ocurrir una expansión celular (hipertrofia). Sin embargo, esto no se vio reflejado en un aumento de peso del TAS, a pesar de que se esperaba una mayor ganancia de peso en el TAS de los ratones alimentados con DAG+As como consecuencia de haber tenido un mayor tamaño de adipocitos con una mayor acumulación de TG. Por el contrario, el peso del TAS fue muy similar entre las mismas dietas, sin verse reflejado el efecto del arsénico sobre la DAG. Este fenómeno podría explicarse por una cuestión metodológica de la balanza, ya que no se pudo realizar con una balanza analítica, sino que se utilizó una balanza con una precisión de 2 decimales, lo cual es relevante al considerar la cantidad de TAS que se obtuvo por ratón.

El crecimiento del TAB por hipertrofia, a diferencia de un crecimiento por hiperplasia, genera adipocitos disfuncionales que afectan de forma negativa a todo el organismo. Cuando los adipocitos se vuelven disfuncionales, se vuelven resistentes al efecto de la insulina, lo que resulta en un gran aumento en la liberación de ácidos grasos libres y adipocinas que juegan un papel clave en el desarrollo y mantenimiento del efecto de la insulina a nivel sistémico [61].

El mecanismo principal por el cual el TAB acumula TG y genera hipertrofia es la lipogénesis, que abarca tanto la *síntesis de novo* de ácidos grasos, así como la esterificación de ácidos grasos para la síntesis de TG [61]. Esto ocurre principalmente después de comidas con un alto contenido en hidratos de carbono y lípidos [61, 62]. Una de las principales funciones del TAB es la lipólisis, la cual se define como el catabolismo de los TG almacenados en los adipocitos en periodos de demanda energética, por medio del proceso de hidrólisis de los TG para generar tres moléculas de ácidos grasos libres y una molécula de glicerol [63].

Las alteraciones tanto en la lipogénesis como en la lipólisis pueden ser consecuencia de la resistencia a la insulina[61]. Una de las principales funciones de la insulina es inhibir la lipólisis en los adipocitos durante el postprandio [64]. Una tasa alta de lipólisis en el postprandio contribuye a una alta concentración de ácidos grasos libres en circulación, lo cual conduce a su depósito en otros órganos generando lipotoxicidad y resistencia a la insulina, características en la DT2 y en la obesidad [65]. La resistencia a la insulina en el adipocito, a su vez, altera la capacidad de la insulina para inhibir la lipólisis en dicha célula, deteriorando aún más la acción de la insulina [66].

Por otro lado, los hallazgos que se han descrito en relación al As sobre la funcionalidad de los adipocitos, radica en los efectos que tiene sobre la lipólisis basal y la adipogénesis. En un estudio con adipocitos diferenciados de células mesenquimales y tratados *in vitro* con As 1 μ M por 24 a 72 horas, se observó un incremento en la lipólisis basal, disminución de la expresión de perilipina-1 y disminución de las gotas lipídicas. En el artículo se muestra que el As actúa a través del receptor acoplado a proteínas Gi (GPCR) para la endotelina-1 (EDNRA/ EDNRB) [55].

Otro trabajo mostró que el As puede inhibir la adipogénesis, proceso por el cual las células pre-adipocíticas se diferencian en adipocitos permitiendo el almacenamiento de lípidos. La inhibición de la adipogénesis mediada por As, se produce en la etapa temprana de la diferenciación adipogénica terminal debido a la inducción de la proteína homóloga C/EBP (CHOP10), la cual es una proteína de respuesta al estrés del retículo endoplásmico. Dicha inducción de CHOP10 por As inhibe la actividad transcripcional de C/EBP β , suprimiendo así la adipogénesis [67].

En algunos estudios se ha intentado descifrar el papel que tiene el As sumando al de otros factores que desencadenan diferentes tipos de alteraciones metabólicas. Por ejemplo, la cantidad de lípidos en la dieta así como el tipo de ácidos grasos los componen, tienen la capacidad de modular diversos

aspectos del TAB, en particular, la morfología y el tamaño de los adipocitos [68]. En un estudio [71] se observó que los ratones alimentados con una DAG durante 20 semanas presentaron intolerancia a la glucosa en comparación con los ratones alimentados con una dieta baja en grasa. Al añadir As en el agua de bebida (25 y 50 mg/L) a los animales alimentados con la DAG, estos mostraron un incremento en la intolerancia a la glucosa de manera dosis-dependiente, proponiendo que el As actúa sinérgicamente con la DAG [69]. Uno de los mecanismos de acción por los cuales el As en conjunto con la DAG incrementan la intolerancia a la glucosa es a través de la inhibición de la fosforilación en el residuo Ser-473 de la proteína cinasa B (PKB/AKT), evitando la traslocación de GLUT 4 (transportador de glucosa sensible a la insulina) a la membrana celular, ocasionando un incremento en la intolerancia a la glucosa [Paul, 2007].

La tiroides es una de las principales glándulas endocrinas que contribuyen al metabolismo de lípidos. En un estudio con roedores, se mostró que dosis altas de As en el agua de bebida (25 y 50 mg/L) durante 20 semanas, actuaba de forma sinérgica en presencia de una DAG reduciendo los niveles séricos de las hormonas tiroideas T3 (triyodotironina) y T4 (tiroxina) [58]. Dichas hormonas tiroideas participan en movilizar los lípidos de forma eficiente del tejido adiposo, disminuyendo así las reservas de la grasa del cuerpo, aumentando la concentración de ácidos grasos libres en plasma y acelerando su oxidación. De tal forma que, si el As en conjunto con un DAG reduce los niveles de T3 y T4, es de esperarse que también afecte la movilización y oxidación de lípidos.

Otro estudio realizado en ratones C57BL/6 expuestos de 3 a 50 mg/L de arsénico en el agua durante un periodo de 10 semanas combinado con una DAG, mostró un aumento en el daño en el ADN de células hepáticas. El As genera un daño en el ADN y en combinación con una DAG, este daño se incrementa teniendo como consecuencia cambios transcripcionales en vías relacionadas con muerte y crecimiento celular, metabolismo de los lípidos y la señalización de insulina. Este estudio sugiere que la DAG incrementa la sensibilidad de los ratones a la sensibilidad al As en el agua de bebida, generando mayor hepatotoxicidad [70].

Es de esperarse que exista una compleja red de mecanismos que subyacen la etiología de la disfunción del TAS inducida por As en combinación con una DAG, los cuales pueden alterar el metabolismo de los lípidos, alterando la adipogénesis, la lipólisis, la lipogénesis y/o la oxidación de los lípidos, entre otros factores que son clave en el desarrollo de trastornos metabólicos, como la obesidad

11. Conclusión

La dieta alta en grasa aumenta la cantidad de tejido adiposo subcutáneo

La exposición a arsénico incrementa el crecimiento hipertrófico de los adipocitos del tejido adiposo subcutáneo ocasionado por la dieta alta en grasa

La expansión del tejido adiposo subcutáneo por exposición a arsénico en combinación con una dieta alta en grasa no ocurre por crecimiento hiperplásico de los adipocitos

El arsénico potencia el efecto de la dieta alta en grasa sobre el aumento en la acumulación de los triglicéridos en el tejido adiposo subcutáneo.

12. Perspectivas

Con la finalidad de entender mejor cómo es el mecanismo por el cual el As exagera tanto la acumulación de TG como el tamaño de los adipocitos en el TAS causados por la DAG, es necesario los distintos procesos involucrados en el metabolismo de lípidos. En relación a los procesos positivos de acúmulo de grasa, se encuentran la lipogénesis *de novo* y la esterificación de ácidos grasos, mientras que los procesos involucrados en el balance negativo figuran la lipólisis y la oxidación de los ácidos grasos. Estas vías metabólicas se podrían explorar a nivel de expresión génica, expresión proteica y modificaciones post-traduccionales.

13. Referencias

1. Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, A., Beguinot, F., Miele, C. *Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(9).
2. Pereira, F., Dirinck, E., Disrta, A., Malarvannan, G., Covaci, A., Gaal, L., Vanparys C., Jorens P., Blust, R. *Expression of obesity markers and Persistent Organic Pollutants levels in adipose tissue of obese patients: reinforcing the obesogen hypothesis?* PLoS One, 2014. **9**(1): p. e84816.
3. Galicia, Z., Daniel, A., Salazar, Ana., Pánico, P., Wegman, P., Villaseñor, A. *Effects of arsenic on adipocyte metabolism: Is arsenic an obesogen?* Mol Cell Endocrinol, 2017. **452**: p. 25-32.
4. Heindel, J., Blumberg B., Cave, M., Machtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M., Nadal, Angel., Palanza, P., Panzica, G., Sargis, R., Vandernberg, Laura., Saal, F. *Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders*. Reprod Toxicol, 2017. **68**: p. 3-33.
5. Naujokas, F., Anderson, B., Ahsan, H., Aposhian H., Graziano, J., Thompson, C., Suk, W. *The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem*. Environ Health Perspect, 2013. **121**(3): p. 295-302.
6. Kuo, C., Moon, K., Thayer, K., Acien, A. *Environmental chemicals and type 2 diabetes: an updated systematic review of the epidemiologic evidence*. Curr Diab Rep, 2013. **13**(6): p. 831-49.
7. Maull, A., Ahsan, H., Edwards, J. Longnecker, M., Acien, A., Pi, J., Silbergeld, E., Styblo, M., Tseng, C., Thayer, K., Loomis, D. *Evaluation of the association between arsenic and diabetes: a National Toxicology Program workshop review*. Environ Health Perspect, 2012. **120**(12): p. 1658-70.
8. Moon, K., Guallar, E., Navas, A. *Arsenic exposure and cardiovascular disease: an updated systematic review*. Curr Atheroscler Rep, 2012. **14**(6): p. 542-55.
9. Quansah, R., Armah, F., Essumang, D., Luginaah, Isaac., Clarke, E., Marfoh, K., Cobbina, S., Amponsah, E., Namujju, P., Obiri, S., Dzodzomenyo, M. *Association of arsenic with adverse pregnancy outcomes/infant mortality: a systematic review and meta-analysis*. Environ Health Perspect, 2015. **123**(5): p. 412-21.
10. Shankar, S., U. Shanker, and Shikha, *Arsenic contamination of groundwater: a review of sources, prevalence, health risks, and strategies for mitigation*. ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 304524.
11. Hennig, B., Ormsbee, L., McClain, C., Watkins, B., Blumberg, B., Bachas, G., Sanderson, W., Thompson, C., Suk, W. *Nutrition can modulate the toxicity of environmental pollutants: implications in risk assessment and human health*. Environ Health Perspect, 2012. **120**(6): p. 771-4.
12. SSA, NOM-008-SSA3-2010, *Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad.*, D. La Subsecretaria de Integración y Desarrollo del Sector Salud y Presidenta del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Innovación, Tecnologías e Información en Salud, Editor. 2010, Secretaria de Salud y Secretaria de Gobernación, Gobierno de México: Diario Oficial de la Federación.
13. Jo, J., Gavrilova, O., Pack, S., Jou, W., Mullen, S., Sumner, A., Cushman, S., Periwai, V. *Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth*. PLoS Comput Biol, 2009. **5**(3): p. e1000324.

14. OMS, *Obesidad y sobrepeso*. 2020. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
15. SSA, *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016.*, I.N.d.S. Pública, Editor. 2016, Instituto Nacional de Salud Pública, Gobierno de México. http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/doctos_2016/ensanut_mc_2016-310oct.pdf.
16. Park, A., Kim, W., Bae, K. *Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells*. World J Stem Cells, 2014. **6**(1): p. 33-42.
17. Dani, C. and N. Billon, *Adipocyte Precursors: Developmental Origins, Self-Renewal, and Plasticity*, in *Adipose Tissue Biology*, M.E. Symonds, Editor. 2011, Springer: New York. p. 16.
18. Esteve, M. *Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity*. Endocrinol Nutr, 2014. **61**(2): p. 100-12.
19. Lee, Y.H., E.P. Mottillo, and J.G. Granneman, *Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(3): p. 358-69.
20. Sethi, J.K. and A.J. Vidal-Puig, *Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation*. J Lipid Res, 2007. **48**(6): p. 1253-62.
21. Sanchez, J.C., *Adipocinas y síndrome metabólico: múltiples facetas de un proceso fisiopatológico complejo. I*. Revista Colombiana de Cardiología, 2010. **17**(4): p. 10.
22. Spiegelman, M. and S. Enerback, *"The adipocyte: a multifunctional cell"*. Cell Metab, 2006. **4**(6): p. 425-7.
23. Nielsen, S., Jessen, N., Jorgensen, J., Moller, N., Lund, S. *Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease*. J Mol Endocrinol, 2014. **52**(3): p. R199-222.
24. Lago, F., Gómez, R., Reino, J., Dieguez, C., Gualillo, O. *Adipokines as novel modulators of lipid metabolism*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(10): p. 500-10.
25. Andrade, V., Mateus, M., Batoréu, M., Aschener, M., Marreilha, A. *Lead, Arsenic, and Manganese Metal Mixture Exposures: Focus on Biomarkers of Effect*. Biol Trace Elem Res, 2015. **166**(1): p. 13-23.
26. Tan, C. y Vidal, A. *Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 5): p. 935-40.
27. Manzur, F., Alvear, C. y Alayón, A. *Adipocitos, obesidad visceral, inflamación y enfermedad cardiovascular*. Revista Colombiana de Cardiología, 2010. **17**(5): p. 7.
28. Bjorndal, B., Burri, L., Staalesen, V., Skorve, J., Berge, R. *Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents*. J Obes, 2011. **2011**: p. 490650.
29. Pellegrinelli, V., Carobbio, S., y Vidal, A. *Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues*. Diabetologia, 2016. **59**(6): p. 1075-88.
30. Ibrahim, M. *Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences*. Obes Rev, 2010. **11**(1): p. 11-8.
31. Virtue, S. y Vidal, A., *It's not how fat you are, it's what you do with it that counts*. PLoS Biol, 2008. **6**(9): p. e237.
32. Taubes, G. *Insulin resistance. Prosperity's plague*. Science, 2009. **325**(5938): p. 256-60.
33. Jernas, M., Palming, J., Sjöholm, K., Jennische, E., Svensson, P., Gabrielsson, B., Levin, M., Sjögren, A., Rudemo, M., Lystig, T., Carlsson, L., y Lonn, M. *Separation of human*

- adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression.* FASEB J, 2006. **20**(9): p. 1540-2.
34. Virtue, S. y -Puig, A. *Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome-an allostatic perspective.* Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(3): p. 338-49.
 35. Jensen, C., Storgaard, H., Madsbad, S., Richter, E., Vag, A. *Altered skeletal muscle fiber composition and size precede whole-body insulin resistance in young men with low birth weight.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(4): p. 1530-4.
 36. Sattar, N. y Gill, J. *Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat?* BMC Med, 2014. **12**: p. 123.
 37. Arner, E., Westermark, P., Spalding, K., Britton, T., Rydén, M., Frisén, J., Bernard, S., y Arner, P. *Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology.* Diabetes, 2010. **59**(1): p. 105-9.
 38. Perry, A., West, A., Gayle, A., Lucas, L., Yan, J., Jiang, X., Malysheva, O., Caudill, A. *Pregnancy and lactation alter biomarkers of biotin metabolism in women consuming a controlled diet.* J Nutr, 2014. **144**(12): p. 1977-84.
 39. Wueest, S., Item, F., Lucchini, F., Challa, T., Muller, W., Bluher, M., y Konrad, D. *Mesenteric Fat Lipolysis Mediates Obesity-Associated Hepatic Steatosis and Insulin Resistance.* Diabetes, 2016. **65**(1): p. 140-8.
 40. He, F., Berg, A., Kawasawa, Y., Bixler, E., Mendoza, J., Whitsel, E., Liao, D. *Association between DNA methylation in obesity-related genes and body mass index percentile in adolescents.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 2079.
 41. Coelho, M., Oliveira, T. y Fernandes, R. *Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ.* Arch Med Sci, 2013. **9**(2): p. 191-200.
 42. Milanova, I., Kalsbeek, M., Wang, X., Korpel, N., Stenvers, D., Wolf, S., Goede, P., Heijboer, A., Fliers, E., Fleur, S., Kalsbeek, A., Yi, Chun. *Diet-Induced Obesity Disturbs Microglial Immunometabolism in a Time-of-Day Manner.* Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 424.
 43. Sainz, N., González, J., Martínez, J., y Moreno, M. *Leptin signaling as a therapeutic target of obesity.* Expert Opin Ther Targets, 2015. **19**(7): p. 893-909.
 44. Veiga, A., Pu, J., Gingrinch, J., y Padmanabhan, V. et al., *Obesogenic Endocrine Disrupting Chemicals: Identifying Knowledge Gaps.* Trends Endocrinol Metab, 2018. **29**(9): p. 607-625.
 45. Regnier, M. y Sargis, M. *Adipocytes under assault: environmental disruption of adipose physiology.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(3): p. 520-33.
 46. Renu, K., Madhyastha R., Maruyama, M., Arunachlam, S., y Abilash, G. *Role of arsenic exposure in adipose tissue dysfunction and its possible implication in diabetes pathophysiology.* Toxicol Lett, 2018. **284**: p. 86-95.
 47. Bundschuh, J., Litter, M., Parvez, F., Ross, G., Nicolli, H., Jean, J., Liu, C., López, D., Armienta, M., Guilherme, L., Cuevas, A., Cornejo, L., Cumbal, L., Toujaguez, R. *One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries.* Sci Total Environ, 2012. **429**: p. 2-35.
 48. SSA, NOM-127-SSA1-1994, *Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que se debe someter el agua para su potabilización.* 1995, Secretaria de Salud y Secretaria de Gobernación, Gobierno de México: Diario Oficial de la Federación.
 49. SSA, NOM-201-SSA1-2015, *Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias.* 2015, Secretaria de Salud y Secretaria de Gobernación, Gobierno de México: Diario Oficial de la Federación

50. Marshall, A., *Dietary Guidelines for Americans, 2010: an update*. J Am Dent Assoc, 2011. **142**(6): p. 654-6.
51. Nachman, E., B et al., *Arsenic levels in chicken: Nachman et al. respond*. Environ Health Perspect, 2013. **121**(9): p. A267-8.
52. Mori, M., Sato, T., Yoshida, H., Ohira, Y., Itou, Y., y Shimizu, S. *Association of beer consumption with arsenic concentration in urine: a result from a cross-sectional study of the general Japanese population*. Environ Health Prev Med, 2016. **21**(5): p. 327-333.
53. FDA, *Arsenic in Rice and Rice Products. Risk Assessment Report*. 2016. <https://www.fda.gov/files/food/published/Arsenic-in-Rice-and-Rice-Products-Risk-Assessment-Report-PDF.pdf>
54. ATSDR, *ToxFAQs sobre el Arsénico*, D.o.T.a.H.H. Sciences, Editor. 2016, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs2.html
55. Garciafigueroa, Y., klei, L., Ambrosio, F., y Barchowsky, A. *Arsenic-stimulated lipolysis and adipose remodeling is mediated by G-protein-coupled receptors*. Toxicol Sci, 2013. **134**(2): p. 335-44.
56. Wu, J., Liu, Jie., Waalkes, M., Cheng, M., Xiu, C., y Yang, Q. *High dietary fat exacerbates arsenic-induced liver fibrosis in mice*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(3): p. 377-84.
57. Dutta, M., Ghosh, D., Kumar, A., Bose, G., Chattopadhyay, A., Rudra, S., Dey, M., Bandyopadhyay, A., Pattari, S., Mallick, S., y Bandyopadhyay, D. *High fat diet aggravates arsenic induced oxidative stress in rat heart and liver*. Food Chem Toxicol, 2014. **66**: p. 262-77.
58. Ahangarpour, A., Alboghobeish, S., Oroojan, A., Zeidooni, L., Samimi, A., y Afshari, G. et al., *Effects of Combined Exposure to Chronic High-Fat Diet and Arsenic on Thyroid Function and Lipid Profile in Male Mouse*. Biol Trace Elem Res, 2017. **182**(1): p. 12.
59. Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Umesono, K., Akanuma, Y., Fujiwara, T., Horikoshi, H., Yazaki, Y., y Kadowaki, T. *Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats*. J Clin Invest, 1998. **101**(6): p. 1354-61.
60. Lowe, E., O'Rahilly, S., and Rochford, J. *Adipogenesis at a glance*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 16): p. 2681-6.
61. Saponaro, C., Gaggini, M., Carli, F., y Gastaldelli, A. *The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis*. Nutrients, 2015. **7**(11): p. 9453-74.
62. Solinas, G., Boren, J., y Dulloo, A. *De novo lipogenesis in metabolic homeostasis: More friend than foe?* Mol Metab, 2015. **4**(5): p. 367-77.
63. Turner, N., Kowalski, G., Leslie, S., Risis, S., Yang, C., Young, R., Babb, J., Meikle, P., Lancaster, G., Henstidge, D., White, P., Kraegen, E., Marette, A., Cooney, G., Febbraio, M., y Bruce, C. *Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding*. Diabetologia, 2013. **56**(7): p. 1638-48.
64. Chakrabarti, P., Kim, J., Singh, M., Shin, Y., Kim, Y., Kumbrink, J., Wu, Y., Lee, M., Kirsch, K., Fried, S., y Kandror, K. *Insulin inhibits lipolysis in adipocytes via the evolutionarily conserved mTORC1-Egr1-ATGL-mediated pathway*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(18): p. 3659-66.
65. Frayn, N., *Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux*. Diabetologia, 2002. **45**(9): p. 1201-10.

66. Choi, M., Tucker, D., Gross, D., Easton, R., Dipilato, L., Dean, A., Monks, B., Birnbaum, M. *Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(21): p. 5009-20.
67. Hou, Y., Xue, P., Woods, C., Wang, X., Fu, J., Yarborough, K., Qu, W., Zhang, Q., Andersen, M., y Pi, J. *Association between arsenic suppression of adipogenesis and induction of CHOP10 via the endoplasmic reticulum stress response*. Environ Health Perspect, 2013. **121**(2): p. 237-43.
68. Diaz, A., Cruz, L., Cebrián, A., Hernández, R., Hiriart, M., Vargas, G., Bassol, S., Sordo, M., Gandolf, A., Klimecki, W., Carillo, L., Cebrián, M., Wegman, P. *Arsenic exposure and calpain-10 polymorphisms impair the function of pancreatic beta-cells in humans: a pilot study of risk factors for T2DM*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e51642.
69. Paul, S., Walton, F., Saunders, R., y Stýblo, M. et al., *Characterization of the impaired glucose homeostasis produced in C57BL/6 mice by chronic exposure to arsenic and high-fat diet*. Environ Health Perspect, 2011. **119**(8): p. 1104-9.
70. Hou, H., Yu, Y., Shen, Z., Liu, S., y Wu, B. *Hepatic transcriptomic responses in mice exposed to arsenic and different fat diet*. Environ Sci Pollut Res Int, 2017. **24**(11): p. 10621-10629.
71. Paul, S; Harmon, A., Devesa, V., Thomas, D; Stýblo, M. *Molecular mechanisms of the diabetogenic effects of arsenic: inhibition of insulin signaling by arsenite and methylarsonous acid*. Environ Health Perspect, 2007. **115**(5) p. 734-742
72. Parlee, D., Lentz S; Mori H; MacDougald; *Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue*. National Institutes of Health, 2014. 537. p.93-122: