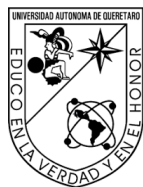


2020

“Análisis de los efectos de distintas combinaciones de Bisfenol-A, Mono (2-etilhexil) ftalato y Butilparabeno en la regulación genética y morfológica durante la adipogénesis en modelo *in vitro*”

Med. Gral. Fernando Manuel Guerrero Meza



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

“ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE DISTINTAS
COMBINACIONES DE BISFENOL-A, MONO (2-ETILHEXIL)
FTALATO Y BUTILPARABENO EN LA REGULACIÓN
GENÉTICA Y MORFOLÓGICA DURANTE LA ADIPOGÉNESIS
EN MODELO *IN VITRO*”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

Presenta:

Med. Gral. Fernando Manuel Guerrero Meza

Dirigido por:

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga

Querétaro, Qro a noviembre del 2020



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias en Biomedicina

**“ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE DISTINTAS COMBINACIONES DE
BISFENOL-A, MONO (2-ETILHEXIL) FTALATO Y BUTILPARABENO EN
LA REGULACIÓN GENÉTICA Y MORFOLÓGICA DURANTE LA
ADIPOGÉNESIS EN MODELO IN VITRO”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

Presenta:

Med. Gral. Fernando Manuel Guerrero Meza

Dirigido por:

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga
Presidenta

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie
Secretaria

Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano
Vocal

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda
Suplente

Dr. Juan Carlos Solís Sáinz
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre del 2020
México

Dedicatoria.

A quienes han dejado una marca en mi vida; mis padres que me educaron, mis amigos que me alentaron, mis maestros que me guiaron, aquellas personas que creyeron en mí, a mi corazón, mi motivación y mi esfuerzo que me mantiene en el camino y a Dios que me lo ha dado todo.

A ustedes, gracias.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Agradecimiento

Agradezco el apoyo de beca No.716961 recibido por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que permitió la realización de mis estudios de Maestría.

Agradezco el apoyo con los fondos FOFI-UAQ (FME201806) otorgados por la Universidad Autónoma de Querétaro para la ejecución de los experimentos de mi proyecto de tesis.

De igual forma es importante para mi reconocer y agradecer el esfuerzo, la confianza y el apoyo incondicional que me fue otorgado por los miembros del comité tutorial durante el tiempo de preparación y formación que llevé a cabo en el programa. A la Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie, la Dra Haydé Azaneth Vergara Castañeda, la Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano, el Dr. Juan Carlos Solís Sáinz y especialmente a la Dra. Ana Gabriela Hernández Puga, a todos ustedes mis maestros y guías muchas gracias.

Índice

Agradecimiento.....	4
Índice de Cuadros.....	7
Índice de Figuras.....	8
Abreviaturas y siglas.....	9
Resumen.....	10
Abstract.....	11
I.- Introducción.....	12
II. Antecedentes.....	14
Obesidad.....	14
Obesidad en México.....	14
Disruptores endocrinos.....	15
• Bisfenol-A.....	16
• Ftalatos.....	17
• Parabenos.....	17
Tejido adiposo.....	19
Regulación génica en la adipogénesis.....	21
• PPAR γ	21
• C/EBP α	22
• GLUT-4.....	23
Disruptores endocrinos y obesidad.....	23
III. Hipótesis.....	24
IV. Objetivo General.....	24
IV.I Objetivos específicos.....	24
V. Material y métodos.....	25
Población.....	25
Metodología.....	25
VI. Resultados.....	29
VI.1. Acumulación de grasa en los adipocitos maduros.....	29
VI.1.1 Análisis de imágenes de tinción ORO.....	30
VI.1.2 Determinación de la saturación de grasa.....	30

VI.1.3. Determinación del diámetro del lóculo de grasa.	33
VI.2. Determinación de la expresión génica de PPAR γ , C/EBP α y GLUT-4.....	35
VI.2.1 Extracción de RNA total.....	35
VI.2.2. Análisis de la expresión génica mediante qPCR.	36
VII. Discusión	37
VIII. Conclusión.....	41
IX. Bibliografía	42

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Índice de Cuadros

Cuadro 1.....18

Cuadro 2.....19

Cuadro 3.....25

Cuadro 4.....26

Cuadro 5.....27

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Índice de Figuras

Figura 1.....	21	Figura 7.....	32
Figura 2.....	28	Figura 8.....	33
Figura 3.....	29	Figura 9.....	34
Figura 4.....	30	Figura 10.....	35
Figura 5.....	31	Figura 11.....	36
Figura 6.....	31	Figura 12.....	37

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Abreviaturas y siglas

BPA: Bisfenol-A.

BuP: Butilparabeno.

C/EBP α : Proteína de unión al potenciador CCAAT alfa.

DEs: Disruptores Endocrinos.

GLUT-4: Transportador de glucosa tipo 4.

MEHP: Mono(2-etilhexil) ftalato.

PPAR γ : Receptor activado del proliferador de peroxisoma gamma.

KLF: Familia de los factores de transcripción *Kruppel-like*.

AP-1: proteína -1 activadora.

UCP1: Proteína 1 de desacoplamiento (*Uncoupling protein-1*).

FABP 4: Proteína de unión a ácidos grasos 4 (Fatty acid-Binding protein 4).

Resumen

Los disruptores endocrinos (DEs) son compuestos químicos con la capacidad de alterar los sistemas endocrinos afectando su funcionamiento. El bisfenol-A (BPA), el mono(2-etilhexil) ftalato (MEHP) y el butilparabeno (BuP) son de amplio uso en la industria para la fabricación de biberones, contenedores de comida, cosméticos y fármacos. La exposición a DEs se asocia al desarrollo de patologías como la obesidad, caracterizada por la acumulación excesiva de tejido adiposo. El tejido adiposo contiene fibroblastos y adipocitos, estos últimos almacenan grasa en su interior. La adipogénesis, proceso durante el cual los fibroblastos maduran a adipocitos, requiere la activación secuencial de factores de transcripción como PPAR γ y C/EBP α/β considerados como reguladores maestros de la adipogénesis. BPA, MEHP y BuP inducen efectos obesogénicos al incrementar la expresión de PPAR γ y promover la proliferación y diferenciación de adipocitos. No obstante, los efectos obesogénicos de los DEs se han descrito de forma individual y en un contexto real donde el ser humano se encuentra expuesto a diversos compuestos químicos; por lo que resulta de gran importancia evaluar los efectos de combinaciones específicas de DEs para determinar su rol en el desarrollo de patologías de alta prevalencia a nivel mundial como la obesidad. El objetivo del presente estudio fue determinar los posibles efectos genéticos y morfológicos inducidos por combinaciones de BPA, MEHP y BuP durante el proceso de adipogénesis empleando un modelo *in vitro*. Se emplearon fibroblastos 3T3-L1 tratados con distintas combinaciones de BPA, MEHP y BuP durante la etapa de proliferación celular, posteriormente se indujo la adipogénesis y se incubaron hasta su maduración a adipocitos. Para determinar cambios genéticos se evaluó la expresión génica de PPAR γ , C/EBP α y GLUT-4 mediante qPCR y para determinar cambios morfológicos se determinó la concentración de ácidos grasos mediante tinción ORO (rojo oleoso). Los resultados del análisis de imagen y cuantificación de los ácidos grasos de las células teñidas con ORO, mostraron que las células tratadas con DEs (grupos A, B y C) acumularon una mayor concentración de ácidos grasos comparados con los grupos control (basal y vehículo). Además, las células de los grupos A y B presentaron una hipertrofia de los lóculos de grasa. La qPCR determinó una mayor expresión de C/EBP α en los grupos A y B comparada con el control. En conclusión, las combinaciones de BPA, MEHP y BuP promueven un mayor almacenamiento de grasa en los adipocitos su efecto está dirigido a la hipertrofia de los lóculos de grasa provocando mayor saturación de grasa en la célula.

Palabras clave: Bisfenol-A, Adipogénesis, 3T3- L1, PPAR γ , gotas de grasa.

Abstract

Endocrine disruptors (EDs) are chemical compounds with the ability to alter endocrine systems, affecting their functioning. Bisphenol-A (BPA), mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), and butylparaben (BuP) are widely used in industry for the manufacture of baby bottles, food containers, cosmetics, and drugs. Exposure to EDs is associated with the development of pathologies such as obesity, characterized by the excessive accumulation of adipose tissue. Adipose tissue contains fibroblasts and adipocytes, the latter store fat inside. Adipogenesis, the process during which fibroblasts mature into adipocytes, requires the sequential activation of transcription factors such as PPAR γ and C / EBP α / β considered as master regulators of adipogenesis. BPA, MEHP, and BuP induce obesogenic effects by increasing the expression of PPAR γ and promoting the proliferation and differentiation of adipocytes. However, the obesogenic effects of EDs have been described individually and in a real context where the human being is exposed to various chemical compounds; Therefore, it is of great importance to evaluate the effects of specific combinations of EDs to determine their role in the development of highly prevalent pathologies worldwide, such as obesity. The objective of the present study was to determine the possible genetic and morphological effects induced by combinations of BPA, MEHP and BuP during the adipogenesis process using an in vitro model. 3T3-L1 fibroblasts treated with different combinations of BPA, MEHP and BuP were used during the cell proliferation stage, subsequently adipogenesis was induced and they were incubated until maturation into adipocytes. To determine genetic changes, the gene expression of PPAR γ , C / EBP α and GLUT-4 was evaluated by qPCR and to determine morphological changes, the concentration of fatty acids was determined by ORO staining (oily red). The results of the image analysis and quantification of the fatty acids of the cells stained with ORO, showed that the cells treated with DEs (groups A, B and C) accumulated a higher concentration of fatty acids compared to the control groups (basal and vehicle). Furthermore, cells in groups A and B exhibited hypertrophy of the fat locules. The qPCR determined a higher expression of C / EBP α in groups A and B compared to the control. In conclusion, the combinations of BPA, MEHP and BuP promote greater fat storage in adipocytes, its effect is directed at the hypertrophy of the fat locules causing greater fat saturation in the cell.

Key Words: Bisphenol-A, Adipogenesis, 3T3- L1, PPAR γ , lipid droplets.

I.- Introducción

Los disruptores endócrinos (DEs) son compuestos exógenos presentes en diversos productos de uso diario que inducen efectos adversos en la salud de un organismo. El efecto de los DEs radica en su acción en el sistema endócrino, siendo agonistas o antagonistas en las funciones hormonales. Los efectos de los disruptores dependen de factores como la susceptibilidad del organismo (su estado de madurez), concentración del compuesto, vía de absorción (oral, dérmica, etc.) y tiempo de exposición al mismo, por mencionar algunos.

Una de las alteraciones por DEs que ha tenido más relevancia es con los denominados obesógenos, los cuales son compuestos con la capacidad de afectar los genes involucrados con el metabolismo de la grasa corporal aumentando su concentración. Los DEs están presentes en grandes cantidades en productos de consumo diario a los cuales está expuesta la población mexicana, por lo que podrían ser un factor de riesgo para generar obesidad.

Para determinar los efectos de los DEs, los modelos *in vitro* e *in vivo* resultan de utilidad para determinar el efecto de dosis encontradas en productos de uso común. Un ejemplo de los estudios previos está en Ariemma *et al.*, 2016, Hu *et al.*, 2012 y Hao *et al.*, 2012 donde se observa el efecto individual de diferentes DEs en la morfología y expresión genética durante el proceso de diferenciación de los fibroblastos a adipocitos.

Sin embargo, a pesar de la evidencia científica que respalda las alteraciones potenciales en los modelos de estudio experimental y del conocimiento sobre la cantidad de DEs consumidos en la vida diaria, es poco el interés de organismos gubernamentales en la regulación del uso de los DEs en la industria. La importancia de nuestra investigación radica en la generación de evidencia científica de los riesgos de los DEs en la vida diaria, que a su vez promueva acciones de diferentes organismos privados por encontrar alternativas para el uso de estos compuestos y/o regular su exposición al ser humano en base al consumo.

El objeto de nuestra investigación son tres compuestos con efectos obesogénicos: bisfenol-A (BPA), butilparabeno (BuP) y mono(2-etilhexil) ftalato (MEHP). El BPA y los ftalatos son empleados en la fabricación de plásticos debido a sus propiedades para hacer moldeable y flexible el plástico encontrándose en botellas de agua, revestimientos de tuberías, envases, juguetes y en productos textiles. Mientras que los parabenos se utilizan como agentes antimicrobianos para la conservación de productos como alimentos y medicamentos. El efecto obesogénico de los compuestos disruptores endocrinos (DEs) bisfenol-A, mono-2-etilhexiltalato y butilparabeno ha sido ampliamente descrito de forma individual; sin embargo, pocos estudios han evaluado los efectos biológicos de mezclas de DEs, considerando que los sistemas biológicos se encuentran expuestos diariamente a distintas combinaciones de DEs presentes en el ambiente.

La combinación de diferentes DEs puede provocar efectos en el proceso de adipogénesis al inducir la sobreexpresión de genes maestros, tales como PPAR γ y C/EBP α , promoviendo hipertrofia y/o hiperplasia de adipocitos y por tanto ser un factor importante en el desarrollo de obesidad sus complicaciones.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

II. Antecedentes

Obesidad.

La organización mundial de la salud (OMS) define a la obesidad y al sobrepeso como la acumulación anormal o excesivo de tejido graso que puede ser potencialmente perjudicial para la salud (OMS, 2016). Un método diagnóstico de la obesidad es el índice de masa corporal (IMC), calculándolo como el peso (P) de una persona promedio en kilos entre el cuadrado de la altura (A) en metros (P/A^2), dando un rango normal entre 18 y 25 kg/m^2 donde el sobrepeso se estima entre 25-29 y la obesidad de $>30 \text{ kg}/\text{m}^2$ (con sus diferentes grados; I, II, III) (CENETEC, 2011).

La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de distintas enfermedades crónicas no transmisibles como la diabetes, la hipertensión arterial y el síndrome metabólico (ANCAM, 2002). Anteriormente se consideraba a la obesidad como un problema de países con ingresos económicos altos, hoy en día es un padecimiento que está presente en la población sin distinción de raza, estado socioeconómico o género (Loria *et al.*, 2014).

Al ser un problema de salud pública, es responsabilidad de las autoridades sanitarias y gubernamentales brindar apoyo para la búsqueda de soluciones, medidas preventivas o para la identificación de factores de riesgo asociados con el objetivo de reducir dicho padecimiento en la población (OMS, 2016).

Obesidad en México.

A nivel mundial, México ocupa el segundo lugar en población obesa adulta y el primer lugar en obesidad infantil (OMS, 2016). En donde 7 de cada 10 adultos (72.5%), presentan sobrepeso u obesidad. La mayor prevalencia se presenta en las mujeres (75.6%) en comparación con los hombres (69.4%) (ENSANUT-MC, 2016; ENSANUT 100K, 2018).

El estudio de la obesidad y el sobrepeso en los distintos grupos poblacionales indica la prevalencia de la enfermedad en nuestro país. Datos de la ENSANUT-MC, 2016; ENSANUT 100 K 2018 muestran que:

- Tres de cada diez menores de 5 a 11 años presentan obesidad.
- 4 de cada 10 adolescentes padecen obesidad.
- 7 de cada 10 adultos padecen obesidad.

Otro factor importante es que este tipo de incremento ha sido gradual, aumentando de esta forma no solo el nivel de enfermedades asociadas a la obesidad, sino además el costo al financiamiento público que se da para las distintas enfermedades.

El costo anual destinado al sector salud en México para el 2018 fue de 122,557.3 millones de pesos, donde un porcentaje de aproximadamente 73 a 87 mil millones serían destinados a la atención de la obesidad, el sobrepeso y diabetes (IMCO., 2015). Debido a ello es necesario identificar los factores de riesgo que incrementan la probabilidad del desarrollo de obesidad, siendo de interés particular la participación de factores ambientales, tales como los disruptores endocrinos.

Disruptores endocrinos.

Los disruptores endocrinos son compuestos químicos con la capacidad de interferir con la acción de las hormonas a nivel de síntesis, transporte, metabolismo y mecanismo de acción; impactando de forma negativa sobre diversos ejes hormonales, afectando su acción y provocando así anomalías en el desarrollo y la reproducción (Casals & Desvergne, 2011; Gore *et al.*, 2015).

El término de disruptor endocrino o *EDC* (por sus siglas en inglés *Endocrine Disruptor Chemical*) fue acuñado por primera vez en 1991 en la Wingspread Conference Center en Wisconsin, reunión que tuvo por objetivo mostrar la evidencia científica sobre las alteraciones en la salud humana, provocadas por los diferentes químicos en la naturaleza (Colborn *et al.*, 1993).

El empleo de compuestos químicos con potencial efecto disruptor endocrino, se remonta a épocas anteriores a la segunda guerra mundial, en donde DEs como el gas mostaza, insecticidas, pesticidas y herbicidas como el dicloro difenil tricloro etano (DDT), el óxido de tributil estaño (TBT) y la atrazina (Argemi *et al.*, 2005), inducían alteraciones en los distintos niveles del desarrollo. Un ejemplo de ello es el bloqueo del desarrollo sexual en las ratas por exposición a estrógenos sintéticos como el dietilestilbestrol usado anteriormente como antiabortivo (Embid, 2009; Gore *et al.*, 2015).

Asimismo, la exposición a disruptores endocrinos se ha relacionado con múltiples enfermedades crónico-degenerativas como obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, así como con otras patologías como infertilidad, comportamientos hiperactivos, autismo, cáncer de mamá y próstata, entre otras (Gore *et al.*, 2015).

El efecto biológico de los DEs depende de diversos factores como son: la naturaleza del compuesto (sintético o natural), concentración, afinidad por su(s) receptor(es) blanco,

duración de la exposición y etapa de vida del organismo (intrauterina, infante, adulto) (Moreno *et al.*, 2012). Lo anterior promueve el estudio de los efectos de distintas dosis de DEs mediante experimentos de curvas dosis-respuesta (Doerge *et al.*, 2010; Vanderberg *et al.*, 2012).

Debido a su naturaleza química, los DEs afectan distintas vías de señalización hormonales, como aquellas dependientes de estrógenos, andrógenos, hormonas tiroideas, glucocorticoides, los receptores activados del proliferador de peroxisoma e incluso vías del metabolismo de neurotransmisores, entre otras; por lo cual, tienen el potencial de participar en el desarrollo de múltiples patologías de gran relevancia en salud pública (Gore *et al.*, 2015).

Entre los DEs de interés se encuentran los compuestos químicos bisfenol-A, ftalatos y parabenos.

- **Bisfenol-A.**

El bisfenol-A o BPA (por sus siglas en inglés) (4,40-dihidroxi-2,2-difenilpropano, CAS 80-05-7), es un compuesto químico empleado en la síntesis de polímero de policarbonato. Comúnmente utilizado para la fabricación de artículos plásticos como el policloruro de vinilo (PVC con número de código 3), el poliestireno (PS con número de código 6) se pueden encontrar en algunos productos plásticos como son: garrafones, botellas de plástico, vasos térmicos, papel térmico, biberones, juguetes, moldes de pastelería; así como en la síntesis de resinas epóxicas empleadas en la elaboración de recubrimientos internos de latas metálicas, por lo que ha sido detectado en alimentos enlatados, agua potable, aguas residuales, el aire y el polvo (García *et al.*, 2015).

Actualmente, el uso de BPA está permitido en la industria; sin embargo, se han reportado investigaciones donde se observa liberación del compuesto en dosis de 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de plástico, por lo que se ha establecido un límite permitido de ingesta de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de acuerdo con la Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (EFSA) (García *et al.*, 2015).

El BPA es metabolizado en el hígado, donde es conjugado para formar BPA-glucoronido y BPA sulfato, posteriormente es excretado por medio de la orina. El BPA no conjugado es el inductor de los efectos biológicos debido a su alta afinidad por los receptores nucleares ER α , ERR γ y PPAR γ (Li *et al.*, 2015), a los cuales estimula de forma mimética. La vida media del BPA en suero es de 5-8 h, no obstante, el ser humano está en constante exposición a BPA debido al empleo de los productos que lo contienen (Ariemma *et al.*, 2016).

Entre los efectos biológicos del BPA se encuentran alteraciones metabólicas e inflamatorias, afectando directamente el proceso de adipogénesis en modelos de fibroblastos 3T3-L1 y adipocitos de tejido subcutáneo humano (Valentino *et al.*, 2013; Angle *et al.*, 2014).

- **Ftalatos.**

Los ftalatos son compuestos sintéticos derivados del ácido tático y son comúnmente empleados en la fabricación de diversos productos como juguetes de plástico, contenedores plásticos de alimentos, cosméticos y lubricantes, entre otros. Uno de los ftalatos más utilizados es el ácido 2-etil-hexiltalato (DEHP, *por sus siglas en inglés*), cuya ingesta total en alimentos conservados en recipientes de plástico como leche, queso, carne y aceites comestibles, se encuentra dentro de un rango de 0.27 mg/d (3.8 µg/kg/día) hasta 2.0 mg/d (30 µg/kg/día) (Huber *et al.*, 1996). Otros estudios han mostrado que durante el procesamiento de alimentos puede transferirse hasta 160 µg/día de DEHP a los seres humanos (Itsuki *et al.*, 2007).

El DEHP es metabolizado en hígado y riñón, en donde es hidrolizado en ácido mono-2-etil-hexiltalato (MEHP, *por sus siglas en inglés*) y 2 etil-hexanol, siendo el MEHP el compuesto con actividad biológica y el 2 etil-hexanol, un metabolito inactivo que es conjugado con el difosfato de uridina-glucoroniltransferasa para ser excretado por la orina (Bustamante *et al.*, 2001).

Al igual que el bisfenol, los ftalatos se han estudiado en modelos de adipocitos de ratones a dosis crónicas de 5 mg/kg, observando un efecto adipogénico al activar los receptores PPAR γ (Feige, 2007).

- **Parabenos.**

Son ésteres del ácido p-hidroxibenzoico usado comúnmente en la industria de los cosméticos, fármacos y alimentos como conservadores. Los parabenos más utilizados son el metilparabeno, propilparabeno, butilparabeno y etilparabeno, su concentración más frecuente.

Los parabenos están relacionados con el proceso de adipogénesis en modelos celulares 3T3-L1, donde su efecto es en la estimulación de los receptores PPAR γ (Hu *et al.*, 2013)

La principal vía de ingesta de los parabenos es enteral y tópica, y una vez ingeridos son metabolizados por estereasas en el intestino y la piel y excretados por la orina. Se han llegado a reportar niveles de metilparabeno de forma libre y conjugada en orina de 0.28 μM y 4 μM respectivamente (Ye *et al.*, 2006).

En relación a su absorción, se conoce que la estructura química es un factor importante para su absorción, mientras más larga sea la cadena de alquilo lineal mayor es su efecto adipogénico, siendo en orden ascendente de tamaño el etilparabeno (EP), propilparabeno (PP) y butilparabeno (BuP) (Hu *et al.*, 2013).

Debido a su fácil disponibilidad y constante presencia en nuestro entorno todos los individuos son susceptibles a la exposición a DEs (García *et al.*, 2012) el **Cuadro 1** y **Cuadro 2** recopilan características de los DEs (Bustamante *et al.*, 2001; Itsuki *et al.*, 2007; Casals & Desvergne., 2011; González-Castro *et al.*, 2011; García *et al.*, 2015; Li 2015; Moos *et al.*, 2016; Adoamnei E *et al.*, 2018; Artacho *et al.*, 2018; Kraiss *et al.*, 2018; Fransway *et al.*, 2019; Martínez-Ibarra *et al.*, 2019).

Cuadro 1. Disruptores endócrinos y sus concentraciones en líquidos biológicos (T.A: tejido adiposo; PVC: cloruro de polivinilo; PS: poliestireno; PET: Tereftalato de polietileno; AINES: Antiinflamatorios no esteroideos; PCP: productos de cuidado personal.

Disruptor y tipo de compuesto	Productos donde se encuentra	Concentraciones en productos	Concentraciones reportadas en seres humanos
Bisfenol A	PVC (3), PS (6), P y resinas en latas de aluminio, botellas de agua.	0.21 – 1.92 ng/ml	Orina: 0.1-10 ng/ml T.A: 0.54-7.88 ng/g
Mono (2-etilhexil) ftalato	Cubetas, juguetes, cosméticos, botes de plástico.	0.096-0.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Orina: 10 - 91.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Butilparabeno	Fármacos (AINES), alimentos (cereales), cosméticos y PCP.	9.67 ng/g – 1,300 ng/g	Orina: 0.1 – 1.9 ng/ml T. A: 0.5-2.75 ng/g

Cuadro 2. Características de los disruptores endócrinos.

Características	BPA	BUP	MEHP
Ingesta	Vía oral	Vía oral/Dérmica	Vía oral
Absorción	Lumen intestinal	Lumen intestinal/capilares de la piel	Lumen intestinal
Metabolismo	Estereasas/ Glucoronidación	Estereasas/ Glucoronidación	Estereasas/ Glucoronidación
Vida Media	5-6 hr	8-10 hr	8 hr
Promedio de eliminación	3 hr	3.3 hr	3 hr
Dosis permitida	0.4 µg/kg/día	0.4-0.8% del peso total del producto	3.8-30 µg/kg/día
Coefficiente de partición octanol/agua	3.2-3.6	4.0-4.3	4.92

Tejido adiposo.

El tejido graso es un órgano de diversas características que se clasifica en dos tipos: tejido adiposo blanco (o *WAT: white adipose tissue*) y tejido adiposo marrón (o *BAT: Brown adipose tissue*), las cuales tienen contacto con una gran variedad de células entre ellas células endoteliales, sanguíneas, fibroblastos, preadipocitos y macrófagos (Sarjeant *et al.*, 2012).

La morfología de los adipocitos blancos y marrones es variable, los adipocitos blancos son generalmente esféricos con un diámetro de 10-100 µm, poseen un depósito de grasa en forma de triglicérido que abarca gran extensión del citoplasma celular, los organelos son desplazados hacia la periferia siendo comprimidos entre la membrana plasmática y la grasa (Cinti, 2005).

Los adipocitos del tejido marrón son de forma elipsoidal, varían de 15-50 μm , contienen una gran cantidad de mitocondrias, así como múltiples gotas de grasa distribuidas en el citoplasma al igual que los organelos. El núcleo se observa centralizado y se puede apreciar una gran distribución de mitocondrias (Fajas *et al.*, 1997; Cinti, 2005; Sarjeant *et al.*, 2012).

Diversos estudios han considerado al tejido adiposo como un órgano endocrino al secretar hormonas como la leptina y la adiponectina, necesarias en el metabolismo de la glucosa y los lípidos (Sarjeant *et al.*, 2012).

Los adipocitos son células derivadas de precursores mesenquimales pluripotenciales, siendo capaz de madurar a distintas líneas celulares, su proceso de diferenciación *in vitro* es inducido con diversos factores de crecimiento como suero fetal bovino, glucocorticoides e insulina (Sarjeant *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2017).

Estudios recientes han demostrado que los diferentes tipos de grasa (WAT y BAT) pueden provenir de diferentes precursores como son las células miogénicas que expresan Myf5, células mieloides (Sarjeant *et al.*, 2012). Además de sus diferentes precursores, los tejidos WAT y BAT también tendrán señales de activación diferentes, por un lado, WAT estará ligada a la acción de la insulina, mientras que BAT deberá su activación a la estimulación de la noradrenalina por el sistema simpático (Sarjeant *et al.*, 2012). De igual forma en WAT se inicia la transcripción con la proteína -1 activadora (AP-1) comenzando el proceso de adipogénesis, su diferenciación, así como el acarreamiento de ácidos grasos en el citosol del adipocito (Sarjeant *et al.*, 2012; Lowe *et al.*, 2011). El BAT inicia su proceso de diferenciación en conjunto con la expresión de la UCP1 (*Uncoupling protein one*) la cual provoca la síntesis y acarreamiento de los ácidos grasos en el interior del adipocito (Sarjeant *et al.*, 2012).

La **Figura 1** esquematiza las diferencias morfológicas e histológicas de los diferentes tejidos adiposos.

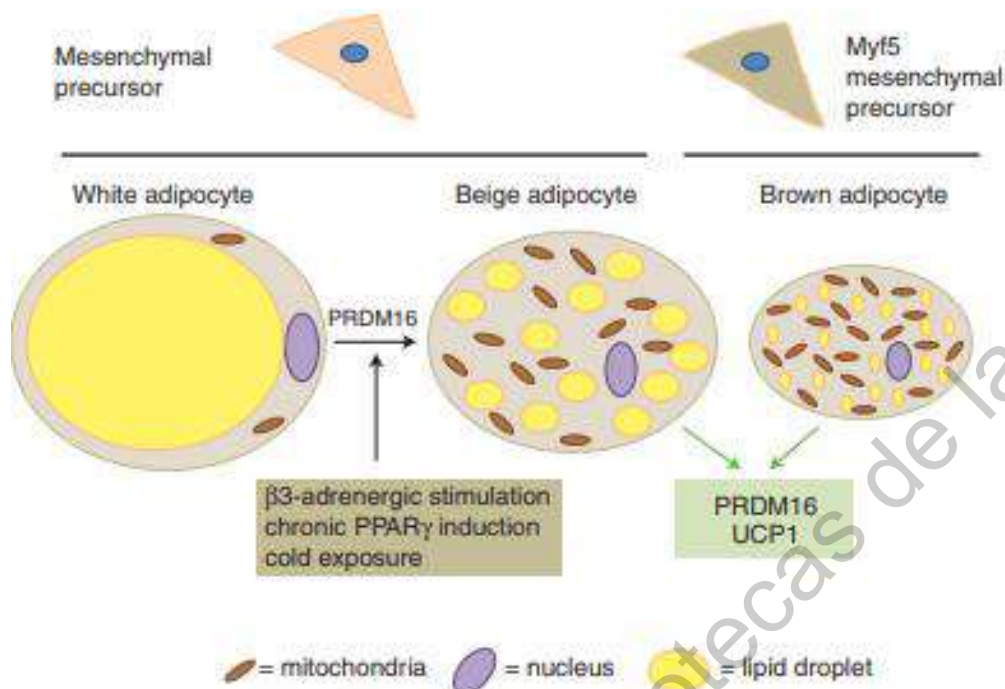


Figura 1. Diferencia entre el tejido blanco y marrón. Los adipocitos blancos y marrones provienen de linajes celulares distintos permitiendo una morfología diferente entre ellas, así como su función. Tomado de Sarjent *et al.*, 2012.

Regulación génica en la adipogénesis.

La adipogénesis es un proceso que abarca distintos cambios tanto morfológicos como genéticos. Estos cambios son regulados en su mayoría por genes adipogénicos que tendrán efectos tempranos y tardíos en el proceso de crecimiento y diferenciación de la célula precursora al adipocito maduro (Lowe *et al.*, 2011).

- **PPAR γ**

Actualmente se considera al PPAR γ como el centro de la adipogénesis debido a su papel como inductor de la transcripción de proteínas adipogénicas (AP2, FABP4, entre otras) así como un estimulador de otros genes adipogénicos como lo es C/EBP α (Fajas *et al.*, 1997; Lowe *et al.*, 2011). Su estructura está formada por un dominio N- terminal unión de activación independiente del ligando (AF-1), un dominio de unión al DNA (DBD) y un dominio C- terminal de unión al ligando (LBD) que contiene una función de activación dependiente del ligando (AF2) (Lefterova *et al* 2014).

Una vez unido al ligando el PPAR γ forma un heterodímero con el receptor de retinoide (RXR) para su unión con el elemento de respuesta de PPAR, formado por la secuencia AGGTCA permitiendo la transcripción de factores adipogénicos (Lefterova *et al* 2014). De esta manera es cómo actúan como factores de transcripción activados por distintos ligandos, entre ellos los de origen natural como los ácidos grasos polinsaturados, las prostaglandinas y los eicosanoides y los de origen sintético como los fármacos de la familia de las tiazolinedionas (Troglitazona, Pioglitazona y Rosiglitazona) que regulan la expresión de genes necesarios en la diferenciación celular y sus distintos procesos metabólicos como son la homeostasis de lípidos y la glucosa (Wright *et al* 2000; Chandra *et al* 2008).

La familia de genes PPAR comprende diversas isoformas (PPAR α , PPAR β y PPAR γ), los tres se diferencian de acuerdo a su distribución en los tejidos del cuerpo. En el tejido adiposo blanco y marrón se encuentra PPAR γ , también se puede ver su presencia en hepatocitos y miocitos siendo su concentración mayor en los adipocitos, favoreciendo así el almacenamiento de lípidos (Janani *et al.*, 2015).

Alteraciones en la expresión de PPAR γ son los causantes del desarrollo de diferentes patologías como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, la aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares (Mirza *et al* 2019).

- **C/EBP α**

Son una familia de transcripción que consta de al menos 6 miembros (α , β , δ , γ , ϵ y ζ), se conforman por tres estructuras; una región de unión al DNA (LBD), una cremallera de leucina C-terminal y una región transactivadora N-terminal. Se ha determinado que la familia C/EBP está involucrada en la diferenciación de los adipocitos en la oleada de inicio temprano (C/EBP β y δ) y en la tardía (C/EBP α). *In vitro* se ha observado que el C/EBP es estimulado por la metilisobutilxantina, así como por la dexametasona en las primeras horas de la adipogénesis (Wedel *et al.*, 1995; Sarjeant *et al.*, 2012).

Se ha visto que el C/EBP α participa en un bucle de alimentación positiva junto con el PPAR γ , aumentando su expresión y viceversa. Además, su efecto sinérgico se observa al facilitar su mutua unión a la cromatina aumentando el reclutamiento de coactivadores y la activación de genes adipogénicos específicos para PPAR γ y C/EBP α acelerando el proceso adipogénico comparado con aquel en presencia de PPAR γ o C/EBP α (Lefterova *et al* 2014; Madsen *et al* 2014).

De igual forma, otros estudios demuestran que el C/EBP α es suficiente para poder inducir los cambios adipogénicos en líneas celulares que son comprometidas a la adipogénesis, así como en las que solo son potencialmente diferenciables (Fajas *et al.*, 1997; Sarjeant *et al.*, 2012; Lefterova *et al* 2014).

- **GLUT-4**

El transportador de glucosa tipo 4 es una proteína miembro de las familias transportadoras de glucosa que permiten el paso de la glucosa al interior de la célula al adherirse a la membrana plasmática mediada mayormente por estimulación de la insulina y la expresión del PPAR γ (Fernyhough *et al.*, 2007). El GLUT-4 se expresa en tejidos como músculo estriado y el tejido adiposo blanco, además su efecto y concentración puede variar en diferentes organismos incluyendo variación entre mamíferos (Charron *et al.*, 1999).

Existen diversos factores de transcripción, activadores y represores que permiten la expresión del GLUT 4 en la célula por vías alternas no dependientes directamente de insulina, dando así alternativas en el entendimiento y tratamiento de enfermedades metabólicas (Armoni *et al.*, 2007). De igual forma, aunque el GLUT 4 se expresa de forma tardía comparada con la expresión de C/EBP y PPAR γ se sabe que la unión de estos factores permite la transcripción de GLUT 4 aún en ausencia de insulina (Fernyhough *et al.*, 2007).

Disruptores endocrinos y obesidad.

A lo largo de los años, la evidencia científica ha mostrado el efecto negativo de los disruptores endocrinos a la salud y al medio ambiente (Hossain *et al.*, 2007; Gore *et al.*, 2015; Heindel *et al.*, 2019) ha favorecido la generación de atención de organismos gubernamentales de diferentes países, que ha permitido generar listas de sustancias nocivas por parte de la *Food and Drug Association* (FDA) (Tong *et al.*, 2003) y la lista de químicos en investigación de la European Chemicals Agency (ECHA., 2018), las cuales pretenden alertar sobre los efectos potenciales de los compuestos químicos empleados en la industria.

Sin embargo, la deliberación sobre los posibles riesgos a la salud y la dosis de exposición sigue siendo un tema de controversia, es por ello que las futuras investigaciones nos ayudarán a crear un mejor concepto acerca del uso adecuado de dichos compuestos. son distintos factores que involucran su aumento y, además, su percepción a nivel de la población ha pasado de ser una señal de alarma o algo más común y aceptable (Uribe *et al.*, 2018). Por ello debemos de buscar la manera de si bien, no erradicar totalmente este padecimiento, de alguna forma poder prevenirlo para las futuras generaciones, los cuales, podrían sufrir las consecuencias a largo plazo (Heindel *et al.*, 2019).

La obesidad es una enfermedad que año con año aumenta en incidencia (Barquera *et al.*, 2009; Shamah *et al.*, 2019) y afecta a población en general. Es considerada una enfermedad crónica no transmisible de origen multifactorial, donde juegan un papel importante la herencia genética y los factores biológicos-conductuales (denominada obesidad secundaria)

(Bastos *et al.*, 2005; García *et al.*, 2012). Los DEs alteran el organismo causando diversas patologías entre las que destacan alteraciones metabólicas como la obesidad (Gore *et al.*, 2015), siendo la diferenciación de los adipocitos la etapa de mayor susceptibilidad al efecto de los DEs (Hu *et al.*, 2013).

Existen diversos modelos para observar los efectos obesogénicos de los DEs, el modelo murino 3T3-L1 es uno de los más utilizados ya que son células comprometidas a convertirse en adipocitos, donde se estimula en diferentes etapas de su desarrollo ya sea en la proliferación de los fibroblastos o posterior a la diferenciación del pre-adipocito (Hao *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012; Sarjeant *et al.*, 2012; Taxvig *et al.* 2012; Ariemma *et al.*, 2016).

El comprender el proceso de desarrollo normal del adipocito es de gran importancia ya que una alteración en su proceso de maduración contribuye de gran manera a su disfunción (Konadi *et al.*, 2016).

Existen diversas vías de señalización en los adipocitos que resultan blanco de disruptores endocrinos, entre ellos el receptor PPAR γ , el C/EBP α , el receptor de retinoide (RXR), las proteínas Krupper like factor 5 y 10 (KLF) y los receptores GLUT (Gore *et al.*, 2015).

III. Hipótesis

La exposición a distintas combinaciones de bisfenol-A, mono(2-etilhexil) ftalato y butilparabeno inducirán cambios genéticos y morfológicos durante la adipogénesis.

IV. Objetivo General

Determinar el efecto de distintas combinaciones de bisfenol-A, mono(2-etilhexil) ftalato y butilparabeno en la regulación genética y morfológica durante la adipogénesis.

IV.I Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de distintas combinaciones de BPA, MEHP y BuP en la expresión de C/EBP α , PPAR γ y GLUT-4 durante la adipogénesis.

- Determinar el efecto de distintas combinaciones de BPA, MEHP y BuP en la morfología de adipocitos maduros.

V. Material y métodos

Población

Células 3T3-L1 (fibroblastos de ratón albino suizo, ATCC CCL-92).

Metodología

A) Cultivo celular

Los fibroblastos 3T3-L1 de ratón (CL-173™) fueron donados amablemente por la Dra. Marisela Ahumada Solórzano y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su empleo.

Para su cultivo las células fueron sembradas en cajas de poliestireno de 60 mm y cultivadas en condiciones de cultivo estándar (37°C, 95% O₂ y 5% CO₂), medio de cultivo DMEM base (MB) (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 100 IU/ml de penicilina y 100 IU/ml de estreptomycin a una densidad de 1.2 x 10⁶ células por caja.

Las células fueron sincronizadas con medio de sincronización (MS) durante 24 h posteriores a la siembra. Posteriormente, las células fueron incubadas con medio de cultivo basal después y usando medio de tratamiento (MT) con las concentraciones que se indican en el **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Concentraciones de los DEs en el medio de cultivo.

Disruptor endocrino	A	B	C
BPA	0.1 nM	1 nM	10 nM
MEHP	3 µM	30 µM	100 µM
BuP	1 µM	10 µM	50 µM

Estudios anteriores han demostrado el efecto adipogénico con las dosis indicadas en el **Cuadro 1** (Hao *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012; Ariemma *et al.*, 2016).

El medio de cultivo se recambió junto con los tratamientos cada 48 h hasta alcanzar el 80% de la confluencia (10 días aproximadamente). En cada experimento fueron incluidos o grupos control tratados con o sin vehículo (etanol). Cada grupo fue evaluado por triplicado.

B) Diferenciación de las células 3T3-L1.

Una vez que los cultivos fueron confluentes el medio base fue reemplazado por medio de diferenciación durante 48 h y después se cambió por medio de incubación durante 48 h al final de las cuales el medio paso a ser medio de maduración como lo explica el Cuadro 4.

Cuadro 4. Composición de los medios para el cultivo y diferenciación adipogénica de células 3T3-L1

Medio Base (MB)	Medio de sincronización (MS) (24 h)	Medio con tratamiento (MT) (10 días)	Medio de diferenciación (MD) (48 h)	Medio de incubación (MI) (48 h)	Medio de Maduración (MM) (12 h)
DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
Suero fetal Bovino (SFB) 10%	Suero fetal Bovino (SFB) 3%	Suero fetal Bovino (SFB) 10%	Suero Fetal Bovino 10%	Suero Fetal Bovino 10%	Suero Fetal Bovino 10%
Penicilina (100 UI/ml)	Penicilina (100 UI/ml)	Penicilina (100 UI/ml)	Penicilina (100 UI/ml)	Insulina 174 nM	Penicilina (100 UI/ml)
Estreptomicina (100 UI/ml)	Estreptomicina (100 UI/ml)	Estreptomicina (100 UI/ml)	Estreptomicina (100 UI/ml)	Penicilina (100 UI/ml)	Estreptomicina (100 UI/ml)
		BPA (A: 0.1 nM, B:1nM, C:10 nM)	Dexametasona 10 µM	Estreptomicina (100 UI/ml)	
		MEHP (A:3 µM, B:30 µM, C:100 µM)	Insulina 174 nM		
		BuP (A: 1 µM, B: 10 µM, C: 50 µM).	3- isobutil-1- metilxantina (IBMX) 0.5 nM		

C) Extracción de ARN

La extracción del ARN total de las células 3T3-L1 se realizó por el método de Trizol™ (Invitrogen), posteriormente se obtuvo el ARN mensajero mediante RT-PCR empleando el instrumento Script cDNA Synthesis kit (Jenna Bioscience).

Cuadro 5. Primer diseñados para realizar la amplificación de los genes adipogénicos

Genes	Cebadores
C/EBP α	FWD 5'-TGGACAAGAACAGCAACG-3'; REV 5'-GTCAACTCCAGCACCTTC-3'.
PPAR γ	FWD: 5'-TGGTGCCTTCGCTGATGC-3'; REV 5'-CTGTGGTAAAGGGCTTGATGGCT-3'.
GLUT-4	FWD: 5'-TGCTCTCCGGTTCGTTGGGT-3'; REV 5'-GGTCCCCATCGTCAGAGCCG-3'.
Actina	FWD: 5'-TACAGCTTCACCACCACAGC -3' REV: 5'-TCTCCAGGGAGGAAGAGGA -3'

D) Técnica de qPCR

La expresión de los genes de interés fue evaluada mediante qPCR empleando el kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y el equipo Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos fueron diseñados empleando el software Primer-Blast (NCBI) para amplificar de forma específica a los genes de interés C/EBP α , PPAR γ y GLUT-4 (**Cuadro 5**).

La expresión génica fue calculada con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ empleando a β -actina como gen casero. La expresión relativa del gen C/EBP α en las células tratadas con DEs fue calculada con respecto a los grupos control. La expresión de los genes PPAR γ y GLUT-4 no fue determinada por limitaciones en tiempo debido a la contingencia sanitaria por COVID-19.

E) Tinción rojo oleoso (ORO).

Para determinar cambios en el contenido de ácidos grasos se empleó la técnica de tinción con rojo oleoso. Los adipocitos maduros fueron fijados con formaldehído al 4% y teñidos durante

30 min con la solución de Rojo Oleoso al 0.2% (40% de propanolol). Posteriormente, se lavó el tinte con 2-propanolol y las células fueron observadas al microscopio (Kraus *et al.*, 2016). La metodología del cultivo y la tinción de las células se resume en la **Figura 2**.

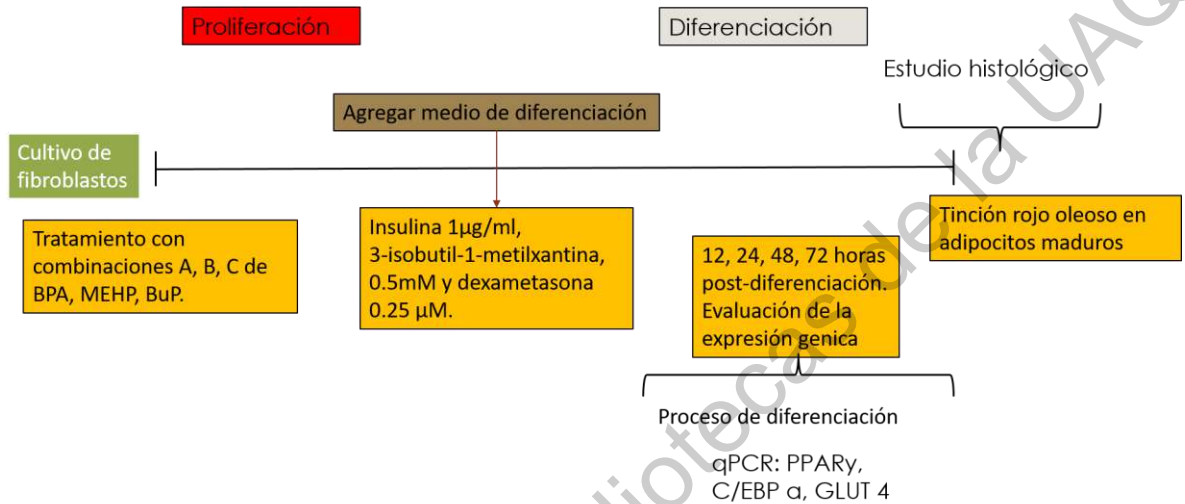


Figura 2. Diseño experimental. Las células 3T3-L1 fueron estimuladas con las combinaciones A, B y C de los disruptores endocrinos durante dos semanas de proliferación celular. Posteriormente se indujo la diferenciación con el medio de diferenciación durante 48 h y posteriormente se incubó con insulina durante 48 h. Finalmente las células fueron incubadas con medio base hasta su maduración (10-12 días). Se muestran los puntos de recolección de muestras de RNA total para los análisis de expresión génica y tinción ORO para el análisis morfológico.

F) Eliminación del material contaminado

Las muestras biológicas, así como el material no reutilizable que estuvo en contacto con ellas, se desecharon en bolsas rojas impermeables especiales para los desechos de tipo biológico.

Los medios de cultivo, así como las placas de cultivo con material biológico fueron neutralizadas con etanol al 70% y /o cloro al 2% antes de su desecho.

G) Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) acoplado a la prueba post-hoc Tukey para determinar diferencias entre los grupos control vs tratados,

empleando el software GraphPad Prism version 6. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a valores de $P \leq 0.05$.

VI. Resultados

VI.1. Acumulación de grasa en los adipocitos maduros.

La acumulación de grasa en los adipocitos maduros fue determinada mediante la tinción con rojo oleoso (ORO) que permite visualizar la presencia de gotas de grasa en las células, las cuales presentaron signos de maduración debido a los cambios morfológicos de fibroblasto a adipocito, como son forma circular, crecimiento de su citoplasma y acumulación de grasa en su interior **Figura 3**.



Figura 3. Microfotografía tinción ORO. Se observan los lóculos de grasa en la periferia dejando un espacio al interior de la célula donde se concentran los organelos celulares.

VI.1.1 Análisis de imágenes de tinción ORO.

Para determinar si el tratamiento con DEs inducía un cambio en la acumulación de grasa en los adipocitos maduros se realizó el análisis de imagen de las células teñidas con ORO, para ello se capturaron diez microfotografías elegidas al azar de cada grupo experimental y en diferentes campos (objetivos 10X y 40X) (**Figura 4**). Posteriormente, las imágenes digitalizadas fueron evaluadas con la herramienta ImageJ® para determinar los siguientes parámetros: saturación de grasa, porcentaje de saturación de grasa por campo y por célula y diámetro de los lóculos.

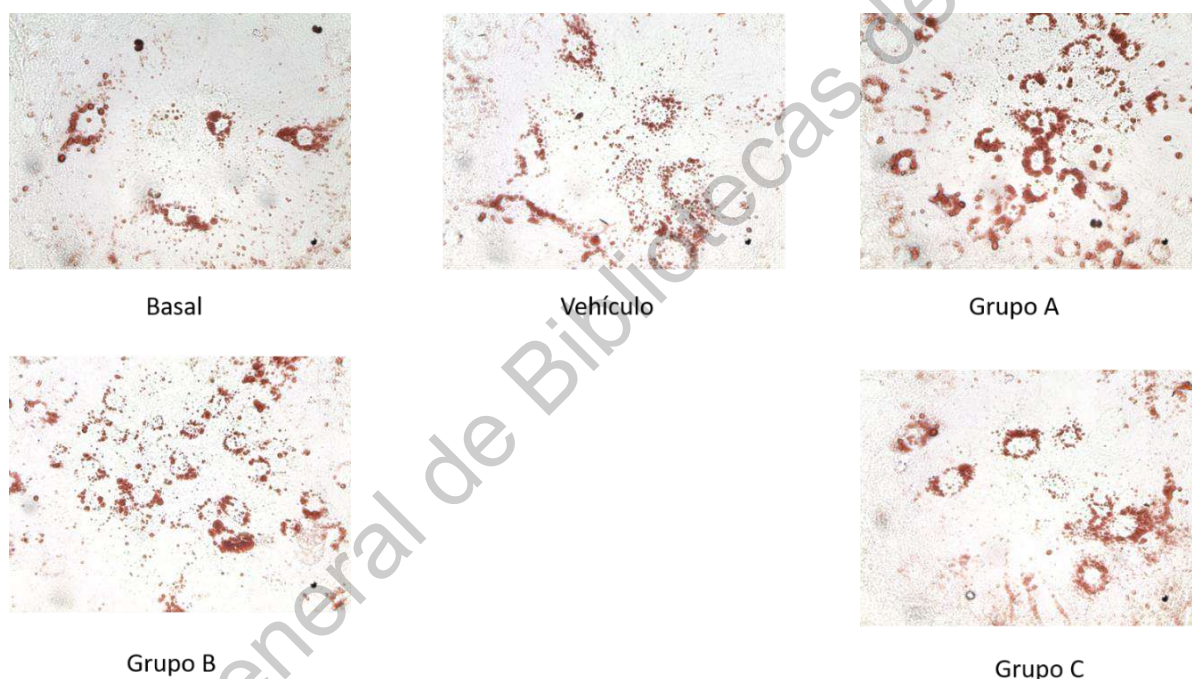


Figura 4. Microfotografías de los adipocitos maduros. Se observan los adipocitos con múltiples lóculos de grasa (teñidos de color rojo) a los doce días post-diferenciación (Objetivo 40X).

VI.1.2 Determinación de la saturación de grasa.

La saturación de las estructuras grasas se realizó cuantificando el área de saturación de color rojo que emite la tinción ORO, para así determinar la intensidad de la concentración de ORO dentro de los lóculos de grasa. Se analizaron diez campos diferentes por grupo experimental y se obtuvo un promedio de la señal obtenida en todos los campos (**Figura 5**).

La **Figura 6** muestra los datos obtenidos de saturación de grasa celular en las diferentes condiciones experimentales, en donde se observa una diferencia significativa entre los grupos de tratamiento A, B y C contra los controles basal y vehículo. Mientras que no se observa diferencia entre los grupos control basal y vehículo.

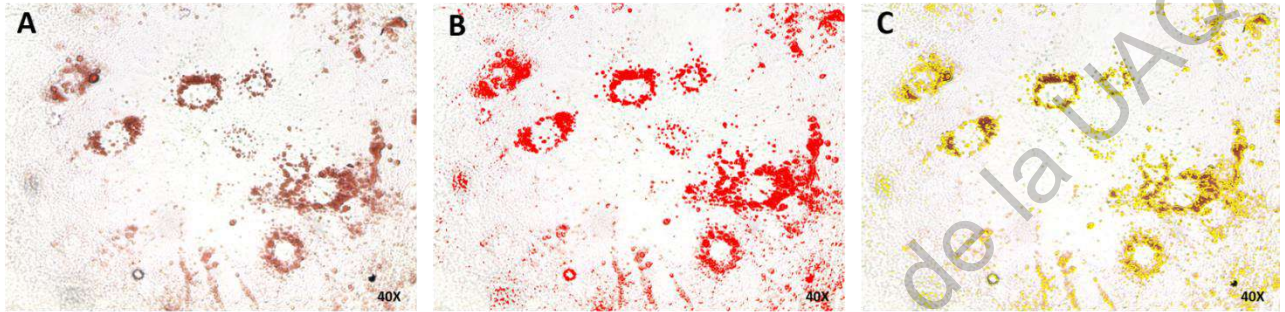


Figura 5. Determinación de la saturación de grasa celular. Los diferentes campos esquematizan el proceso de captación de grasa y análisis por medio de la herramienta ImageJ. (A) Campo de un grupo experimental teñido con ORO (B) Imagen procesada con ImageJ para la captación de la tinción ORO a través del color umbral (color threshold) en el adipocito. (C) Selección y medición del área a analizar. Las unidades de detección se reportan en pixeles/micras.

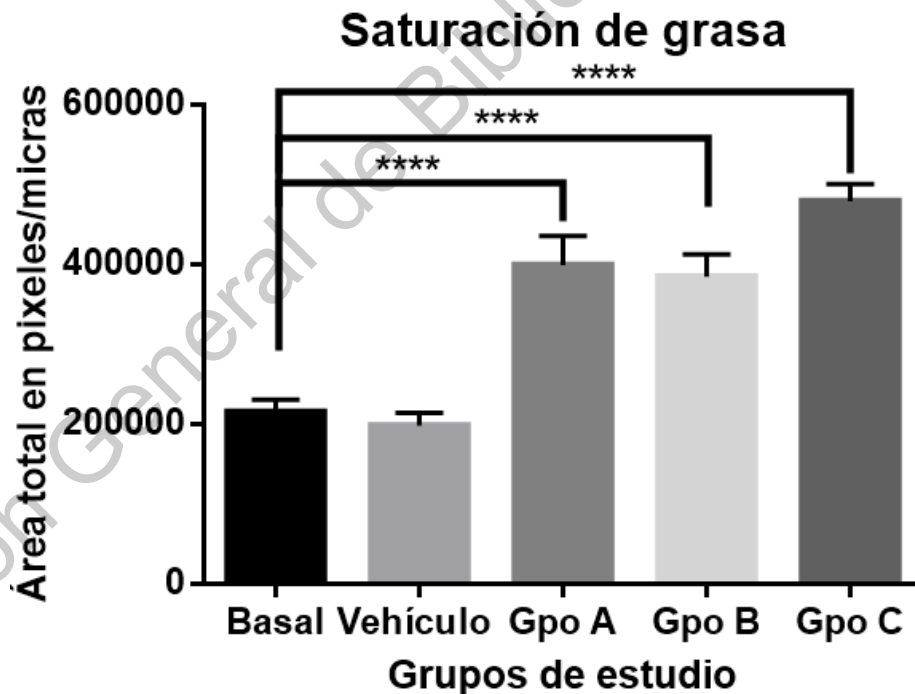


Figura 6. Saturación de grasa. Las imágenes de las células teñidas con ORO fueron analizadas con el software ImageJ para determinar la saturación de grasa celular por campo. En la imagen se observa una diferencia significativa entre el basal y los grupos tratamiento Grupo A, B y C. No se observa diferencia significativa entre los tratamientos A, B y C. Los datos representan la media \pm SEM (error estándar) de tres experimentos independientes. Se muestran diferencias significativas a una $p < 0.05$.

Posteriormente se realizó un análisis de la saturación de grasa por superficie celular para determinar si el tamaño de la célula se relacionaba con la saturación de grasa en las mismas, para ello, se cuantificó la grasa en cada célula contando cinco células por campo de diez microfotografías de cada grupo experimental. Los valores obtenidos se muestran en la **Figura 7**, en donde se observa una diferencia significativa entre los grupos control basal y vehículo vs los grupos tratados con DEs (A, B y C). Por lo que existe un contrastante aparente en la acumulación de grasa, siendo mayor en los grupos de tratamiento que en los grupos control. Mientras que no se observaron diferencias significativas entre los grupos A, B y C o entre los grupos basal y vehículo.

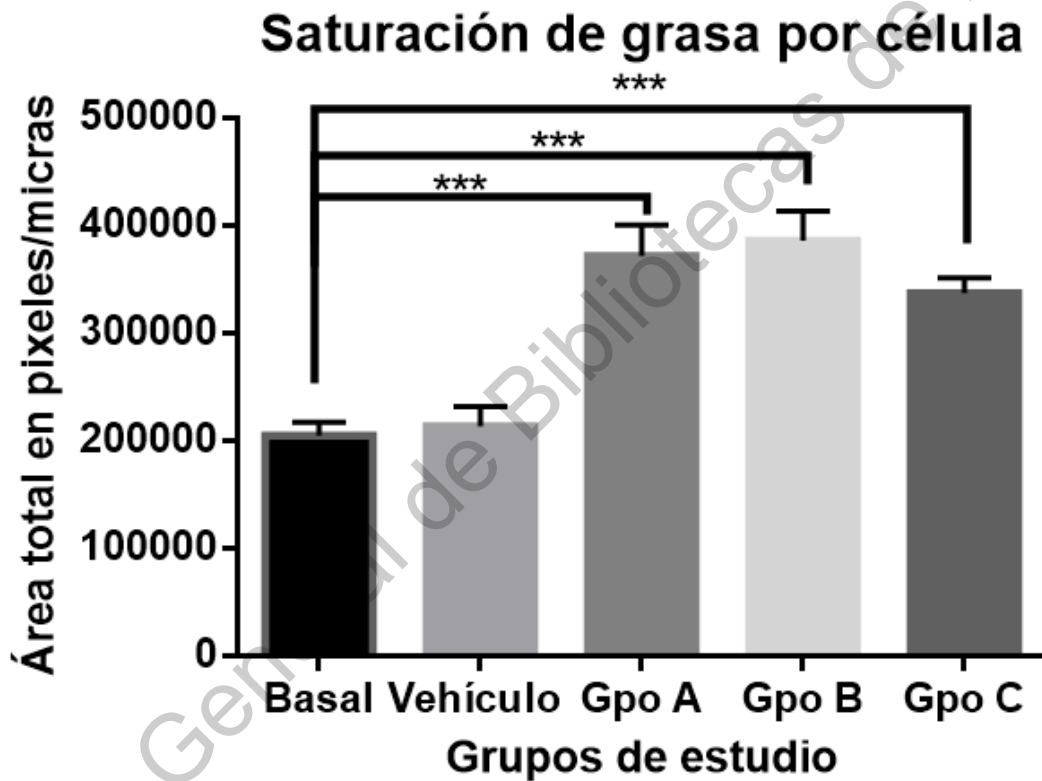


Figura 7. Saturación de grasa por superficie celular. El área de saturación de grasa por célula (cinco células por campo) fue cuantificada por grupo experimental. Los datos representan la media±SEM de tres experimentos independientes. Se muestran diferencias significativas entre los grupos tratamiento y el basal a una $p < 0.05$.

VI.1.3. Determinación del diámetro del lóculo de grasa.

Para evaluar el posible efecto hipertrófico de los disruptores en el adipocito se realizó el análisis del tamaño de los lóculos de grasa presentes en las células. Para ello, se analizaron diez campos y se tomaron medidas de diez células por campo empleando el algoritmo de inundación de cuencas hidrográficas (*Watershed*) del software ImageJ, para lograr observar los lóculos de grasa y realizar la medición de su diámetro relativo y la corrección del diámetro teórico (**Figura 8**).

Los lóculos de grasa de los adipocitos fueron medidos por su diámetro y calculada su área total obteniendo una media en la medida de cada grupo. Los diámetros de los lóculos de grasa obtenidos por grupo experimental se muestran en la **Figura 9**. Los datos muestran diferencias significativas entre el tamaño de los lóculos de grasa de los grupos control (basal y vehículo) comparada con A y B; siendo mayor el tamaño de los lóculos de grasa en las células tratadas con las concentraciones menores e intermedia de DEs.

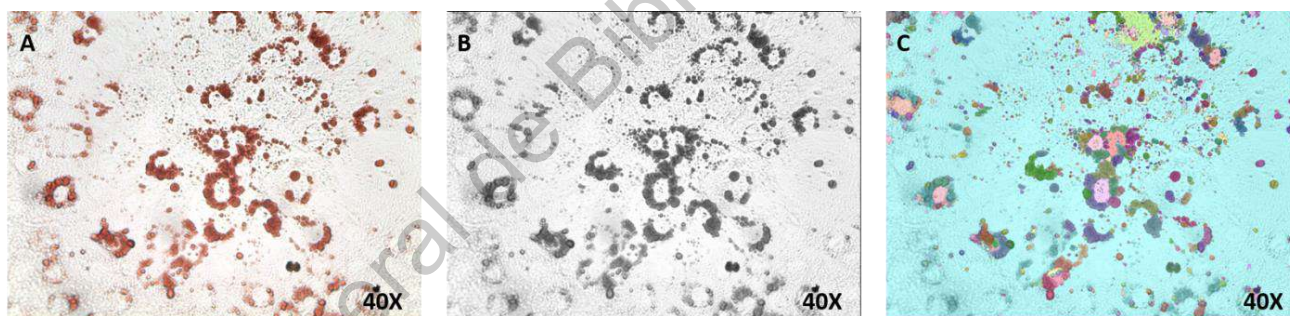


Figura 8. Análisis de imagen por cuenca hidrográfica (*watershed*). (A) Las células presentes en cada campo se observan de color rojo debido a la tinción ORO. (B) Las imágenes fueron transformadas mediante un proceso de binarización cambiando a imágenes de 8 bits en escala de grises (C) Posteriormente, las células fueron segmentadas morfológicamente cambiando a la imagen de cuenca hidrográfica, de esta forma fue posible visualizar los límites de las gotas de lípidos y medir la longitud de su diámetro.

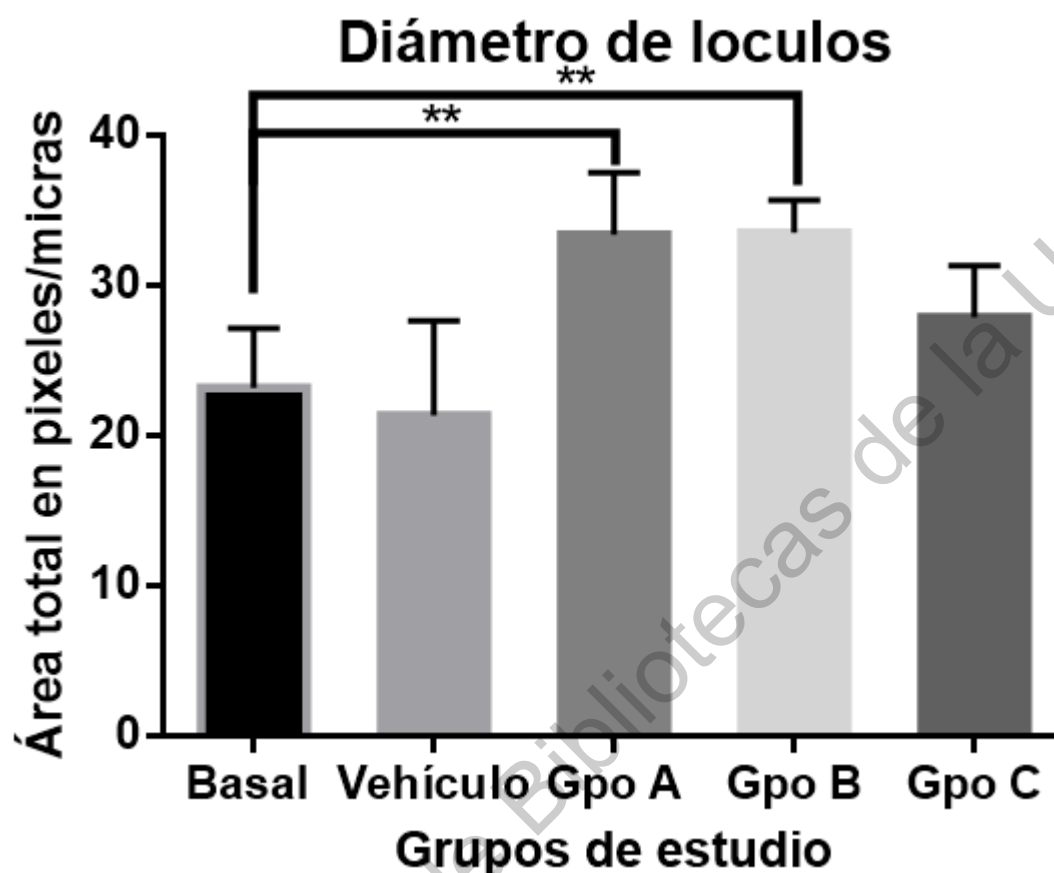


Figura 9. Diámetro total de los lóculos de grasa. El diámetro de los lóculos de grasa fue determinado (diez células por campo) por grupo experimental. Los datos representan la media±SEM de tres experimentos independientes. Se muestran diferencias significativas a una $p < 0.05$ en los grupos A y B comparadas con el control.

Posterior al análisis de las imágenes, se procedió a extraer la tinción ORO del interior de los adipocitos con isopropanol para cuantificar su concentración mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 510 nm (**Figura 10**). Los datos del análisis mostraron diferencias significativas entre los grupos tratamiento (A y B) y los grupos control (basal y vehículo), respectivamente. Asimismo, se obtuvo una mayor concentración de rojo oleoso en los grupos A y B con respecto al grupo C.

De forma general, los resultados de la concentración de ORO y el diámetro de los lóculos de grasa muestran un aumento en la concentración de grasa en los grupos A y B comparado con los controles y el grupo C.

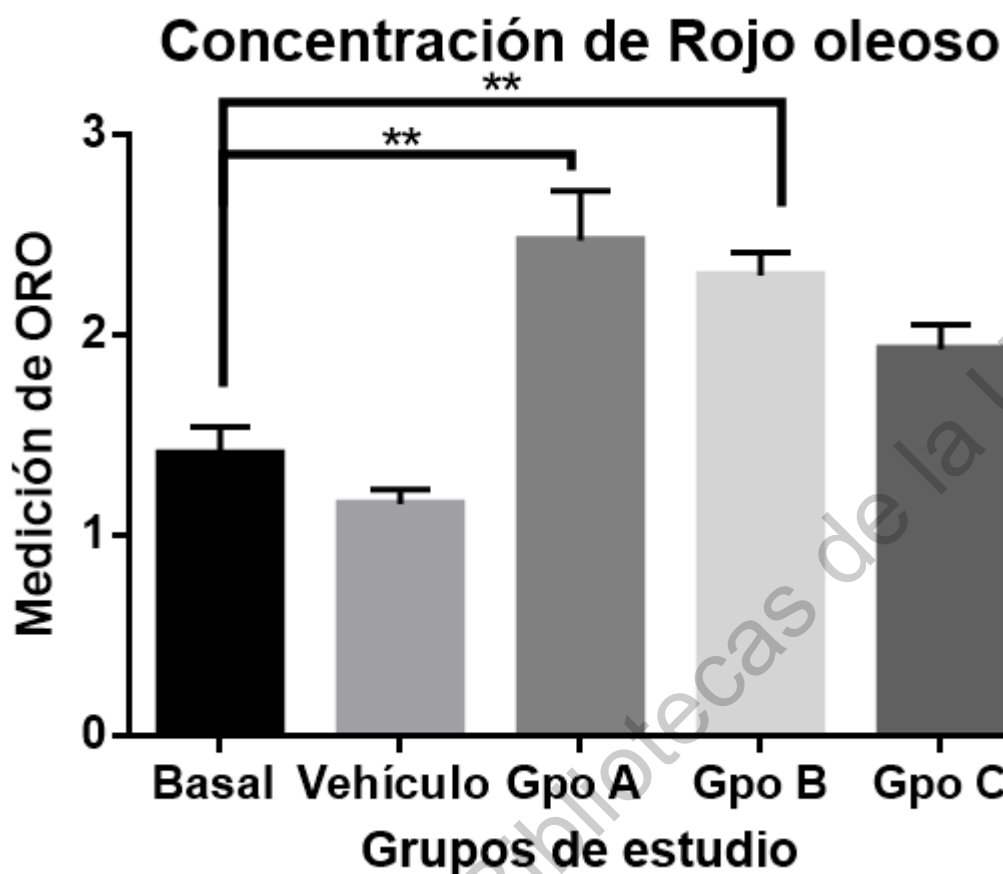


Figura 10. Concentración de rojo oleoso. La concentración de ORO en los adipocitos fue cuantificada mediante espectrofotometría a 510 nm. Los datos representan la media±SEM de tres experimentos independientes. Se muestran diferencias significativas a una $p < 0.05$ en los grupos A y B comparadas con el control.

VI.2. Determinación de la expresión génica de PPAR γ , C/EBP α y GLUT-4.

VI.2.1 Extracción de RNA total.

La extracción de RNA total de las células se realizó con el método de trizol-cloformo posterior al cumplimiento del tiempo de exposición de cada uno de los disruptores (12, 24, 48 y 72 h). Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa para observar la integridad del RNA y se cuantificó su concentración y se determinó su absorbancia a una longitud de onda 260 y 280 y 260 y 230 (**Figura 11**). Se observa una buena integridad del RNA al obtener las dos subunidades de RNA ribosomal; además, de una concentración de RNA total óptima, así como una relación de absorbancia promedio de 260/280 y 260/230 de 2 y 1.8, respectivamente; lo que indica la ausencia de contaminantes como fenoles, carbohidratos y compuestos aromáticos.

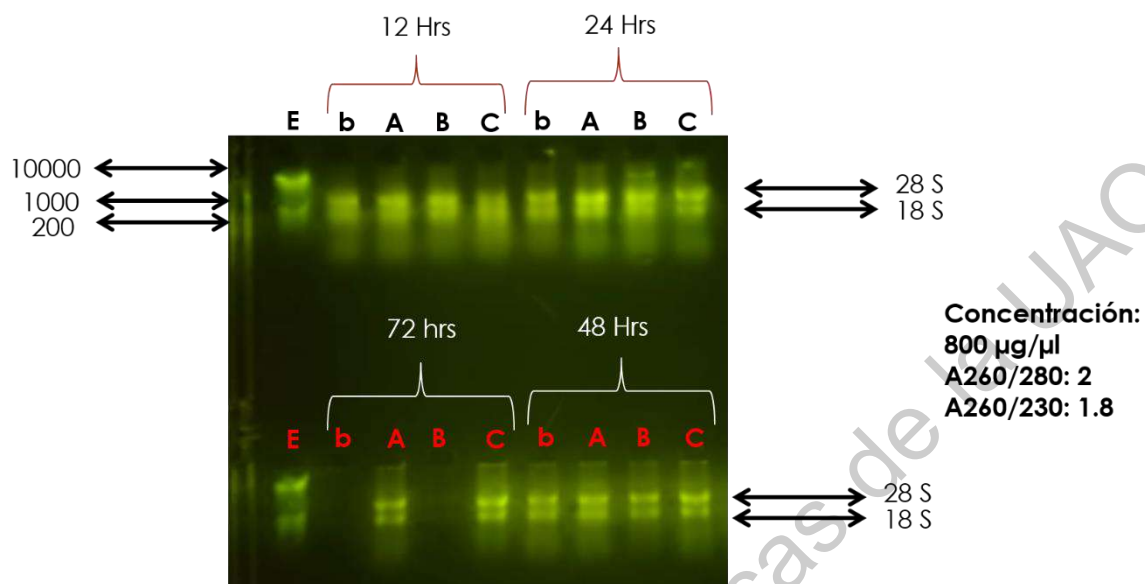


Figura 11. Electroforesis de RNA total de células 3T3-L1 con o sin tratamiento con DEs. La imagen muestra el RNA total de las células de los grupos experimentales y la concentración media obtenida.

VI.2.2. Análisis de la expresión génica mediante qPCR.

La expresión del gen C/EBP α fue determinada en las células con o sin tratamiento con DEs, a las 24, 48 y 72 h post-diferenciación. Se observó un aumento en la expresión génica en los grupos A y B comparado con aquella del grupo control a las 24, 48 y 72h, mientras que no se observaron cambios significativos con el grupo C (**Figura 12**).

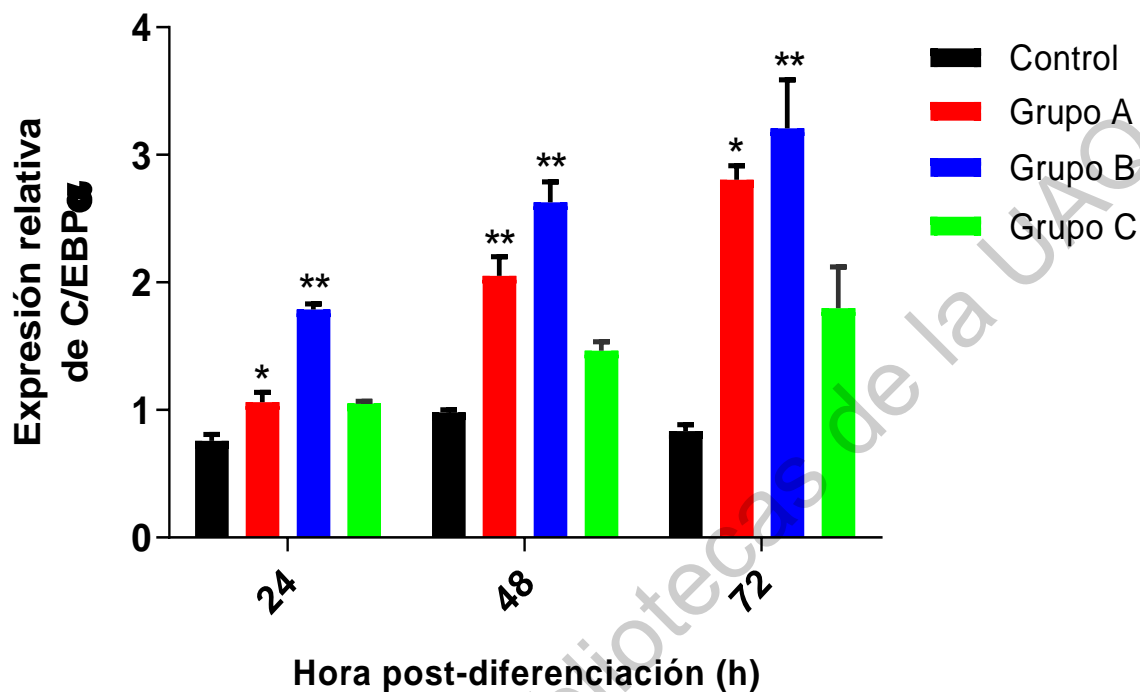


Figura 12. Expresión de C/EBP α por qPCR. Se observan los grupos de tratamiento A, B y C recolectados a las 12, 24, 48 y 72 h posterior al inicio de la diferenciación. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. Se muestran diferencias significativas a una $p < 0.05$.

Cabe señalar que a las 12 h no se detectó la expresión del gen de interés, como se ha visto en otros estudios en los que al inicio de la diferenciación no hay una expresión suficiente del C/EBP α como para hacer un cambio significativo con el control, su expresión se puede ver en mayor medida posterior a las 24 h posterior a la inducción de la diferenciación (Hu *et al.*, 2012; Atlas *et al.*, 2014; Ariemma *et al.*, 2016).

VII. Discusión

Para evaluar el efecto de la exposición a DEs durante la etapa de proliferación celular, las células 3T3-L1 fueron incubadas con diferentes combinaciones de disruptores BPA, MEHP y BuP, durante la proliferación celular y se evaluó su posible efecto en la expresión de genes maestros reguladores de la adipogénesis PPAR γ , C/EBP α y GLUT-4, y en la acumulación de grasa en adipocitos maduros.

La actividad de los DEs sobre los genes maestros (PPAR γ y C/EBP α) pueden favorecer la adipogénesis y por consiguiente el desarrollo de enfermedades crónicas como la obesidad y las asociadas a la misma tales como hipertensión arterial, diabetes mellitus, aterosclerosis, entre otras. El efecto de los disruptores endocrinos en las vías de señalización involucradas en la adipogénesis, su efecto dependiente de la concentración y las combinaciones presentes en el medio ambiente, así como su uso constante en la industria los hacen un tema de importancia prioritaria en la investigación con el objetivo de mejorar la calidad de la salud en México.

Nuestro estudio analizó el efecto adipogénico de tres compuestos químicos usados con gran frecuencia en nuestra vida diaria BPA, BuP y MEHP, los cuales han mostrado efectos obesogénicos de forma individual en investigaciones previas (Hao *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012; Taxvig *et al.*, 2012; Ariemma *et al.*, 2016). El análisis de imagen de las células teñidas con ORO nos permitió determinar la concentración de grasa y la hipertrofia de los lóculos de grasa empleando el software ImageJ y estimar la concentración de ácidos grasos mediante la cuantificación de rojo oleoso captado por las células.

Los resultados mostraron un aumento de la concentración de grasa y una hipertrofia de los lóculos de grasa en las células tratadas con DEs (grupos A y B), los cuales son comparables a los reportados anteriormente por Hao *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012; Taxvig *et al.*, 2012; Ariemma *et al.*, 2016, quienes observaron un aumento en la concentración de grasa en células 3T3-L1, al ser tratadas con diferentes concentraciones individuales de BPA (1 nM), BuP (100 μ M) y MEHP (100 μ M). De forma interesante, observamos que el tratamiento con concentraciones menores de BPA (0.1 nM y 1 nM), BuP (1 μ M y 10 μ M) y MEPH (3 μ M y 30 μ M) presentaron una mayor concentración de grasa comparada con el control, lo cual no se observó en estudios previos empleando la misma concentración de disruptor, pero con una exposición de forma individual (Hao *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012; Taxvig *et al.*, 2012; Ariemma *et al.*, 2016). En el estudio de Hu *et al.*, 2012, las concentraciones de butilparabeno que tuvieron un efecto adipogénico significativo fueron de 100 μ M, siendo las nuestras mucho menores (1 μ M y 10 μ M).

El aumento en la expresión de C/EBP α promueve la activación de genes y la síntesis de diversas estructuras involucradas en el ingreso de ácidos grasos y glucosa a la célula como lo son GLUT 4, FABP 4, lipoproteína lipasa, la perilipina, las adipoquinas leptina y adiponectina. El análisis de la expresión de C/EBP α nos permite corroborar el efecto de los DEs que se ha observado en estudios previos, en ellos se observa un incremento de los genes adipogénicos y sus consecuencias al favorecer el incremento de proteínas adipogénicas y factores inflamatorios en presencia de concentraciones similares a las encontradas en líquidos y tejidos biológicos (Hao *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012; Taxvig *et al.*, 2012; Atlas *et al.*, 2014; Ariemma *et al.*, 2016; Pomatto *et al.*, 2018). De forma interesante, en nuestro estudio encontramos cambios en la expresión de C/EBP α a partir de las 24h, mientras que en otros estudios no se ha observado tal efecto al emplear disruptores de forma individual; ejemplo de ello es el estudio de Atlas *et al.*, 2014 donde los valores de 0.1 nM y 1 nM no demostraron

una diferencia significativa del aumento de la adipogénesis y la expresión de C/EBP α comparada con el efecto de la dexametasona a las 24 y 48 h de exposición; mientras que en nuestro estudio, las combinaciones de BPA, BuP y MEHP en concentraciones de 0.1 y 1 nM indujeron una mayor expresión de C/EBP α . Lo que sugiere un efecto obesogénico sinérgico de los DEs, durante el proceso de adipogénesis, cuando estos se encuentran en combinaciones.

Otro factor importante es el tiempo de exposición de las células con los DEs junto con el estado de madurez en el ciclo de vida de la célula. En el estudio de Ariemma *et al.*, 2016 se cultivaron fibroblastos 3T3-L1 exponiéndolos a 1 nM de BPA durante 2 semanas previo al periodo de diferenciación, posteriormente se recolectaron las células en forma de pre-adipocitos buscando la expresión de C/EBP α y no observaron un efecto significativo de su expresión en las primeras 24 h sino posteriormente, mientras que en nuestro estudio observamos un efecto en las primeras 24 h en los grupos A (0.1 nM BPA, 1 μ M BuP y 3 μ M MEHP) y B (1 nM BPA, 10 μ M BuP y 30 μ M MEHP).

Por otro lado, al término del estudio (Ariemma *et al.*, 2016) las células destinadas a la maduración fueron evaluadas con tinción ORO y cuantificadas por espectrofotometría; y observaron una acumulación de grasa mayor que el control no tratado con BPA; en nuestro estudio realizamos la estimulación con DEs durante etapas de proliferación y también encontramos que se favorece la acumulación de grasa en el adipocito y la hipertrofia del mismo, dependiendo de la concentración de los compuestos disruptores. Lo que demuestra que el efecto de los disruptores en células fibroblásticas puede perdurar durante su proceso de diferenciación y posteriormente en su maduración.

De igual forma, es importante resaltar que dosis menores a las encontradas en el medio ambiente, representadas por las concentraciones del grupo A y B tienen un efecto disruptor en las células (Figuras 7, 9, 10 y 12) que se traduce en una hipertrofia del adipocito y un aumento en la expresión del C/EBP α .

Una de las aportaciones de nuestro estudio es que los datos de la acumulación de grasa se midieron con la tinción ORO por espectrofotómetro y la saturación de grasa en la célula junto con el diámetro de los lóculos de grasa con ImageJ, la cual, resulta ser una herramienta virtual muy útil para el análisis de diversos componentes y tejidos en el campo del estudio biomédico facilitando la investigación científica y permitiendo el uso de métodos rápidos, baratos y accesibles para el área de la investigación (Deutsch *et al.*, 2014; Schindelin *et al.*, 2015).

Entre las limitaciones de nuestro estudio se encuentra el analizar el efecto de cada disruptor de forma individual, para comprender si el efecto se debe únicamente a la presencia de un solo compuesto o a un efecto sinérgico inducido por la combinación de los disruptores, como se ha observado en Pollock *et al.*, donde el butilparabeno y el propil parabeno tienen un efecto modulador del BPA en su influencia sobre la expresión de hormonas esteroideas (Pollock *et al.* 2017).

La investigación que hemos desarrollado muestra el efecto obesogénico de la combinación de un grupo de compuestos de frecuente uso, BPA, BuP y MEHP, cuyo estudio debe continuar en modelos *in vitro* para determinar los mecanismos de acción involucrados en sus efectos obesogénicos; así como en modelos *in vivo* para evaluar su participación en la generación de patologías como la obesidad, lo que permitiría a mediano plazo prevenir la incidencia de enfermedades en el humano.

Nuestro estudio no solo permite observar el efecto anteriormente descrito en favor de la acumulación de grasa sino además podemos ver que el efecto adipogénico persiste en la presencia de diversos disruptores. En conjunto, nuestros resultados muestran que el estudio de los DEs debe ser un tema de gran importancia en materia de salud pública en todos los países, las diferentes variables que pueden afectar sus efectos y los diferentes modelos de estudio generan nuevos objetivos de investigación.

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

VIII. Conclusión

La exposición a combinaciones específicas de bisfenol-A, mono(2-etilhexil) ftalato y butilparabeno induce cambios en la expresión de C/EBP α y acumulación de grasa celular durante el proceso de adipogénesis *in vitro*.

Dirección General de Bibliotecas de la UAG

IX. Bibliografía

Adoamnei., E., Mendiola., J., Vela-Soria., F., Fernández., M., Olea., N., Jorgensen., N; Swan., S & Torres-Cantero., A; (2018). Urinary bisphenol A concentrations are associated with reproductive parameters in young men. *Environmental Research*, 161. Pp. 22-128.

Angle, B. M., Do, R. P., Ponzi, D., Stahlhut, R. W., Drury, B. E., Nagel, S. C., Welshons, W. V., Besch-Williford, C. L., Palanza, P., Parmigiani, S., vom Saal, F. S & Taylor, J. A. (2013). Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reproductive toxicology* 42. pp. 256-68.

Argemi, F., Cianni, N., & Porta, A. (2005). Disrupción endocrina: perspectivas ambientales y salud pública. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 39. pp. 291-300.

Ariemma, F., D'Esposito, V., Liguoro, D., Oriente, F., Cabaro, S., Liotti, A., Cimmino, I., Longo, M., Beguinot, F., Formisano, P. & Valentino, R. (2016). Low-Dose Bisphenol-A Impairs Adipogenesis and Generates Dysfunctional 3T3-L1 Adipocytes. *PLoS ONE*, 11. pp. 1-16.

Armoni, M., Harel, C., & Karnieli, E. (2007). Transcriptional regulation of the GLUT4 gene: from PPAR-gamma and FOXO1 to FFA and inflammation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 18. pp. 100–107.

Asociación Nacional de Cardiólogos de México. (2002). Consenso Mexicano sobre el Tratamiento Integral del Síndrome Metabólico. *Revista Mexicana de cardiología*, 13. pp 4-30.

Atlas, E., Pope, L., Wade, M. G., Kawata, A., Boudreau, A., & Boucher, J. G. (2014). Bisphenol A increases aP2 expression in 3T3L1 by enhancing the transcriptional activity of nuclear receptors at the promoter. *Adipocyte*, 3. Pp. 170–179.

Barquera, A., Campos, S., Hernández, I. & Hernández, L. (2009). Obesity and central adiposity in Mexican adults: results from de Mexican National Health and Nutritional Survey, *Salud Publica Mex*, 51. pp. 595-603.

Bastos, A., González, R., Molinero, O. & Salguero, A. (2005). Obesidad, nutrición y actividad física. *Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y del Deporte*, 5. pp. 140- 152.

Casals, C. & Desvergne, B. (2011). Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annual review of physiologic*, 73. pp. 135-162.

Chandra., V., Huang., P., Hamuro., Y; Raghuram., S; Wang, Y; Burris., T. P; & Rastinejad, F. (2008). Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature*, 456. Pp. 350–356.

Charron MJ., Katz EB & Olson AL. 1999. GLUT4 gene regulation and manipulation. *J Biol Chem*. 274. pp. 3253-3256.

Centro Nacional de Excelencia Tecnología en Salud. (2011). Guía de práctica clínica Prevención, diagnóstico y tratamiento del sobrepeso y la obesidad exógena, 1. pp. 2-15.

Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 73. pp. 9–15.

Colborn T., Vom Saal FS. & Soto AM. (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental health perspectives*, 101. pp. 378–384.

Darbre P. D. (2017). Endocrine Disruptors and Obesity. *Current obesity reports*, 6. pp. 18–27.

Delfosse, V., Grimaldi, M., Pons JL., Boulahtouf, A., le Maire A & Cavailles, V. (2012). Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United states of America*, 109. pp. 14930-14935.

Deutsch, MJ., Schriever, SC., Roscher, AA & Ensenaer, R. (2014). Digital image analysis approach for lipid droplet size quantitation of Oil Red O-stained cultured cells. *Anal Biochem*. 445. pp. 87-89.

Doerge D, Twaddle N, Woodling K. & Fisher J. (2010). Farmacocinética del bisfenol-A en monos rhesus neonatos y adultos. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 248. pp. 1-11.

European Chemicals Agency. (2018). Market Survey: Use of bisphenol A and its alternatives in thermal paper in the EU from 2014 to 2017, ECHA. 1. pp 4-12.

Embid, A. (2009). Historia de los disruptores endocrinos. *Revista de medicina complementaria*. *Medicina complementaria*, 75. pp. 297-357.

Fajas, LAuboeuf D, Raspé E, Schoonjans K., Lefebvre AM., Saladin R., Najib J., Laville M., Fruchart JC., Deeb S., Vidal-Puig A., Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H & Auwerx J (1997). La organización, el análisis del promotor y la expresión del gen PPARgamma humano. *Journal of Biological Chemistry*. 272. pp. 18779-18789.

Fernyhough, M., Okine, E., Hausman, G., Vierck, J., & Dodson, M. (2007). PPARgamma and GLUT-4 expression as developmental regulators/markers for preadipocyte differentiation into an adipocyte. *Domestic animal endocrinology*, 33. pp. 367–378.

Fransway., AF; Fransway., PJ; Belsito., DV; Warshaw., EM; Sasseville., D; Fowler., JF Jr; DeKoven., JG; Pratt., MD; Maibach., HI; Taylor., JS; Marks., JG; Mathias., CGT; DeLeo VA; Zirwas JM; Zug KA; Atwater., AR; Silverberg., J & Reeder MJ. (2019). Parabens. *Dermatitis*, 30. Pp. 3-31.

García, J., Gallego, C. & Font, G. (2015). Toxicidad del bisfenol-A: Revisión. *Revista de Toxicología* 32. pp.144 -160.

García, R., Larrañaga, A., Docet, M. & Lafuente, A. (2012). Disruptores endocrinos y obesidad: obesógenos. *Endocrinología y Nutrición*, 59. pp. 261-267.

González-Castro., M; Olea-Serrano., M; Rivas-Velasco A; Medina-Rivero E; Ordoñez-Acevedo., L; De León-Rodríguez A. (2011). Phthalates and bisphenols migration in Mexican food cans and plastic food containers. *Bull Environ Contam Toxicol*, 86. Pp. 627-631.

Gore, A., Chappell, V., Fenton, S., Flaws, J., Nadal, A., Prins, G., Toppari, J. & Zoeller, R. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemical. *Second Scientific Statement on EDC*, 1. pp.1-150.

Hao, C., Cheng, X., Xia, H., & Ma, X. (2012). The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. *Bioscience reports*, 32. pp. 619-29.

Heindel, J. J., & Blumberg, B. (2019). Environmental Obesogens: Mechanisms and Controversies. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 59. pp 89–106.

Hossain P, Kavar B. & Nahas, M. (2007). Obesity and diabetes in the developing world—a growing challenge. *New England Journal of Medicine*, 356. pp. 213–215.

Hu, P., Chen, X., Whitener, R, Boder, E, Jones, J, Porollo, A., Chen, J. & Zhao, L. (2013). Effects of parabens on adipocyte differentiation. *Toxicological science*, 131. pp. 56-70.

Hu, P., Overby, H., Heal, E., Wang, S., Chen, J., Shen, C. L., & Zhao, L. (2017). Methylparaben and butylparaben alter multipotent mesenchymal stem cell fates towards adipocyte lineage. *Toxicology and applied pharmacology*, 329. pp. 48-57.

Instituto Mexicano para la Competitividad A.C. (2013). *Kilos de más, pesos de menos*. 1. pp. 5-45.

Janani, C. & Ranjitha, BD. (2015). PPAR gamma-gene - a review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 9. pp.46-50.

Jiménez., I; Artacho., F; Vela., F; Belhassen., H; Arrebola., J; Fernández., M; Ghali., R; Hedhili., A & Olea N. (2016). Urinary levels of bisphenol A, benzophenones and parabens in Tunisian women: A pilot study. *Science of the Total Environment*, 562. Pp. 81-88.

Kodani, S. D., Overby, H. B., Morisseau, C., Chen, J., Zhao, L., & Hammock, B. D. (2016). Parabens inhibit fatty acid amide hydrolase: A potential role in paraben-enhanced 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Toxicology letters*, 262. pp. 92-99.

Krais, A. M; Andersen, C; Eriksson, A. C; Johnsson, E; Nielsen, J; Pagels, J; Gudmundsson, A; Lindh, C. H; & Wierzbicka, A. (2018). Excretion of Urinary Metabolites of the Phthalate Esters DEP and DEHP in 16 Volunteers after Inhalation and Dermal Exposure. *International journal of environmental research and public health*, 15. pp. 2-14.

Lefterova., MI; Haakonsson., AK; Lazar., MA & Mandrup., S. (2014). PPAR γ y el mapa global de adipogénesis y más allá. *Tendencias en endocrinología y metabolismo: TEM*, 25 pp. 293-302.

Li, L., Wang, Q., Zhang, Y., Niu, Y., Yao, X., & Liu, H. (2015). The molecular mechanism of bisphenol A (BPA) as an endocrine disruptor by interacting with nuclear receptors: insights from molecular dynamics (MD) simulations. *PloS one*, 10. pp 1-18.

Loria, E. & Salas E., (2014). Sobrepeso e integración económica en México. *Economía informa*, 389. Pp.3-18.

Lowe, C., O'Rahilly, S & Rochford, J. (2011). Adipogenesis at a glance. *Journal of cell science*. 124. pp. 2681-2686.

Madsen., MS; Siersbæk., R; Boergesen., M; Nielsen., R. & Mandrup, S. (2014). El receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas y C / EBP α activan sinérgicamente genes clave de los adipocitos metabólicos mediante carga asistida. *Biología molecular y celular*, 34 (6), 939-954.

Martínez-Ibarra, A., Martínez-Razo, L. D., Vázquez-Martínez, E. R., Martínez-Cruz, N., Flores-Ramírez, R., García-Gómez, E., López-López, M., Ortega-González, C., Camacho-Arroyo, I., & Cerbón, M. (2019). Unhealthy Levels of Phthalates and Bisphenol A in Mexican Pregnant Women with Gestational Diabetes and Its Association to Altered Expression of miRNAs Involved with Metabolic Disease. *International Journal of molecular sciences*, 20. Pp. 2-17.

Mirza AZ, Althagafi II, Shamshad H. (2019). Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *Eur J Med Chem*. 166. Pp. 502-513.

Moreno, E. & Núñez, A. (2012) Disruptores endocrinos, un posible riesgo tóxico en productos de consumo habitual. *Unirevista.es*, 1. pp. 2-10.

Moos, R., Angerer, J., Dierkes, G., Brüning, T. & Koch, H. (2016) Metabolism and elimination of methyl, iso- and n-butyl paraben in human urine after single oral dosage. *Archives of Toxicology*, 90. pp. 2699-2709.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016) Informe de la Comisión para acabar con la obesidad infantil. 1. pp 2-50.

Pollock, T; Weaver, RE; Ghasemi, R & deCatanzaro, D. (2017). Butyl paraben and propyl paraben modulate bisphenol A and estradiol concentrations in female and male mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 325:18-24.

Pomatto., V; Cottone., E; Cocci P; Mozzicafreddo M; Mosconi., G; Nelson., ER; Palermo., FA & Bovolín., P. (2018). Plasticizers used in food-contact materials affect adipogenesis in 3T3-L1 cells. *The journal of steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 178. Pp. 322-332.

Ramírez-Zacarías JL; Castro-Muñozledo F; & Kuri-Harcuch W. (1992). Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry*. 97, pp. 493-497.

Sarjeant, K., & Stephens, J. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4. pp. 1-13.

Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C., & Eliceiri, K. W. (2015). El ecosistema ImageJ: una plataforma abierta para el análisis de imágenes biomédicas. *Reproducción molecular y desarrollo*, 82. pp. 518–529.

Shamah, T., Ruiz, C., Rivera, J., Kuri, L., Jiménez, ME & Romero, M. (2017). Instituto Nacional de Salud Pública. Percepción sobre obesidad, comportamiento alimentario y actividad física. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016*. 1. Pp. 13-128.

Shamah-Levy T, Campos-Nonato I, Cuevas-Nasu L, Hernández-Barrera L, Morales-Ruán MC, Rivera-Dommarco J, Barquera S. (2019). Sobrepeso y obesidad en población mexicana en condición de vulnerabilidad. Resultados de la Ensanut 100k. *Revista de Salud Pública de México*. 61. Pp. 852-865.

Taxvig C, Dreisig K, Boberg J, et al. (2012) Differential effects of environmental chemicals and food contaminants on adipogenesis, biomarker release and PPAR γ activation. *Mol Cell Endocrinol*. 361. pp. 106-115.

Tong W, Cao X, Harris S, Sun H. (2003). ArrayTrack - Apoyo a la investigación toxicogenómica en el Centro Nacional de Investigaciones Toxicológicas de la Administración de Medicamentos de Alimentos de EE. UU. *Perspectiva de salud ambiental*, 111. pp. 1819-1826.

Vandenberg, L., Colborn. T., Hayes. T., Heindel, J., Jacobs, D., Lee, D., Shioda, T., Soto, A., Vom Saal, F., Welshons, W., Zoeller, R. & Myers J, (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*, 33. pp. 378-455.

Valentino, R., D'Esposito, V., Passaretti, F., Liotti, A., Cabaro, S., Longo, M., Perruolo, G., Oriente, F., Beguinot, F., Formisano, P. (2013). Bisphenol-A impairs insulin action and up-regulates inflammatory pathways in human subcutaneous adipocytes and 3T3-L1 cells. *PloS one*, 8. pp. 1-8.

Uribe, R., Jiménez, A., Morales, M., Salazar, A., & Shamah, T. (2018). Percepción del peso corporal y de la probabilidad de desarrollar obesidad en adultos mexicanos. *Salud Pública de México*, 60. Pp.254-262.

Wedel, A & Ziegler, H.W. (1995). The C/EBP Family of Transcription Factors. *Inmunobiology*. 193. pp. 171-185.

Wright, Harold M; Clary B. Clish; Toshiyuki Mikami; Stefanie Hauser; Kazunori Yanagi; Ryuji Hiramatsu; Charles N. Serhan & Bruce M. Spiegelman. 2000. "A Synthetic Antagonist for the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Inhibits Adipocyte Differentiation." *Journal of Biological Chemistry* 275, pp. 1873-77.

Xu J, Kelly R, Fang H, Tong W. (2010). ArrayTrack: a free FDA bioinformatics tool to support emerging biomedical research- an update. *Human Genomic*, 4. Pp. 428-434.

Ye X., Bishop A. M., Reidy J. A., Needham L. L., Calafat A. M. (2006). Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. *Environ. Health Perspect.* 114. 1843-1846.