

2023

“ Efecto en la captura de glucosa, acumulación de triglicéridos y cambios en la metilación del gen PPAR $\gamma$  por la exposición a mono-2-etilhexil-ftalato (MEPH) en adipocitos maduros”

IBT Luis Enrique  
Gasca Pestañas



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

“EFECTO EN LA CAPTURA DE GLUCOSA,  
ACUMULACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS Y  
CAMBIOS EN LA METILACIÓN DEL GEN  
PPAR $\gamma$  POR LA EXPOSICIÓN A MONO-2-  
ETILHEXIL-FTALATO (MEPH) EN  
ADIPOCITOS MADUROS”

**Tesis**

Como parte de los requisitos para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA.

Presenta:

IBT Luis Enrique Gasca Pestañas

Dirigido por:

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga

Querétaro, Qro. A enero del 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de  
Información



“EFECTO EN LA CAPTURA DE GLUCOSA, ACUMULACIÓN  
DE TRIGLICÉRIDOS Y CAMBIOS EN LA METILACIÓN DEL  
GEN PPAR $\gamma$  POR LA EXPOSICIÓN A MONO-2-ETILHEXIL-  
FTALATO (MEPH) EN ADIPOCITOS MADUROS”

**por**

Luis Enrique Gasca Pestañas

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

**Clave RI:** MEMAC-211759-0123-123



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

“Efecto en la captura de glucosa, acumulación de triglicéridos y cambios en la metilación del gen PPAR $\gamma$  por la exposición a mono-2-etilhexil-ftalato (MEPH) en adipocitos maduros”

Opción de titulación  
**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestría en Ciencias en Biomedicina

**Presenta:**

IBT Luis Enrique Gasca Pestañas

Dirigido por:

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga

Ana Gabriela Hernández Puga

\_\_\_\_\_  
Firma

Pablo García Solís

\_\_\_\_\_  
Firma

Rosa Martha Pérez Serrano

\_\_\_\_\_  
Firma

Haydé Azeneth Vergara Castañeda

\_\_\_\_\_  
Firma

Angelina Rodríguez Torres

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Guadalupe Zaldivar Lelo de Larrea  
Director de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Ma. Gpe. Flavia Loarca Piña  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
A 15 de diciembre del 2022

## RESUMEN

La obesidad y sobrepeso es un problema de salud pública a nivel nacional y entre los principales factores asociados al desarrollo de la obesidad se encuentra los hábitos alimenticios y el sedentarismo; sin embargo, en los últimos años se ha reconocido la participación de factores ambientales, entre los que se encuentran los disruptores endocrinos. Se ha demostrado que el mono-2-etilhexil ftalato (MEHP), un metabolito del plastificante de uso común di-2-etilhexil ftalato (DEHP), está presente en muestras biológicas y actúa como un ligando específico del PPAR $\gamma$ , lo que podría causar diversos efectos en la regulación metabólica del tejido adiposo. Sin embargo, existe poca información sobre sus efectos a nivel epigenético y su relación con los cambios metabólicos inducido durante la adipogénesis. Por lo que el presente estudio determinó el efecto de la exposición a MEHP a nivel epigenético y en procesos metabólicos asociados al proceso de formación de adipocitos, empleando el modelo celular 3T3-L1. Las células fueron diferenciadas hacia adipocitos maduros y simultáneamente recibieron un tratamiento con MEHP (3, 30 y 100  $\mu$ M) durante 14 días post-diferenciación. Se evaluó la expresión de PPAR $\gamma$  mediante PCR punto final, así como la captación de glucosa y el contenido de lípidos en adipocitos maduros. Observamos que el MEHP estimula la expresión del PPAR $\gamma$  en células 3T3-L1 en diferentes tiempos del proceso de diferenciación, generando un aumento en la acumulación de triglicéridos y en el diámetro de lóculos de las células 3T3-L1, en conjunto con una reducción en actividad de captación de glucosa en el medio de cultivo celular durante el proceso de adipogénesis. Por lo que el MEHP tiene efectos significativos sobre las funciones metabólicas del tejido adiposo y podría estar relacionado con el desarrollo de obesidad de una manera dependiente del periodo de exposición.

## SUMMARY

Obesity and overweight is a national public health problem and among the main factors associated with the development of obesity are dietary habits and sedentary lifestyles; however, in recent years the participation of environmental factors, including endocrine disruptors, has been recognized. It has been shown that mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), a metabolite of the commonly used plasticizer di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP), is present in biological samples and acts as a specific ligand of PPAR $\gamma$ , which could cause various effects on the metabolic regulation of adipose tissue. However, there is little information on its effects at the epigenetic level and its relationship with the metabolic changes induced during adipogenesis. Therefore, the present study determined the effect of MEHP exposure at the epigenetic level and on metabolic processes associated with the adipocyte formation process, using the 3T3-L1 cell model. Cells were differentiated into mature adipocytes and simultaneously received MEHP treatment (3, 30 and 100  $\mu$ M) for 14 days post-differentiation. PPAR $\gamma$  expression was assessed by endpoint PCR, as well as glucose uptake and lipid content in mature adipocytes. We observed that MEHP stimulates PPAR $\gamma$  expression in 3T3-L1 cells at different times of the differentiation process, generating an increase in triglyceride accumulation and in the locule diameter of 3T3-L1 cells, in conjunction with a reduction in glucose uptake activity in the cell culture medium during the adipogenesis process. Thus, MEHP has significant effects on the metabolic functions of adipose tissue and could be related to the development of obesity in a period-dependent manner.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi directora de tesis Dra. Ana Gabriela Hernández Puga por la dedicación y apoyo que me ha brindado para realizar y concluir este trabajo, por confiar en mí para formar parte de su equipo y sobre todo por nunca dejar dejarme caer durante todo este proceso y durante los altibajos que pasé. Gracias por la confianza que me dio desde que llegué a la maestría, le tengo mucho cariño.

A mis profesores que me instruyeron, al Dr. Pablo García Solís por su paciencia y enseñanza, a la Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda por sus pláticas y motivaciones, a la Dra. Angelina Rodríguez Torres quien desde siempre me hizo admirar la biología molecular aun cuando se me complicara un poco, a la Dra. Rosa Martha Pérez Serrano por sus consejos y por siempre estar sonriendo y muy alegre durante los tutoriales, a la Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano por su paciencia y apoyo durante los experimentos, a todos muchas gracias. A mis amigos y compañeros de la maestría quienes me ayudaron y me dieron su consejo y sobre todo lo más importante su amistad.

Gracias a mi familia por ayudarme a seguir mi sueño y mis metas, a mi padre Jorge por brindarme siempre la confianza y el apoyo para hacerme creer que puedo hacer aquello que me propongo, a mi madre Patricia por su amor incondicional y apoyo desde pequeño, a mi hermano por inspirarme a ser un ejemplo para él, mis primos Luis Guillermo de Dios e Isaac Gasca por estar siempre para mí, a mi abuelo y abuela en paz descansen que siempre estarán presentes en todo mi camino, a mi novia quien me apoya en los días buenos y no tan buenos, quien me ha visto estresado, cansado, enojado, feliz e incluso llorar y siempre tiene una sonrisa para intentar alegrarme.

Agradezco el apoyo por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) No. 772561 que permitió la realización de mis estudios de Maestría en este programa. Agradezco la asistencia técnica brindada por la M. en C. Adriana González Gallardo y por el uso de las instalaciones de la Unidad de Proteogenómica, UNAM-Campus Juriquilla, así como al proyecto apoyo a la incorporación de nuevos PTC (SEP-PRODEP), Folio: UAQ-PTC-408 del cual deriva la presente tesis.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>12</b>
2.1 OBESIDAD .....	12
2.1.1 <i>Obesidad en México</i> .....	13
2.2 DISRUPTORES ENDOCRINOS .....	15
2.2.1 <i>Mecanismo de acción y toxicidad de los DE</i> .....	17
2.3 TEJIDO ADIPOSO .....	18
2.3.1 <i>Regulación genética de la adipogénesis</i> .....	20
2.4 RECEPTOR ACTIVADO POR EL PROLIFERADOR DE PEROXISOMA (PPAR) .....	21
2.4.1 <i>Mecanismo de acción del PPAR</i> .....	23
2.4.2 <i>Obesógenos</i> .....	25
2.4.3 <i>Efectos obesogénicos de los ftalatos</i> .....	27
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>30</b>
<b>4. HIPOTESIS</b> .....	<b>31</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL: .....	31
5.2 OBJETIVO PARTICULAR: .....	31
<b>6. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>32</b>
6.1 METODOLOGÍA .....	32
6.1.1 <i>Cultivo y diferenciación celular</i> .....	32
6.2 EXTRACCIÓN DE RNA .....	33
6.3 PCR PUNTO FINAL .....	33
6.4 TINCIÓN CON ROJO OLEOSO .....	34
6.5 CUANTIFICACIÓN TOTAL DE TRIGLICÉRIDOS .....	35
6.6 CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA .....	35
6.7 EXTRACCIÓN DE DNA .....	35
6.8 ENSAYO DE METILACIÓN (MODIFICACIÓN CON BISULFITO) .....	35
6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	36

<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
7.1 CULTIVO CELULAR Y EXTRACCIÓN DE RNA .....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
7.2 PCR PUNTO FINAL Y ELECTROFORESIS .....	37
7.3 EFECTO EN LA CAPTURA DE GLUCOSA ENTRE TRATAMIENTOS Y CONTROLES .....	38
7.4 ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS EN ADIPOCITOS MADUROS .....	39
7.4.1 Saturación de grasa .....	40
7.4.2 Saturación de grasa por célula .....	41
7.4.3 Diámetro de la gota lipídica .....	42
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
<b>9. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>10. REFERENCIAS .....</b>	<b>48</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>58</b>
11.1 COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO .....	58
11.2 CONSTANCIAS Y PARTICIPACIONES EN FOROS Y CONGRESOS. .....	59



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	16
Tabla 2.....	23
Tabla 3.....	26
Tabla 4.....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	12
Figura 2.....	13
Figura 3.....	14
Figura 4.....	19
Figura 5.....	20
Figura 6.....	22
Figura 7.....	24
Figura 8.....	24
Figura 9.....	25
Figura 10.....	32
Figura 11.....	38
Figura 12.....	39
Figura 13.....	40
Figura 14.....	41
Figura 15.....	42
Figura 16.....	43

## **ABREVIATURAS Y SIGLAS**

DE: Disruptores Endocrinos

GLUT-4: Transportador de glucosa tipo 4

MEHP: Mono(2-etilhexil) ftalato

DEHP: Di-(2-etilhexil) ftalato

PPAR $\gamma$ : Receptor activado del proliferador de peroxisoma gamma

IMC: Índice de masa corporal

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

RE: receptor estrogénico

mRE: Receptor de membrana asociado al receptor estrogénico.

AhR: Receptor de hidrocarburos de arilos

BAT: Brown adipose tissue

WAT: White adipose tissue

MSC: células madre mesenquimales

5mc: 5-metilcitosina

TG: triacilglicéridos

## 1. INTRODUCCIÓN

La obesidad y el sobrepeso representan un problema de salud pública que afecta a más del 57% de la población mundial según datos de la OMS del 2017. Su padecimiento genera un mayor riesgo en el desarrollo de comorbilidades, afectando la calidad y esperanza de vida de los pacientes con obesidad. una etiología compleja que está relacionada con el consumo en exceso de alimentos altamente calóricos en la dieta diaria y cambios en el estilo de vida como lo es el sedentarismo, sin embargo, además de estos factores conocidos se ven involucrados los factores genéticos y ambientales a tomarse en cuenta. Entre los factores ambientales menos estudiados, pero de gran interés, se encuentran los disruptores endocrinos los cuales son sustancias químicas que poseen la capacidad de alterar el funcionamiento del sistema endocrino modificando diversos procesos mediados por hormonas en el cuerpo humano. Dentro de estos químicos con efectos endocrinos los categorizados como obesógenos interfieren directamente con el metabolismo, el desarrollo y mantenimiento del tejido adiposo y su relación con el apetito, el peso y el equilibrio energético. Un ejemplo de estos obesógenos son los ftalatos, entre ellos podemos destacar el DEHP y su principal metabolito el MEHP que se encuentran en continua interacción con la población al ser utilizados generalmente en los plásticos, productos de cosmética, juguetes, lubricantes, etc. y poseen entre algunas de sus dianas molecular al PPAR $\gamma$ , el cual puede inducir cambios en el tejido adiposo directamente sobre el adipocito interfiriendo en el proceso de adipogénesis. Pese a la evidencia científica recabada en los últimos años, los mecanismos de acción de los disruptores endocrinos en la obesidad aún permanecen sin dilucidar por completo, por lo que su estudio favorecerá la prevención de sus efectos a través de intervenciones que disminuyan su exposición o tratamientos para disminuir sus efectos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Obesidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al sobrepeso y la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa en el tejido adiposo y en otros órganos metabólicos que puede ser perjudicial para la salud. Uno de los métodos utilizados en la práctica para determinar y diagnosticar el sobrepeso o la obesidad es el índice de masa corporal (IMC) el cual consiste en una relación entre el peso en kilogramos del individuo dividido entre el cuadrado de la altura en metros (Figura 1), considerando un IMC mayor a 25 kg/m<sup>2</sup> como sobrepeso y por arriba de 30 kg/m<sup>2</sup> como obesidad (W.O.F., 2021).

Para comprender la etiología de estas enfermedades se consideran como patologías crónicas, complejas y multifactoriales como resultado de la interacción directa entre los genes y el medio ambiente donde el individuo se ve desarrollado, siendo uno de los factores principales la ingesta de alimentos altamente calóricos que representan un desequilibrio energético entre la ingesta de esos y el gasto energético.

	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Clase de obesidad	Riesgo de enfermedad	
			Hombre ≤ 102 cm	Hombre ≥ 102 cm
			Mujer ≤ 88 cm	Mujer ≥ 88 cm
Bajo peso	< 18.5		-	-
Normal	18.5–24.9		-	-
Sobre- peso	25.0–29.9		Aumentado	Alto
Obesidad	30.0–34.9	I	Alto	Muy alto
	35.0–39.9	II	Muy alto	Muy alto
Obesidad extrema	> 40.0	III	Extremadamente alto	Extremadamente alto

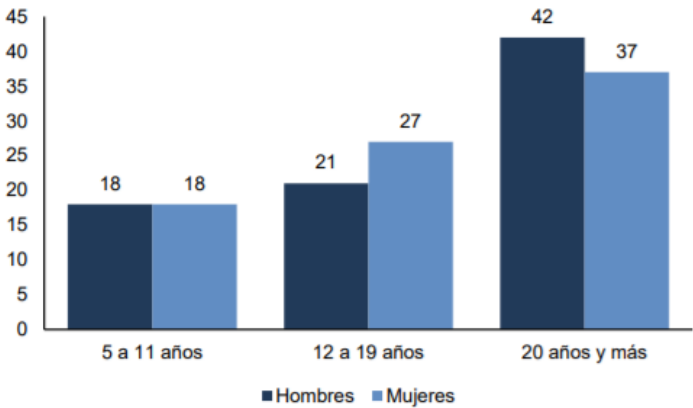
**Figura 1. Clasificación de sobrepeso y obesidad por IMC.**

En las últimas décadas el exceso de peso que se ha logrado observar en la población mundial ha ido en aumento y está alcanzando cifras sorprendentemente preocupantes, a pesar del conocimiento que se ha logrado adquirir sobre la gravedad de las afecciones

derivadas de esta epidemia global, es por esto que en la actualidad representan a uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel internacional incluso llegando a ser considerada como la epidemia no trasmisible con mayor número de casos en el mundo, de acuerdo con cifras de la OMS reportadas en el 2016, el 39% de la población adulta en países desarrollados padecían algún tipo de sobrepeso u obesidad siendo el 13% de este grupo individuos los que presentaban obesidad. Cabe mencionar que estas patologías afectan de igual manera a poblaciones no adultas pudiendo observar que alrededor de 340 millones de niños y adolescentes entre 5 y 19 años presentan alguna de estas dos patologías.

2.1.1 Obesidad en México

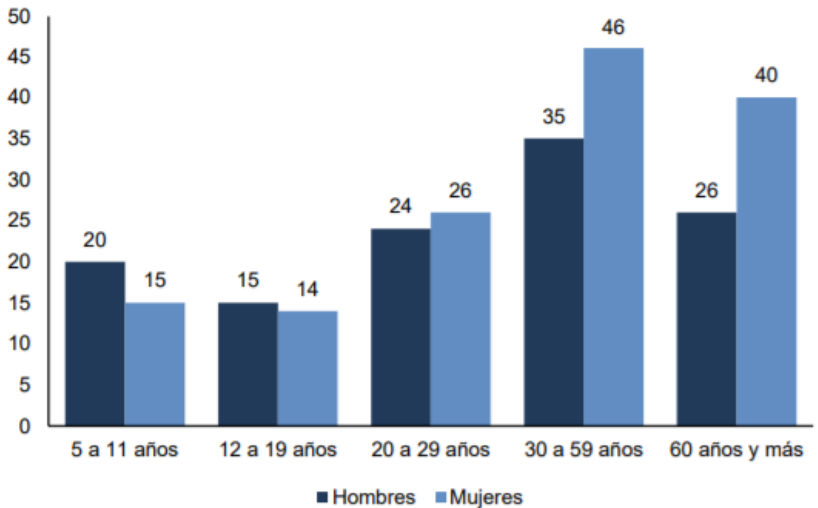
En América latina en particular el panorama epidemiológico de la obesidad no es muy distinto al panorama mundial. En México según datos de la ENSANUT 2018 revela que en el país poco más de una quinta parte (22%) de niños con menos de 5 años, tienen riesgo de padecer sobrepeso. En 2018, de la población de 5 a 11 años, 18% tiene sobrepeso y va en incremento conforme aumenta la edad; 21% de los hombres de 12 a 19 años y 27% de las mujeres de la misma edad, presentan sobrepeso. En la población de 20 años o más, los hombres con un 42% reportan una prevalencia más alta que las mujeres con un 37% (Figura 2).



**Figura 2. Prevalencia de sobrepeso en la población de 5 años o más en grupos de edad y sexo 2018.** Datos obtenidos de: INEGI/INSP. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2018.

La prevalencia de obesidad en niños de 5 a 11 años (20%) es mayor a la del grupo de hombres de 12 a 19 años (15%); en las mujeres de ambas edades se observa la misma tendencia, aunque con una menor brecha (un punto porcentual).

En el grupo de mujeres de 20 a 29 años, la prevalencia de obesidad es de 26% y aumenta a 46% en el grupo de 30 a 59 años; en los hombres se observa un aumento menos pronunciado al pasar de 24 a 35 por ciento. Los adultos mayores tienen otra dinámica: las mujeres presentan una prevalencia de obesidad más alta (40%) con respecto a los hombres; la diferencia es de 14 puntos porcentuales (**Figura 3.**)



**Figura 3. Prevalencia de obesidad en la población de 5 años o más por sexo y grupos de edad 2018.**

Datos obtenidos de: INEGI/INSP. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018

Cabe destacar que México es el segundo país con mayor tasa de obesidad entre los países miembros de la OCDE y según las estimaciones de la OMS, las enfermedades relacionadas con el sobrepeso reducirán la esperanza de vida en el país en más de 4 años en los próximos 30 años.

Es importante mencionar que el exceso de peso corporal en aquellos que padecen alguna de estas dos enfermedades representa un importante riesgo como desencadenante en el desarrollo de diversas enfermedades crónicas incluyendo enfermedades

cardiovasculares, diabetes mellitus, dislipidemias y algunos tipos de cáncer, colocando así a la obesidad y el sobrepeso como una de las principales causas de muertes en la mayoría de los países con un alto número de presencia de estas. Además, sumado a las complicaciones derivadas de estas enfermedades, la demanda de tratamiento y atención de los servicios de salud a estos pacientes representa un impacto económico importante a nivel nacional.

Si bien se conoce que la obesidad y el sobrepeso son enfermedades de origen multifactorial que involucran tantos factores genéticos y su relación con un estilo de vida de poca o baja actividad física junto con una alimentación deficiente, convierte estos elementos en los principales blancos de estudio que pueden explicar el desarrollo de estas dos patologías debido a su efecto directo en el consumo energético y el gasto calórico, sin embargo el interés que representa en la actualidad la interacción con el medio ambiente como lo son contaminantes, químicos, etc., genera una ventana de estudio que puede relacionar este factor como uno de los responsables en desencadenar alteraciones que favorecen el incremento de los cambios involucrados en el desarrollo de obesidad y sobrepeso, ahora bien, entre estos factores ambientales podemos destacar la presencia y el uso excesivo de diversas sustancias de como lo son los disruptores endocrinos, que han demostrado tener un papel importante en el desarrollo de estas patologías.

## 2.2 Disruptores Endocrinos

Los disruptores endocrinos (DE) son sustancias químicas exógenas que poseen actividad hormonal y que pueden actuar como agonistas o antagonistas hormonales alterando así la homeostasis del sistema endocrino produciendo cambios en múltiples procesos biológicos (Monneret, 2017).

Los DE pueden ser de origen natural o sintético, por lo que es común encontrarlos en diversos productos como: botellas de plásticos y latas de alimentos (BPA y ftalatos), detergentes y retardantes de fuego, alimentos (BPA), juguetes (ftalatos), cosméticos y medicamentos (parabenos), entre otros (**Tabla 1**). Los efectos biológicos de los



disruptores endocrinos dependen de diversos factores como: a) la etapa de exposición, siendo el desarrollo temprano el de mayor susceptibilidad biológica; b) el tiempo de exposición, refiriéndose a la duración de la exposición al DE (días, meses, años); c) la farmacodinamia de los compuestos, que se refieren a los efectos bioquímicos y fisiológicos y de sus mecanismos de acción en relación a la concentración que para este tipo de compuestos por lo general no siguen un comportamiento monotónico (Kassotis *et al.* 2019).

**Tabla 1. Mecanismos de acción de los disruptores endocrinos más comunes y sus efectos sobre la salud.**

<b>Disruptor Endócrino</b>	<b>Uso</b>	<b>Acción en el sistema endocrino</b>	<b>Efectos biológicos</b>
<b>Alquifenoles</b>	Detergentes, agentes de secado, uso textil.	Efectos sobre el receptor estrogénico	Cambios en el metabolismo de la testosterona.
<b>Atrazina</b>	Herbicidas	Incremento expresión aromatasa	Alteración del desarrollo sexual masculino.
<b>Bisfenol A (BPA)</b>	Resinas epoxi, envases alimentos	Se une al RE, mRE, PPAR	Alteración del desarrollo del sistemas reproductor e inmune, cambios en el metabolismo.
<b>Ftalatos</b>	Conservantes en cosméticos, plastificante.	Se unen al RE, PPAR	Alteración en el funcionamiento y desarrollo del sistema reproductor, cambios en el metabolismo de lípidos.
<b>Parabenos</b>	Conservante	Estrogénico	Alteración de desarrollo del tejido uterino.

Se ha demostrado que la exposición a los disruptores endocrinos inducen efectos adversos contra la salud, como incremento en la incidencia de neoplasias, generación de malformaciones en el desarrollo, disfunciones en el aparato reproductor, cambios en la respuesta inmune y efectos directos en el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Encarnação *et al.* 2019).

### 2.2.1 Mecanismo de acción y toxicidad de los DE

Los efectos biológicos de las hormonas sintetizadas en el organismo (estrógeno, progesterona, testosterona, tiroxina) están mediados por receptores de alta afinidad ubicados en células diana, y debido a esta especificidad cada hormona y su receptor actuarán de manera coordinada activando cascadas de señalización para regular procesos biológicos hormono-dependientes.

Si bien el mecanismo de acción de las hormonas se ha estudiado ampliamente, los procesos mediados por los DE que involucran de manera directa la regulación hormonal sobre las células diana, actúan a través de diversos mecanismos cuyo estudio debe ser prioridad en la investigación en este campo. Entre distintos mecanismos de acción de los DE, se encuentran:

- a) Mimetizar la acción de las hormonas confundiendo a sus receptores celulares.
- b) Antagonizar la acción de las hormonas.
- c) Alterar el patrón de síntesis, transporte y metabolismo hormonal.
- d) Modular los niveles de los receptores hormonales correspondientes.

Los efectos de los DE dependerán de los siguientes factores (Carranza, 2021).

- Determinación del peligro de la sustancia: describe la caracterización de la sustancia para su clasificación como DE, hasta el momento la OMS ha caracterizado más de 800 sustancias disruptoras.
- Efecto dosis-respuesta: los DE no presentan un comportamiento dependiente de la dosis por lo que pueden presentar curvas no monotónicas induciendo efectos

diferenciales en respuesta a dosis altas o bajas. Siendo que generan efectos a dosis muy bajas (0.3 a 30 nM, presentando toxicidad por arriba de 100nM).

- Tipo de exposición: dependerá de la forma en la que la exposición sucederá refiriéndose a si estas se encuentran en una mezcla o bien puras, el momento en el que la exposición se presenta, su comportamiento en el ambiente y de su bioacumulación.

Recordando que los DE pueden actuar uniéndose a cualquier tipo de receptores nucleares, de membrana, receptores para neurotransmisores (receptor para la serotonina, dopamina y noradrenalina), también pueden tener efectos directos sobre distintas rutas metabólicas como el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Balaguer *et al.* 2019).

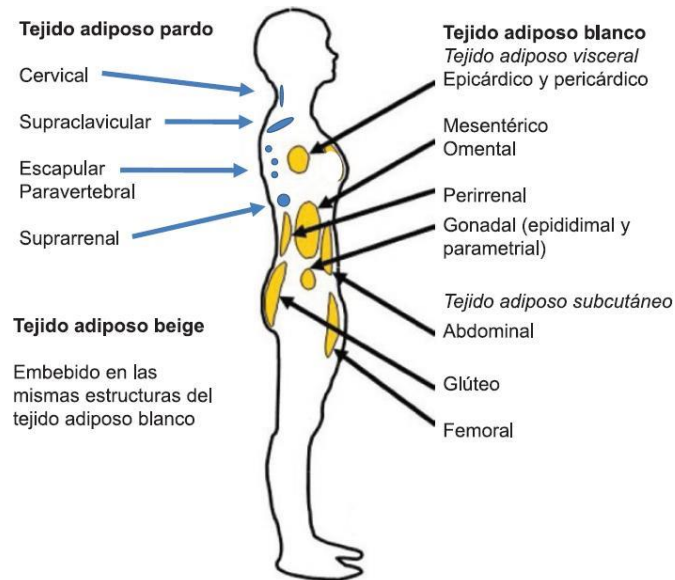
### 2.3 Tejido adiposo.

El tejido adiposo es un órgano endocrino que posee características que dependiendo de su función puede clasificarse en tejido adiposo blanco (WAT) y tejido adiposo marrón (BAT), cumpliendo con diversas señalizaciones a órganos diana capaces de controlar la homeostasis de distintos procesos en el cuerpo (Murawska-Ciałowicz, 2017). Dada su importancia como órgano endocrino sobre todo en los procesos metabólicos de la glucosa y lípidos, es un blanco directo capaz de sufrir los efectos de los DE.

Los adipocitos son la principal unidad funcional del tejido adiposo cumpliendo la función principal de formar vesículas lipídicas para evitar el daño por lipotoxicidad a otros tejidos como el hígado y musculo. Morfológicamente se identifican tres tipos de tejido adiposo: blanco, pardo y beige, cada uno con una ubicación, función y expresión de genes particular (Rosen *et al.*, 2006).

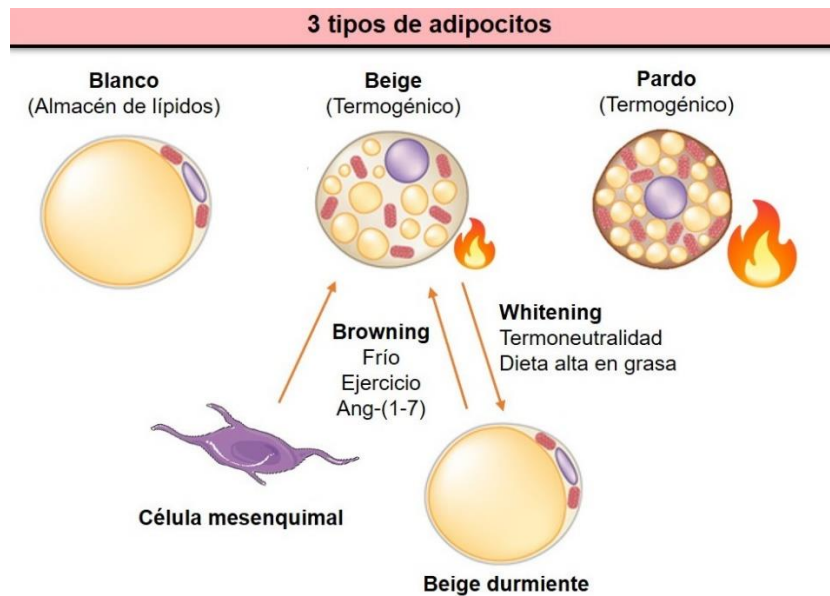
Los adipocitos blancos forman en su mayoría el tejido adiposo blanco (WAT) y son los principales responsables de almacenar energía química en forma de triglicéridos empaquetados en una gota lípidos unilocular. Por otra parte, los adipocitos marrones son ricos en mitocondrias conformando gran parte del tejido adiposo marrón (BAT) el cual está especializado en la homeostasis de energía para generar calor. Los adipocitos

marrones se distribuyen en ubicaciones anatómicamente específicas, principalmente en el cuello, escápulas y cavidad torácica en humanos (**Figura 4**).



**Figura 4. Localización del tejido adiposo en humano.**

El tercer tipo de células grasas, los adipocitos beige, tienen propiedades distintas de los adipocitos blancos y marrones, ya que poseen un número abundante de mitocondrias y a su vez un alto número de gotas lipídicas multiloculares similares a la morfología de los adipocitos marrones, pero se localizan principalmente en el tejido adiposo blanco (WAT) subcutáneo (Song *et al.*, 2019). Es importante mencionar la capacidad de los adipocitos blancos poseen la plasticidad de convertirse a adipocitos beige en respuesta a temperaturas frías y a su vez estos regresar a adipocitos blancos en respuesta a cambios de temperatura (calentamiento) y la alimentación con dieta alta en grasas (**Figura 5**).



**Figura 5. Plasticidad del tejido adiposo.**

### 2.3.1 Regulación genética de la adipogénesis.

La adipogénesis es el proceso por el cual los adipocitos, se desarrollan y acumulan lípidos para poder conformar el tejido adiposo y lograr distribuirse en varios sitios del cuerpo dependiendo de su función ya sea como grasa subcutánea como depósitos de esta.

Para comenzar el proceso de adipogénesis es necesario el compromiso de las células madre mesenquimales (MSC) para que estas puedan llegar a preadipocitos. Una vez generado un gran número de células preadipocíticas, las MSC se diferencian en adipocitos maduros bajo los efectos de diversos factores de transcripción, entre los cuales podemos destacar la función de C / EBP $\beta$  /  $\delta$  y PPAR $\gamma$ .

En la fase inicial se induce la expresión las proteínas de unión a CCAAT/enhancer  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) y C/EBP $\delta$ . Estas proteínas dan origen a una segunda etapa donde sus blancos principales son los promotores de los genes que codifican para PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ . El PPAR $\gamma$  es un receptor nuclear y factor de transcripción que juega un papel central de alta importancia en la adipogénesis como moduladores de la expresión y función de factores

activados en cascada regulados por este receptor como por ejemplo el C/EBP $\alpha$  que participa de manera directa en la alimentación positiva o negativa de PPAR $\gamma$  para poder aumentando o disminuir su expresión. (Sen, C. K. 2014).

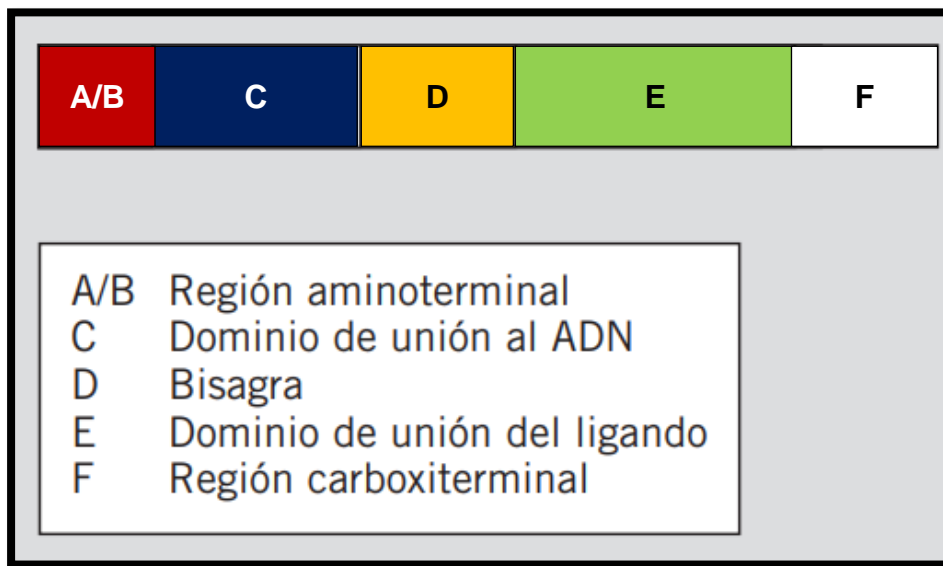
Otro factor de alta importancia en el proceso de adipogénesis es el transportador de glucosa 4 (GLUT-4), el cual permiten el paso de la glucosa al interior de la célula al adherirse a la membrana plasmática mediado en su mayoría por la presencia de insulina y la expresión del PPAR $\gamma$ .

#### 2.4 Receptor activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR)

Los PPAR son factores de transcripción generalmente activados por ligando pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares. Cada uno de los miembros de la subfamilia de los PPAR esta codificado por distintos genes y presentan diferentes patrones de distribución en el tejido (Rosen et. al 2001). Los miembros de la familia de los PPAR realizan funciones diferentes, dependiendo de los genes que regulan. Tienen un papel fundamental en la regulación del metabolismo principalmente de los ácidos grasos, estos genes son codificados y clasificados dependiendo de su actividad, debido a esto podemos tener distintos miembros como son PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\beta/\delta$ , los cuales presentan homología estructural pero una función específica ya que se expresan con mayor actividad en distintos tejidos. El PPAR $\gamma$  regula el metabolismo en los adipocitos y otros tejidos metabólicamente activos, se expresa predominantemente en tejido adiposo y en menor cantidad en hígado, músculo, cerebro, macrófagos y placenta. A partir del gen PPARG, se originan 2 isoformas distintas de la proteína, PPAR $\gamma$ 2 difiere de PPAR $\gamma$ 1.

La estructura proteica de PPAR $\gamma$  contiene dominios característicos de receptores nucleares de hormonas y es idéntica entre ambas isoformas. PPAR $\gamma$  se compone de 4 partes funcionales (**Figura 6**):

- La región A/B en el extremo N-terminal contiene el motivo de activación-1 independiente de la unión al ligando (AF-1) que puede actuar como modulador de la actividad del receptor al integrar vías de señalización y afectar en la especificidad de activación del gen diana.
- La región C contiene el dominio de unión al DNA (DBD), en específico a los elementos de respuesta a los proliferadores de peroxisomas (PPRE).
- La región D, o dominio eje, puede unirse a varios cofactores o reguladores de la transcripción.
- En el extremo carboxilo terminal (C-terminal) se encuentra la región E/F contiene el dominio de unión al ligando (LBD). El dominio LBD forma una especie de bolsillo de unión a la cabeza hidrofóbica del ligando (Uppenberg *et al.* 1998). Por otro lado, el extremo N-terminal sufre una fosforilación al estar unido el receptor de ácido retinoico RXR.



**Figura 6. Estructura del receptor nuclear PPAR.**

### 2.4.1 Mecanismo de acción del PPAR

Los PPAR actúan como factores de transcripción dependientes del ligando, los cuales poseen una naturaleza lipofílica que les permite interactuar con el LBD. Los ligandos del PPAR son de origen endógeno, es decir, sintetizados por el propio organismo o bien de origen farmacológico. Como ligandos endógenos del PPAR $\gamma$  se han identificado la prostaglandina 15dPGJ2 y los metabolitos de la oxidación del ácido linoleico, mientras que los ligandos farmacológicos podemos encontrar a las tiazolidinedionas (**Tabla2**).

**Tabla 2. Ligandos específicos de PPAR $\gamma$  (modificado de Medina et al. 2000)**

	<b>Gamma</b>
Sintéticos	Tiazolidinedionas
Naturales	Linoleico Linolénico 9HODE 13HODE 15d-PGJ2 Eicosapentanoico

Los PPAR actúan como heterodímeros con otros miembros de la familia de receptores nucleares, particularmente con el receptor X retinoico (RXR) al cual se le une el ácido 9-cis retinoico como factor de activación. El heterodímero PPAR $\gamma$ -RXR a los PPRE a través de sus dominios DBD. Los PPRE están compuestos por la secuencia consenso 5'-AGGTCANAGGTCA-3' y se encuentran localizados en las regiones promotoras de genes (**Figura 7**). Una vez que el PPAR $\gamma$ -RXR se ha unidos al PPRE, el heterodímero es activado por sus ligandos respectivos para regular positiva o negativamente la transcripción de diversos genes como son el gen de la lipasa lipoproteica, el CD36, proteína de unión a los adipocitos, proteína de transporte de ácidos grasos FATP-1 involucrados en la diferenciación de adipocitos; genes relacionados con el metabolismo



lipídico como la adiponectina, leptina, resistina y el receptor de LDL; la sensibilidad a la insulina mediante FATP-1, PEPCK y la disminución de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6 y el inhibidor del activador del plasminógeno-1; control del metabolismo de glucosa por CAP y GLUT-4; así como el control de procesos inflamatorios mediante la activación de macrófagos por TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12. Cuando el PPAR no se encuentra unido a ligando, este se mantiene inactivo interrumpiendo la transcripción de dichos genes (Janesick et al. 2011).

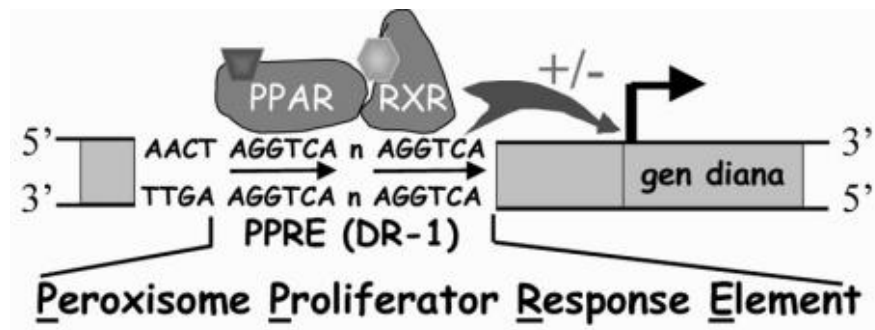


Figura 7. Activación de PPAR.

El gen PPAR $\gamma$  se localiza en la posición 3p25 del genoma humano (**Figura 8**). Existen dos isoformas codificadas por el gen PPAR $\gamma$ : PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2; la isoforma PPAR $\gamma$ 1 se expresa en la mayoría de los tejidos, mientras que PPAR- $\gamma$ 2 es específico para el tejido adiposo, donde juega un papel clave en la regulación de la diferenciación adipogénica. La isoforma PPAR $\gamma$ 2 difiere por 30 aminoácidos adicionales ubicados en la región N-terminales con respecto a la isoforma PPAR $\gamma$ 1.

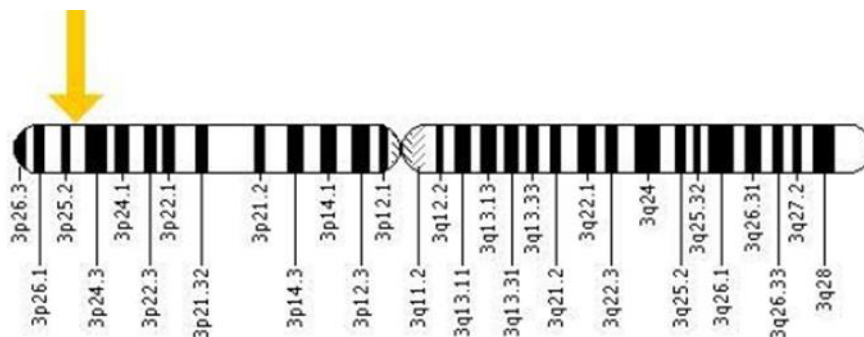
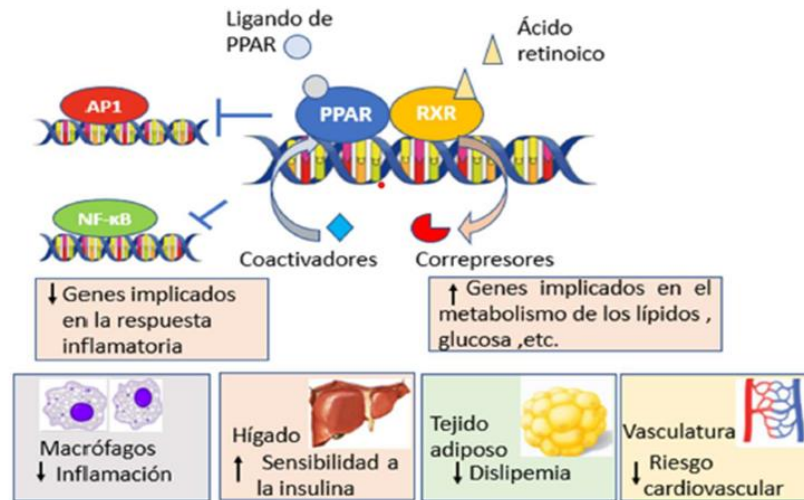


Figura 8. Localización del gen PPAR $\gamma$ . Tomado de la página Genetics Home Reference, National Institutes of Health.

El PPAR participa en la regulación de diversos procesos biológicos dependiendo del tejido en donde se exprese, por ejemplo, el PPAR $\gamma$  regula la adipogénesis, almacenamiento de lípidos y la inflamación en tejido adiposo, colon y en macrófagos, y por otro lado regula funciones como oxidación de ácidos grasos (hígado) y procesos inflamatorios en hígado, riñón y corazón (**Figura 9**).



**Figura 9. Mecanismo de acción de PPAR.** Modificado de Cheang *et al.*, 2015.

#### 2.4.2 Obesógenos

Los compuestos obesogénicos son sustancias exógenas que promueven la acumulación de lípidos y la adipogénesis en el organismo. Los principales involucrados en el desarrollo de la obesidad son las dietas con un alto contenido de calorías, la falta de actividad física y la predisposición genética, sin embargo, los factores ambientales juegan un rol importante en el desarrollo de dicha patología.

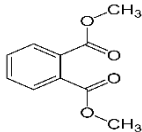
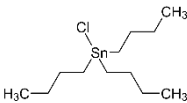

Un compuesto es considerado un obesógeno cuando promueve el proceso de adipogénesis provocando una acumulación excesiva de triglicéridos en la célula a través de los siguientes mecanismos:

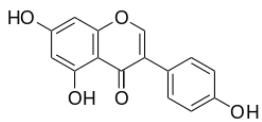
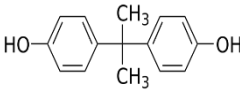
- Aumentando el número de adipocitos (hiperplasia)

- Aumento de la cantidad de grasa almacenada en el adipocito (hipertrofia)
- Cambio en el control hormonal mediado por los adipocitos (adipocinas) relacionado con el apetito y la saciedad.

Durante los últimos años, han sido identificados distintos compuestos con actividad obesogénica, entre los cuales podemos destacar a los ftalatos, compuestos comúnmente utilizados en la industria, como el di- (2-etilhexil) ftalato (DEHP), cuyo metabolito induce efectos directos sobre las moléculas dianas encargadas de los procesos metabólico en el tejido adiposo como PPAR $\gamma$ , alterando los controles del apetito y creando un déficit en la homeostasis lipídica durante el desarrollo y crecimiento del organismo (**Tabla 3**) (Heindel *et al.* 2015).

**Tabla 3. Características de los compuestos obesogénicos más comunes**

<b>Obesógeno</b>	<b>Estructura</b>	<b>Uso</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
<b>Ftalatos</b>		Plastificante.	Activación de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) y la modulación epigenética.
<b>Organoestaños</b>		Biocida, mezclas de PVC y pinturas.	Afectan la señalización del receptor nuclear PPAR $\gamma$ , alterando el transporte de glucosa y metabolismo de lípidos.
<b>Ácido perfluorooctanoico</b>		Utensilios de cocina como antiadherente.	Altera el metabolismo energético y la

			homeostasis por la activación de PPAR $\gamma$ .
<b>Genisteína</b>		Inhibidor de la angiogénesis y fitoestrógeno.	Altera la expresión de reguladores metabólicos y adipogénicos, como PPAR $\gamma$ .
<b>Bisfenol A</b>		Producción de plásticos de policarbonato y resinas epoxi.	Altera el metabolismo de la glucosa, deteriora la adipogénesis y causa disfunción de los adipocitos.

### 2.4.3 Efectos obesogénicos de los ftalatos.

Los ftalatos son compuestos orgánicos sintéticos derivados del ácido tálico, el principal ftalato de uso en la industria es el ácido di-2-etil-hexil-ftalato (DEHP), el cual es metabolizado hacia mono-2-etil-hexil-ftalato (MEHP). El DEHP es empleado para la producción de plásticos, productos de cosmética, juguetes, lubricantes, entre otros, por lo que la población se encuentra en contacto con el mismo de forma continua, siendo que en humanos se ha determinado que la transferencia de ftalatos es de 160  $\mu\text{g}/\text{día}$  aproximadamente (Xie, *et al.*, 2002).

Respecto a sus efectos biológicos, se ha observado en cultivos de preadipocitos 3T3-L1 la exposición de MEHP induce adipogénesis actuando directamente sobre PPAR $\gamma$  (Feige, *et al.* 2007). Los metabolitos del DEHP: MEHP y MEOHP se unen y activan al receptor PPAR $\gamma$ , por lo que podrían alterar procesos como el metabolismo de lípidos a través de la vía de PPAR $\gamma$  (Kratovichil, 2019).

En modelos *in vivo*, Schidt y col. (2012) determinaron el efecto del DEHP sobre la adipogénesis en ratones C3H/N y encontraron que el peso corporal y los depósitos de grasa visceral aumentaron en ratones expuestos a dosis ambientalmente relevantes de este disruptor y se observaron cambios metabólicos en la descendencia de las hembras expuestas a DEHP directamente en la dieta (Schidt *et al.* 2012). En otro estudio realizado por Hurst y col. (2013) determinaron que la exposición prenatal de DEHP a dosis mayores de 5 mg/kg de peso en ratones, induce un efecto directo en el desarrollo de adipocitos actuando a través de la activación de PPAR $\alpha$ , mientras que la exposición crónica a esta misma dosis induce adipogénesis, por activación de PPAR $\gamma$ . Mientras que la exposición a MEHP en etapas de desarrollo prenatal en ratones macho promueve una mayor tasa de diferenciación de adipocitos, a través de un aumento en la expresión de PPAR $\gamma$ , que conlleva al desarrollo de obesidad aumentando el peso corporal, la masa grasa, el colesterol sérico, los niveles de TAG y los niveles de glucosa, aunado a un cambio en la expresión de reguladores y marcadores adipogénicos (Hao *et al.* 2012).

En humanos se ha observado que la exposición a ftalatos como el DEHP y el ftalato de diisononilo (DiNP), el ftalato de dietilo (DEP) y el ftalato de butilbencilo (BBzP) tienen una relación significativa en el desarrollo de obesidad en humanos (Kim *et al.* 2014), así como un efecto a nivel prenatal en relación con la masa grasa infantil (Buckley *et al.* 2015).

En conjunto los niveles de exposición a ftalatos como el MEHP se asocian con el desarrollo de obesidad, sin embargo, también se han asociado con la resistencia a la insulina en adultos (Lind *et al.* 2012). La evidencia científica muestra que el MEHP tiene un impacto directo en la lipólisis y aumenta la captación de glucosa alterando el metabolismo energético de las células expuestas (Chiang *et al.*, 2014). Por lo que es posible que la exposición a MEHP altere la homeostasis de los triglicéridos, la glucosa, entre otros procesos metabólicos en humanos.

Por otro lado, a nivel epigenético los disruptores endocrinos inducen alteraciones en los puntos de ajuste metabólicos mediados por receptores nucleares, alteración de controles del apetito y perturbación de la homeostasis lipídica. En un estudio realizado por Manikkam y col. (2013) se evaluó el efecto de diversos DE derivados de plásticos (BPA,

DEHP y DBP) y se observó herencia transgeneracional de la obesidad y otras enfermedades en las líneas F1 y F3 que no habían sido expuestas a los DE y se encontraron cambios en el patrón de metilación del DNA en el esperma de las ratas macho descendientes, por lo que podría ser un mecanismo a través del cual los DE inducen efectos transgeneracionales en los organismos, en este caso de la obesidad.

De esta manera la relación entre factores externos como los DE y su actividad reguladora en los procesos hormonales generan interés en el estudio de mecanismos moleculares que subyacen los efectos de los disruptores en la adipogénesis y su asociación con el desarrollo de la obesidad. La exposición a los DE podría ser un factor relevante que contribuya al drástico aumento de la incidencia de obesidad en el mundo, ya que el efecto de los DE sobre la síntesis, secreción, transporte, metabolismo y mecanismos de liberación de hormonas relacionadas con el proceso de la adipogénesis mediante la excesiva acumulación de lípidos en el organismo comprometen al individuo al desarrollo y origen de la obesidad y las complicaciones asociadas. Más aún, sus efectos podrían tener un impacto a nivel transgeneracional, lo que resalta la importancia de comprender los efectos de exposiciones ambientalmente relevantes de disruptores endocrinos.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Actualmente más del 70% de la población mexicana presenta obesidad y sobrepeso, por lo que es de suma importancia realizar acciones enfocadas en prevenir su desarrollo y el de patologías asociadas como la diabetes mellitus, hipertensión arterial y algunos tipos de cáncer. Los principales factores asociados al desarrollo de la obesidad son los hábitos de alimentación y el sedentarismo, así como factores ambientales, entre los que se encuentran los disruptores endocrinos presentes en productos de uso diario en plásticos, hidrocarburos, pesticidas y otros contaminantes. En este sentido, diversos estudios han aportado evidencia de los mecanismos moleculares responsables de la regulación de la actividad adipogénica, los cuales pueden verse afectados por la interacción con el ambiente ya que generan cambios en la expresión de genes que controlan muchas vías metabólicas que están comprometidas en el origen de la obesidad. Sin embargo, existe poca información sobre sus efectos a nivel epigenético y su relación con los cambios metabólicos inducido durante la adipogénesis. Por lo que el presente estudio pretender determinar el efecto de la exposición al mono(2-etilhexil) ftalato en la epigenética y procesos metabólicos asociados al proceso de formación de adipocitos empleando un modelo *in vitro*.

#### **4. HIPOTESIS**

La exposición a MEPH inducirá cambios en la captura de glucosa y acumulación de TG, así como modificaciones en los patrones de metilación del gen PPAR $\gamma$  en adipocitos maduros 3T3-L1.

#### **5. OBJETIVOS**

##### 5.1 Objetivo General:

Determinar el efecto de la exposición a MEPH a nivel metabólico y epigenético en adipocitos maduros 3T3-L1.

##### 5.2 Objetivo Particular:

- Determinar el efecto de la exposición a MEPH en la acumulación de TG en adipocitos maduros.
- Determinar los cambios en la captura de glucosa por el efecto de la exposición MEPH en adipocitos maduros.
- Analizar el efecto de la exposición a MEPH en cambios de metilación del gen de PPAR $\gamma$  en adipocitos maduros.
- Evaluar la asociación entre la metilación del gen de PPAR $\gamma$  y los posibles cambios metabólicos en la célula.



## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Metodología

#### 6.1.1 Cultivo y diferenciación celular.

Los fibroblastos 3T3-L1 de ratón (CL-173™) fueron obtenidas en el Departamento de Investigación Biomédica de la Facultad de Medicina.

Los fibroblastos 3T3-L1 fueron cultivados en medio de cultivo de proliferación hasta una confluencia de aproximadamente 80% (día -2). Posteriormente las células fueron incubadas en medio de sincronización durante 24h, el cual contiene DMEM base con 3% de SFB con el fin de llevar a los fibroblastos a un crecimiento coordinado (día -1). Un día después (día 0) se inició la diferenciación de los fibroblastos empleando medio de cultivo de diferenciación 1 durante 48h. Posteriormente, las células fueron incubadas en medio de diferenciación 2, el cual fue sustituido por medio de mantenimiento en el día 4 para continuar con el proceso de maduración de los adipocitos (14 días). A partir de este día las células se mantuvieron con este medio de mantenimiento el cual se cambió cada 2 días (**Figura 10**).

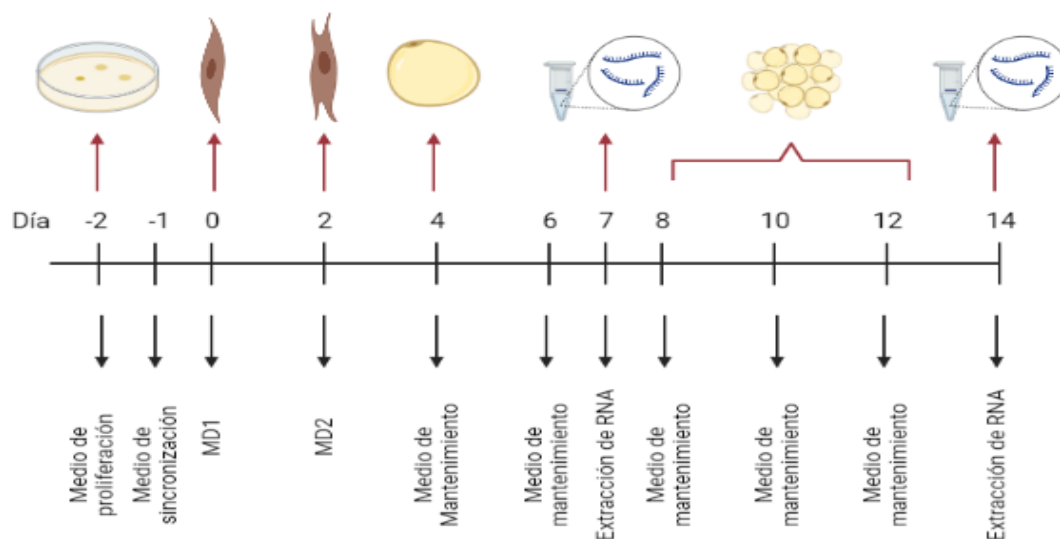


Figura 10. Cultivo y diferenciación de células 3T3-L1.

Las células 3T3-L1 se trataron con MEHP durante la etapa de maduración (0-15 días post-diferenciación) cada 48h con concentraciones de 3  $\mu$ M, 30  $\mu$ M y 100 $\mu$ M MEHP, las cuales son concentraciones ambientalmente relevantes para la exposición humana (Zhao *et al.* 2019). Se incluyó un grupo de células sin tratamiento y otro grupo tratado con el vehículo durante todo el experimento.

## 6.2 Extracción de RNA

El RNA total de las células 3T3-L1 fue extraído utilizando el método del Trizol® de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante (Invitrogen). Se determinó su concentración y pureza mediante espectrofotometría, y su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa. El RNA obtenido se conservó a -80°C hasta su uso.

La síntesis de cDNA a partir de mRNA se realizó mediante reacción de transcripción reversa utilizando el kit comercial Script™ cDNA Synthesis (Jena Bioscience), siguiendo las recomendaciones del fabricante para la concentración deseada, se mezclaron 2  $\mu$ L de ARN a una concentración de 500 ng/ $\mu$ L junto con 100 $\mu$ M oligo-(dT) para obtener la mezcla del templado del RNA, esta se mezcló con 5  $\mu$ L de la mezcla de reacción compuesta por: agua libre de nucleasas, SCRIPT buffer 5 X, 10 mM mix de dNTP, DTT stock solution 100 pmol/  $\mu$ L, 40 U/ $\mu$ L inhibidor de RNAsas y 200 U/ $\mu$ L de enzima SCRIPT transcriptasa reversa, para obtener una concentración final de reacción de 10  $\mu$ L. El programa de síntesis se realizó en 4 etapas, la primera de ellas para la desnaturalización y alineación durante 5 minutos a 65 °C para la mezcla de templado de RNA, posterior se incubó junto con la mezcla de reacción por 10 minutos a 42 °C seguido de una segunda incubación a 50 °C por 1H, para finalizar con una inactivación durante 10 minutos a 70 °C. El cDNA obtenido se conservó en alícuotas a -20 °C hasta su posterior uso como molde para la PCR punto final.

## 6.3 PCR punto final

Para determinar si el tratamiento proporcionado con MEHP modificaba la expresión de PPAR $\gamma$  como se ha reportado previamente (Hao *et al.*, 2012; Chiang *et al.*, 2016) se

determinó la expresión relativa la isoforma  $\gamma$ -2 del gen, por ser la de mayor abundancia en el tejido adiposo.

Se empleó la técnica de PCR punto final, se preparó un mix que contenía 5 U/ $\mu$ L enzima polimerasa, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP mix, 2  $\mu$ L colorless Buffer 10X, 0.5  $\mu$ L primers forward y 0.5  $\mu$ L primer reverse y 500 ng/ $\mu$ L de cDNA. La PCR se realizó en el equipo StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para la amplificación: FWD: 5'-ATGCACTGCCTATGAGCACT-3' y REV: 5'-CAACTGTGGTAAAGGGCTTG-3' (Fujiki *et al.*, 2009). Se utilizó el gen de la  $\beta$ -actina como gen housekeeping: FWD:5'-AGCTATGAGCTGCCTGACGG-3, REV: 5'-CCAGACAGCACTGTGTTGG-3. El programa de amplificación que se realizó fue el siguiente:

10 ´ a 95 °C	
30 ´´ a 95 °C	} 35 ciclos
40 ´´ a 62 °C	
30 ´´ a 72 °C	
5´ a 72 ° C	

Los productos de amplificación fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se analizaron mediante densitometría con el programa ImageJ.

#### 6.4 Tinción con rojo oleoso

Se utilizó la técnica de tinción con rojo oleoso (ORO) para la determinación de ácidos grasos en el adipocito. El colorante se une a los ácidos grasos y permite su visualización mediante microscopia. Una vez concluido el tiempo de maduración (14 días) los adipocitos fueron fijador con formaldehído al 4% y teñidos con la solución ORO al 0.2% disuelto en 40% de propanolol por 30 min. Posteriormente, se lavó el tinte con buffer de fosfatos y se observó al microscopio para su posterior análisis con el software ImageJ, para determinar el porcentaje de saturación de grasa y diámetro de los lóculos de grasa se cuantificará la cantidad de rojo oleoso mediante espectrofotometría.

## 6.5 Cuantificación total de triglicéridos.

Para la cuantificación total de triglicéridos se empleará el kit Triglyceride Quantification (SIGMA-ALDRICH®).

## 6.6 Cuantificación de glucosa

Para la determinación de la actividad metabólica de la glucosa se utilizó el kit AMPLEX RED GLUCOSE/GLU/1 KIT siguiendo las instrucciones del proveedor (Invitrogen®). El método se basa en la oxidación de la glucosa para crear un producto rojo fluorescente, que fue analizado mediante espectrofotometría para determinar la concentración de glucosa en las muestras.

## 6.7 Extracción de DNA

La extracción de DNA de las células 3T3-L1 se realizó al inicio del proceso de diferenciación (0 días) y al finalizar el periodo de diferenciación de estas (15 días), utilizando el Kit EZNA extracción de DNA (ZYMO Research) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 6.8 Ensayo de metilación (modificación con bisulfito)

El DNA obtenido será tratado con bisulfito de sodio mediante el kit de EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (ZYMO Research), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se eligió la región que contiene cinco sitios CpG, comprendidos por dos islas CpG en la región -247 y -437 de la región promotora del gen PPAR $\gamma$ , las cuales se han mostrado que son más sensibles a cambios epigenéticos de metilación y estos se correlacionan inversamente con la expresión del ARNm de PPAR $\gamma$  (Fujiki *et al.*, 2009). Por lo tanto, la metilación de CpG de estos sitios en el promotor PPAR $\gamma$  podría contribuir al silenciamiento de su expresión.

Una vez que se realice la modificación con bisulfito, las regiones -247 y -437 del promotor de PPAR $\gamma$  será amplificada mediante PCR usando los siguientes primers (**Tabla 4**) (Fujiki *et al.*, 2019).

**Tabla 4. Oligonucleótidos para identificar la secuencia genómica del promotor del PPAR $\gamma$ .**

Gen de interés	Secuencia
<b>PPAR<math>\gamma</math> región 247</b>	FWD: 5'-GAATAGTGAATGTGTGGGTTATTGG-3' REV: 5'-CAAACCTAAATTAACACTATCCTAAC-3'
<b>PPAR<math>\gamma</math> región 437</b>	FWD: 5'-GATGTGTGATTAGGAGTTTTAATTAAG-3' REV: 5'-CCAAAACAAAAATTATTCAATATTAATTAC-3'

Los productos obtenidos fueron purificados mediante el kit EZ DNA Methylation-Gold™ y secuenciados con los primers previamente indicados (**Tabla 4**) en la Unidad de Proteogenómica de la UNAM, Campus Juriquilla. Las secuencias obtenidas serán analizadas para determinar su composición nucleotídica y determinar los posibles cambios comparando los grupos tratados con los grupos control y con secuencias reportadas en la literatura.

#### 6.9 Análisis estadístico

Los resultados serán 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 versión 9. Las diferencias serán consideradas estadísticamente significativas a valores de  $p \leq 0.05$ .

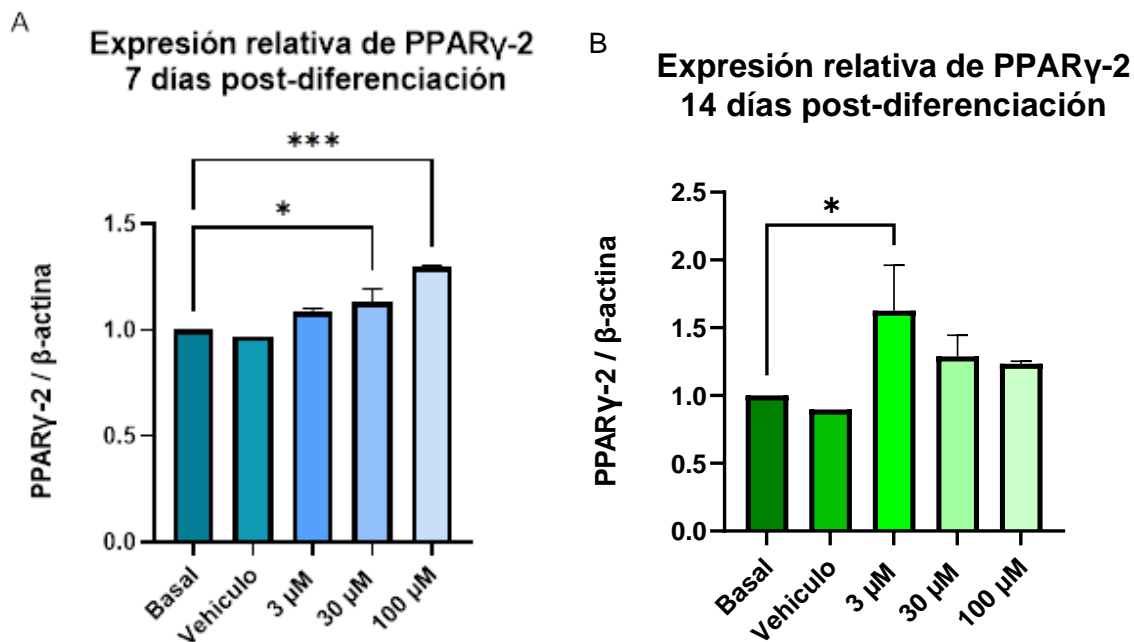
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Efecto del tratamiento con MEHP en la expresión de PPAR $\gamma$ .

Se cultivaron fibroblastos de ratón 3T3-L1 sin exposición al DE y expuestos a tres concentraciones de MEHP 3  $\mu$ M, 30  $\mu$ M y 300  $\mu$ M durante 15 días tras inducir la diferenciación. Una vez que inició el proceso de diferenciación se realizó una extracción de RNA de las células en dos tiempos de experimentación 7 y 14 días. Para evaluar los efectos del MEHP en la diferenciación de los adipocitos, se analizaron los niveles de expresión relativa de uno de los principales marcadores adipogénicos.

Esto se realizó mediante la síntesis de cDNA a partir del RNA extraído de las muestras control, vehículo y las tres dosis relevantes de MEHP. Se llevó a cabo una PCR punto final con el fin de evaluar la expresión relativa de PPAR $\gamma$ -2 mediante análisis de imagen del producto de amplificación.

La expresión de PPAR- $\gamma$  se determinó mediante el análisis densidad por análisis de imagen de los geles de electroforesis de las muestras de PCR obtenidas junto con un gen de referencia ( $\beta$ -actina). Se observaron cambios significativos en la expresión relativa de PPAR- $\gamma$ 2 en ambos tiempos de experimentación comparado con los grupos control y vehículo (**Figura 11**) sugiriendo un efecto sobre la expresión de PPAR- $\gamma$ 2 mediada por el MEHP.

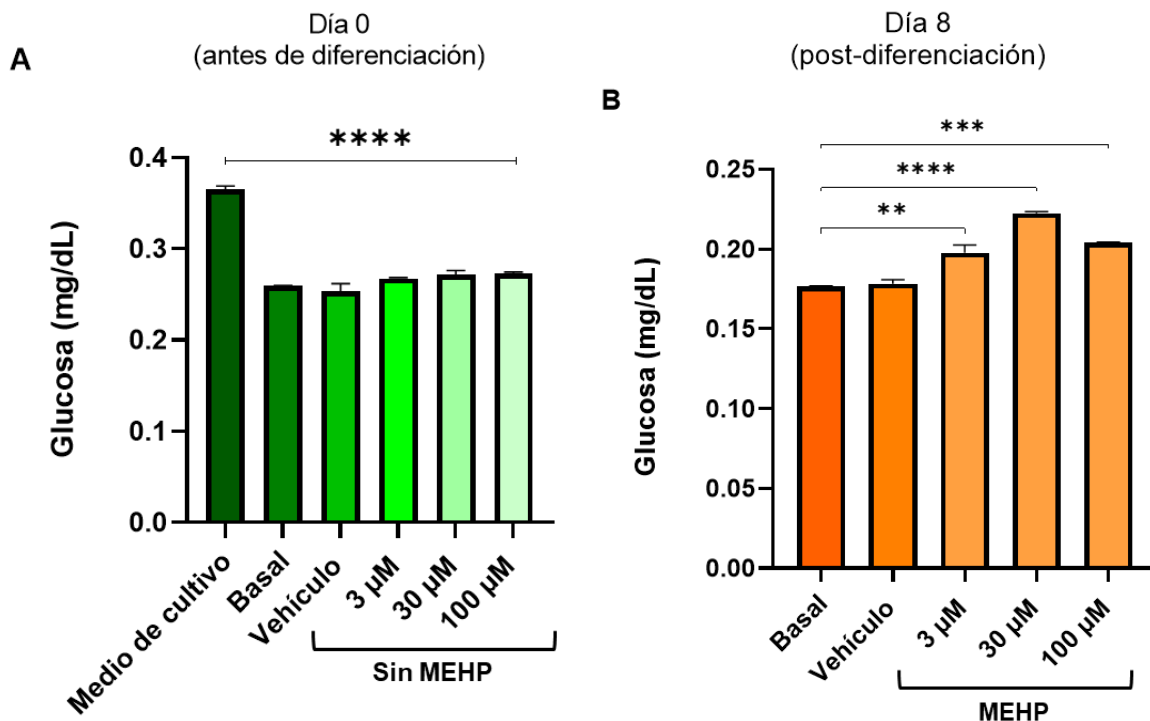


**Figura 11. Efecto del tratamiento con MEHP en la expresión de PPAR $\gamma$  en células 3T3.L1.** Expresión relativa de PPAR $\gamma$  a los 7 días (A) y 14 días (B). Los niveles de expresión de ARNm de PPAR $\gamma$ 2 se determinaron mediante PCR punto final y fueron normalizados con  $\beta$ -actina. Los datos representan los valores densitométricos relativos de la media  $\pm$  DE, \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  realizados por duplicado.

En las células tratadas con MEHP a los 7 días de diferenciación se observa un cambio en la expresión en los tratamientos con 30  $\mu$ M y 100  $\mu$ M de MEHP con un mayor efecto dependiente de la dosis. Por otro lado, en el periodo de 15 días post-diferenciación el cambio se observa únicamente bajo una concentración de 3  $\mu$ M de MEHP.

## 7.2 Efecto del tratamiento con MEHP en la captura de glucosa.

Para evaluar los efectos sobre la captura de glucosa en los adipocitos generado por la exposición a MEHP, se realizó un análisis del medio de cultivo mediante espectrofotometría a los 0 y 8 días de diferenciación (**Figura 12**).



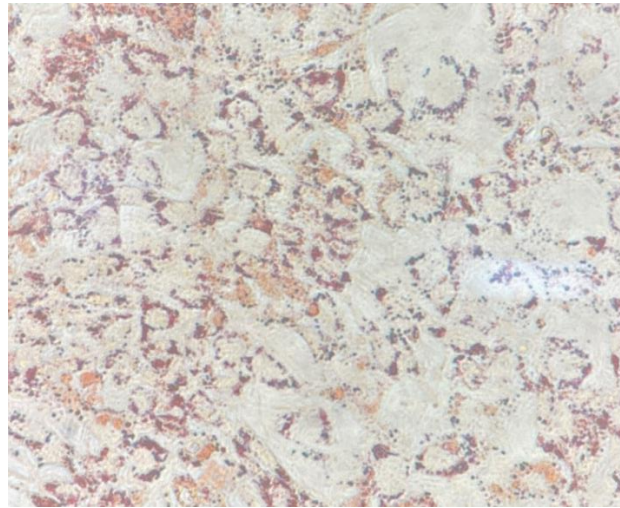
**Figura 12. Concentración de glucosa en medio de cultivo de células 3T3-L1 tratadas con MEHP.** Efecto sobre la concentración de glucosa en el medio al día 0 previo a la diferenciación (A), 8 días post-diferenciación (B). Los datos se presentan como media  $\pm$  DE. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Se analizaron los datos mediante Anova de 1 vía acoplado a una prueba de Tukey.

Previo al proceso de diferenciación (0 días) se observa que los niveles de glucosa presentes en el medio no presentan cambios ni diferencias entre los grupos. Al iniciar el proceso de diferenciación se observa un cambio significativo en los niveles de glucosa en el medio entre los grupos tratados con MEHP comparados con el vehículo y el grupo basal, a los 8 días post-diferenciación. El tratamiento con MEHP favorece una mayor concentración de glucosa en el medio, siendo el mayor efecto con la dosis de 30  $\mu\text{M}$  comparado con los tratamientos de 3  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ .

### 7.3 Efecto del tratamiento con MEHP en la acumulación de lípidos en adipocitos maduros.



Se muestra una microfotografía de los adipocitos maduros teñidos con la técnica de rojo oleoso (ORO), la cual nos permitió observar la presencia de la gota lipídica en las células (**Figura 13**). Las células presentaron una morfología de adipocitos completamente diferenciado: forma circular, crecimiento del citoplasma y acumulación de grasa en su interior.



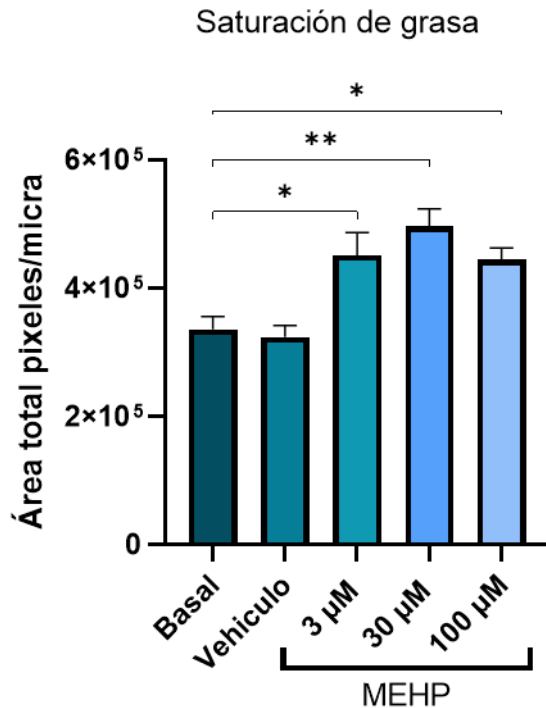
**Figura 13. Microfotografía de adipocitos maduros teñidos con la técnica ORO.** Se observan los lóculos de grasa en la periferia celular y la porción media de la célula donde se concentran los organelos celulares.

Una vez que se observaron los grupos completamente en el microscopio, las imágenes digitalizadas fueron evaluadas con la herramienta ImageJ® para determinar los siguientes parámetros: saturación de grasa total, saturación de grasa por célula y diámetro del lóculo.

### 7.3.1 Efecto del tratamiento con MEHP en la saturación de grasa.

La saturación de grasa se realizó mediante una cuantificación del área de color rojo ORO, para determinar la intensidad de la coloración en los lóculos de grasa. Se analizaron diez campos por cada imagen y se promediaron los datos obtenidos de cada grupo. Los datos obtenidos de saturación de grasa muestran una diferencia significativa entre los grupos de tratamiento de 3  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  contra los grupos basal y vehículo, lo que indica un aumento en la acumulación de lípidos en la vacuola lipídica de los adipocitos, y no se

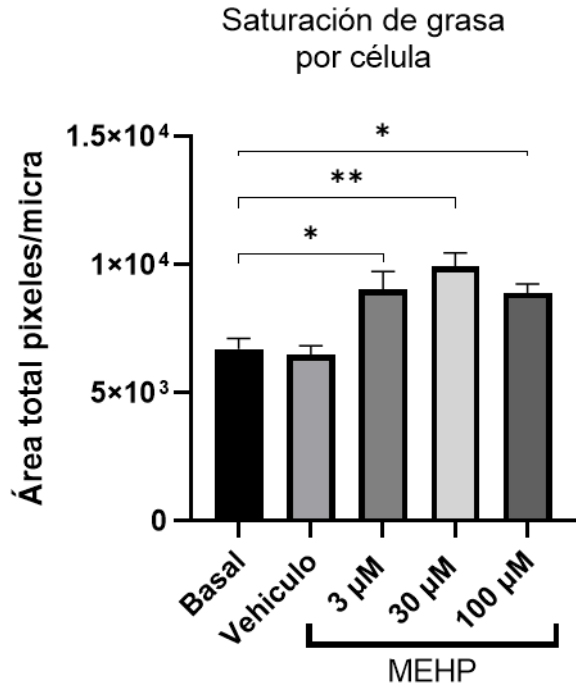
observa diferencia entre los grupos basal y vehículo (**Figura 14**). Este resultado indica que se presentó un aumento en el contenido de lípidos en aquellos adipocitos expuestos a MEHP.



**Figura 14. Saturación de grasa total en la gota lipídica en adipocitos maduros.** Se evaluó la saturación de grasa celular en adipocitos tratados con MEHP durante 15 días post-diferenciación. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Se analizaron los datos mediante Anova de 1 vía acoplado a una prueba de Tukey.

### 7.3.2 Efecto del tratamiento con MEHP en la saturación de grasa por célula.

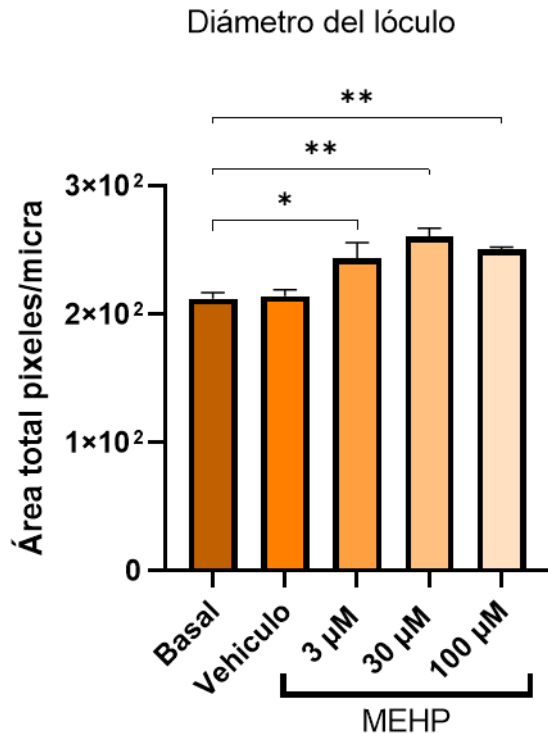
Posteriormente se llevó a cabo un análisis de la saturación de grasa por superficie celular para determinar si existía una relación entre el tamaño de la célula con la saturación de grasa en las mismas. Para este análisis se cuantificó la grasa en cada célula de manera individual contando cinco células por campo de cada grupo experimental. Se observó que en aquellos grupos expuestos a MEHP el contenido de lípidos es significativamente mayor comparado con los grupos control y vehículo (**Figura 15**).



**Figura 15. Saturación de grasa por célula.** Se observó la saturación de grasa celular de manera individual en adipocitos tratados con MEHP durante 15 días post-diferenciación. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Se analizaron los datos mediante Anova de 1 vía acoplado a una prueba de Tukey.

### 7.3.3 Efecto del tratamiento con MEHP en el diámetro de la gota lipídica.

Para definir el efecto en las gotas lipídicas se analizaron los tamaños de los lóculos de grasa presentes en las células. Los datos se obtuvieron con el software ImageJ mediante el análisis de diez campos para obtener un promedio del diámetro de cada muestra (**Figura 16**).



**Figura 16. Diámetro del lóculo en adipocitos maduros.** Análisis del diámetro de la gota lipídica en adipocitos tratados con MEHP durante 15 días post-diferenciación. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Se analizaron los datos mediante Anova de 1 vía acoplado a una prueba de Tukey.

Como se puede observar el diámetro de la gota lipídica se encuentra aumentado en aquellos grupos expuestos al disruptor, lo que se sugiere que el MEHP genera un cambio en el metabolismo energético de la célula favoreciendo la hipertrofia de la misma. De acuerdo a lo observado, podría existir una correlación entre la acumulación de grasa y el tamaño de la gota lipídica, siendo mayor en los grupos sometidos al tratamiento con el disruptor.

Respecto a los resultados del análisis de metilación, se realizó el envío de los productos de amplificación de la región promotora del ADN de los grupos experimentales y en breve se obtendrán los resultados. En cuanto a la cuantificación de triglicéridos, se optó por priorizar el análisis mediante tinción ORO para determinar cambios en el contenido de ácidos grasos y posteriormente realizar la cuantificación de triglicéridos.

## 8. DISCUSIÓN

A la fecha existe evidencia científica sobre los efectos obesogénicos del MEHP al inducir alteraciones del metabolismo, desarrollo y mantenimiento del tejido adiposo. El MEHP es el metabolito principal del DEHP, empleado generalmente en los plásticos, productos de cosmética, juguetes, lubricantes, entre otros. Se ha observado que MEHP es capaz de unirse al sitio de unión del ligando de PPAR $\gamma$  de manera específica a partir de dosis de 6.25  $\mu$ M (Kratochvil *et al.*, 2019). Sabiendo que PPAR $\gamma$  puede inducir cambios en la regulación de proceso como la adipogénesis y metabolismo energético en el tejido adiposo, el análisis de los efectos de los disruptores y su asociación con la obesidad cobra gran relevancia.

En nuestro estudio evaluamos el efecto de la exposición a dosis ambientalmente relevantes de MEHP sobre la acumulación de lípidos, consumo de glucosa y cambios en la metilación del gen PPAR $\gamma$ , durante el proceso de diferenciación de los adipocitos utilizando un modelo de células 3T3-L1. Nuestros resultados muestran un cambio significativo en la expresión de PPAR $\gamma$  en los tiempos de exposición de 7 días en las concentración de 30  $\mu$ M y 100  $\mu$ M y durante un periodo de 14 días post-diferenciación observamos que a una concentración de 3  $\mu$ M existen cambios significativos, lo observado se compara con resultados obtenidos en otros estudios previos, donde se ha demostrado que MEHP en combinación con insulina induce la diferenciación de los adipocitos 3T3-L1, aumentando la expresión de marcadores adipogénicos principalmente de PPAR $\gamma$ , de acuerdo con la dosis empleada en rangos de 1-100  $\mu$ M, impulsando la diferenciación de adipocitos y la acumulación de lípidos (Hao *et al.*, 2012).

También se ha observado que la exposición a 3, 10, 30, 100 y 200  $\mu$ M MEHP aumenta la expresión de PPAR $\gamma$  de ratón y humanos en células 3T3-L1 (Chiang *et al.*, 2016). Siendo que a concentraciones de MEHP  $\geq$ 30  $\mu$ M se observó la mayor inducción de PPAR $\gamma$  murino, y a  $\geq$ 10  $\mu$ M MEHP se observó la mayor expresión de PPAR $\gamma$  humano.

Por otra parte, la exposición a MEHP afectó los niveles de glucosa presentes en el medio de cultivo aumentándolo en aquellas células que fueron expuestas al disruptor, sugiriendo un cambio en la actividad de transporte de glucosa en estas células. Estos resultados se pueden relacionar con el cambio de expresión en PPAR $\gamma$  que se observa en las células expuestas ya que se tiene evidencia que este puede reprimir la actividad del promotor de GLUT4 (Armoni *et al.*, 2003) lo que podría explicar el cambio en la actividad de captura de glucosa por la célula.

La proteína GLUT4 es responsable del transporte de glucosa en el tejido adiposo y su desregulación podría implicar modificaciones generando cambios tanto en la velocidad como en la concentración de glucosa que capta la célula, lo que podría explicar el efecto observado en nuestros experimentos. De esta manera en conjunto a los resultados obtenidos podemos sugerir que la exposición a MEHP regula la actividad de PPAR $\gamma$  modificando la expresión de GLUT4 y los niveles de glucosa que ingresan a la célula.

Asimismo, se ha observado que dosis de 30 y 300  $\mu$ M de MEHP aumentan la actividad de captación de glucosa hasta 1.4 y 2.77 veces, respectivamente (Chiang *et al.*, 2014). En dichos estudios la exposición al disruptor comenzó al día 7 días post-diferenciación mientras que en los experimentos que realizamos la exposición se realizó durante el inicio del periodo de diferenciación por un tiempo de 8 días, curiosamente en estos estudios donde la exposición se realizó en un periodo post-diferenciación el comportamiento de la actividad de captación de glucosa parece estar relacionado con la ventana de exposición, generando un cambio metabólico en donde la célula pareciera que requiere altas cantidades de glucosa para cumplir con la demanda energética, mientras que en nuestros experimentos la ventana de exposición se realizó desde el comienzo de la diferenciación y mostró una disminución en la captación de glucosa, lo que sugiere que el efecto del disruptor dependerá no solo de la dosis sino del periodo de tiempo en el que se genere la exposición.

Finalmente, los datos mostrados en el análisis de lípidos mostraron diferencias significativas entre el diámetro de los lóculos de grasa de los grupos basal y vehículo en comparación con los grupos de 3  $\mu$ M, 30  $\mu$ M y 100  $\mu$ M, presentando un aumento en el

tamaño de las células tratadas con el disruptor. Experimentos previos, muestran que el MEHP induce la diferenciación de los adipocitos dependiendo de la dosis, estimulando el proceso de acumulación de lípidos dentro de la célula, cuando estos se exponen previo al inicio de la diferenciación (Hao *et al.*, 2012), a su vez se ha encontrado evidencia de cambios en los adipocitos 3T3-L1 tratados con MEHP durante periodos de tiempo en los días 7 al 11 trascurrido el proceso de diferenciación donde se encontró un aumento en la actividad del procesos de lipólisis (Chiang *et al.*, 2014) y un efecto de hiperplasia en estas gotas lipídicas. Si bien la evidencia muestra que existe un efecto sobre la acumulación de lípidos por la exposición a MEHP, dichos efectos no se han caracterizado en un periodo en donde la exposición ocurra durante la diferenciación y maduración del adipocito, por lo que en nuestros experimentos aportan que bajo dicha condición también se modifica la acumulación de triglicéridos y se induce un aumento en el tamaño de la gota lipídica, sugiriendo que el MEHP altera la adipogénesis temprana y tardía.

Un posible mecanismo que explique los efectos en la expresión de PPAR $\gamma$  generados por la exposición a MEHP que se observaron en nuestros experimentos es la metilación del promotor de este gen, lo que se ha demostrado en experimentos previos (Fujiki *et al.*, 2009) donde se evaluó el efecto sobre la expresión del gen PPAR $\gamma$  mediado por metilación de su promotor y se encontró que al presentar una mayor metilación los niveles de expresión se ven reducidos, generando un efecto sobre la actividad reguladora en procesos como la adipogénesis. De esta manera podríamos sugerir que el MEHP actúa directamente en la regulación de la metilación de PPAR $\gamma$  lo que podría explicar los cambios observados en nuestros experimentos.

Sin embargo, una limitación de nuestro estudio es que no pudimos contar con el tiempo para interpretar adecuadamente los resultados que se enviaron para la secuenciación y evaluar las metilaciones y aún no hemos probado si la expresión del gen PPAR $\gamma$  está bajo el control de la metilación del promotor. Se realizaron análisis mediante western Blot para la expresión de GLUT4 en los grupos a los 0 días (resultados no mostrados) y se observó la presencia del transportador, por lo que sería interesante realizar el análisis a los 8 días post-diferenciación para observar el comportamiento de la proteína tras la

exposición al disruptor. También la limitante de nuestro modelo experimental nos lleva a plantear un posible modelo *in vivo* en el que se pueda comprender y analizar de mejor manera las posibles consecuencias a largo plazo de la exposición a MEHP sobre la obesidad y los trastornos relacionados con esta.

Por lo tanto, nuestra investigación muestra un posible efecto del MEHP en la expresión de genes maestros como el PPAR $\gamma$  favoreciendo así la adipogénesis y modificando tanto la captación de glucosa como la acumulación de lípidos en la célula mediado por las posibles modificaciones epigenéticas como la metilación en el gen PPAR $\gamma$ , y de esta manera, podría participar directamente en el desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad. Sin embargo, los efectos sobre otras vías independientes de PPAR como la actividad del receptor de insulina, la actividad de la lipoproteína lipasa, la leptina, entre otros, podrían ser posibles mecanismos de acción del MEHP y podrían ser evaluados mas adelante.

Nuestros resultados muestran un panorama de la importancia del estudio de los disruptores endocrinos en materia de salud pública mundial, pero principalmente en nuestro país, donde se carece de regulación sobre ello. Aunado a esto, ya que la exposición a MEHP ocurre de manera ambiental y constante, es necesario realizar estudios que nos permitan comprender las consecuencias de la exposición a dicho disruptor, empleando modelos *in vivo* y/o estudios epidemiológicos que nos permitan relacionar sus posibles efectos en el desarrollo de obesidad y los trastornos relacionados con la misma.

## **9. CONCLUSIÓN**

La exposición a distintas dosis ambientalmente relevantes de MEHP (3  $\mu$ M, 30  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) estimula la expresión del PPAR $\gamma$  en células 3T3-L1 en diferentes tiempos del proceso de diferenciación, generando un aumento en la acumulación de triglicéridos y en el diámetro de lóculos de las células 3T3-L1, en conjunto con una reducción en actividad de captación de glucosa en el medio de cultivo celular durante el proceso de adipogénesis.



## 10. REFERENCIAS

- 1) Abel, E. D., Peroni, O., Kim, J. K., Kim, Y. B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G. I., & Kahn, B. B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, 409(6821), 729–733.
- 2) Agricultor SR (2006). Control transcripcional de la formación de adipocitos. *Metabolismo celular*, 4 (4), 263–273.
- 3) Ambele, M. A., Dhanraj, P., Giles, R., & Pepper, M. S. (2020). Adipogenesis: A Complex Interplay of Multiple Molecular Determinants and Pathways. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4283.
- 4) Arias, P. (2020). DISRUPTORES ENDOCRINOS, OBESIDAD Y DIABETES MELLITUS. *Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes*, 53(2Sup), 6.
- 5) Armoni, M., Kritz, N., Harel, C., Bar-Yoseph, F., Chen, H., Quon, M. J. & Karnieli, E. (2003). Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\gamma$  Represses GLUT4 Promoter Activity in Primary Adipocytes, and Rosiglitazone Alleviates This Effect. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 30614-30623.
- 6) Armoni, M., Kritz, N., Harel, C., Bar-Yoseph, F., Chen, H., Quon, M. J., & Karnieli, E. (2003). Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\gamma$  Represses GLUT4 Promoter Activity in Primary Adipocytes, and Rosiglitazone Alleviates This Effect. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 30614–30623.
- 7) Baillie-Hamilton P. F. (2002). Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)*, 8(2), 185–192.

- 8) Balaguer, P., Delfosse, V., & Bourguet, W. (2019). Mechanisms of endocrine disruption through nuclear receptors and related pathways. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 7, 1–8.
- 9) Benton, M. C., Johnstone, A., Eccles, D., Harmon, B., Hayes, M. T., Lea, R. A., Griffiths, L., Hoffman, E. P., Stubbs, R. S., & Macartney-Coxson, D. (2015). An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome biology*, 16(1), 8.
- 10) Bility, M. T. (2004). Activation of Mouse and Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) by Phthalate Monoesters. *Toxicological Sciences*, 82(1), 170–182.
- 11) Buckley, JP, Engel, SM, Mendez, MA, Richardson, DB, Daniels, JL, Calafat, AM, Wolff, MS y Herring, AH (2016). Exposiciones prenatales a ftalatos y masa grasa infantil en una cohorte de la ciudad de Nueva York. *Perspectivas de salud ambiental* , 124 (4), 507–513.
- 12) Calderón Velasco, R. (2018). La acción oculta de los disruptores endocrinos. *Diagnóstico*, 56(3), 162.
- 13) Carranza, J. A. S. (2021). Los disruptores endocrinos: un problema creciente pero desconocido para la mayoría de los sanitarios. *FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, 28(3), 143–150.
- 14) Cheang, W. S., Tian, X. Y., Wong, W. T., & Huang, Y. (2015). The peroxisome proliferator-activated receptors in cardiovascular diseases: experimental benefits and clinical challenges. *British journal of pharmacology*, 172(23), 5512–5522.

- 15) Chiang, H. C., Kuo, Y. T., Shen, C. C., Lin, Y. H., Wang, S. L. & Tsou, T. C. (2014). Mono(2-ethylhexyl)phthalate accumulation disturbs energy metabolism of fat cells. *Archives of Toxicology*, 90(3), 589-601.
- 16) Cimmino, I., Fiory, F., Perruolo, G., Miele, C., Beguinot, F., Formisano, P. y Oriente, F. (2020). Mecanismos potenciales del bisfenol A (BPA) que contribuyen a la enfermedad humana. *Revista internacional de ciencias moleculares*, 21 (16), 5761.
- 17) Darbre P. D. (2017). Endocrine Disruptors and Obesity. *Current obesity reports*, 6(1), 18–27.
- 18) Encarnação, T., País, A. A., Campos, M. G., & Burrows, H. D. (2019). Endocrine disrupting chemicals: Impact on human health, wildlife and the environment. *Science Progress*, 3–42.
- 19) Esteve Ràfols, M. (2014). Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinología y Nutrición*, 61(2), 100–112.
- 20) Feige, J. N., Gelman, L., Rossi, D., Zoete, V., Métivier, R., Tudor, C., Anghel, S. I., Grosdidier, A., Lathion, C., Engelborghs, Y., Michielin, O., Wahli, W., & Desvergne, B. (2007). The Endocrine Disruptor Monoethyl-hexyl-phthalate Is a Selective Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Modulator That Promotes Adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(26), 19152–19166.
- 21) Fujiki, K., Kano, F., Shiota, K., & Murata, M. (2009). Expression of the peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. *BMC Biology*, 7(1).

- 22) García-Mayor, R. V., Larrañaga Vidal, A., Docet Caamaño, M. F., & Lafuente Giménez, A. (2012). Disruptores endocrinos y obesidad: obesógenos. *Endocrinología y Nutrición*, 59(4), 261–267.
- 23) Gupta, R., Kumar, P., Fahmi, N., Garg, B., Dutta, S., Sachar, S., Matharu, AS y Vimalaswaran, KS (2020). Disrupción endocrina y obesidad: una revisión actual sobre obesógenos ambientales. *Investigación actual en química verde y sostenible*, 3 , 100009.
- 24) Haczeyni, F., Bell-Anderson, K. S., & Farrell, G. C. (2018). Causes and mechanisms of adipocyte enlargement and adipose expansion. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 19(3), 406–420.
- 25) 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(6), 619-629.
- 26) Heindel, J. J., Newbold, R., & Schug, T. T. (2015). Endocrine disruptors and obesity. *Nature reviews. Endocrinology*, 11(11), 653–661.
- 27) Holtcamp W. (2012). Obesógenos: un vínculo ambiental con la obesidad. *Perspectivas de salud ambiental* , 120 (2), a62 – a68.
- 28) Hurst, C. H., & Waxman, D. J. (2003). Activation of PPAR and PPAR by Environmental Phthalate Monoesters. *Toxicological Sciences*, 74(2), 297–308.
- 29) Janani, C., & Ranjitha Kumari, B. D. (2015). PPAR gamma gene--a review. *Diabetes & metabolic syndrome*, 9(1), 46–50.

- 30) Janesick, A., & Blumberg, B. (2011). Minireview: PPAR $\gamma$  as the target of obesogens. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 127(1-2), 4–8.
- 31) Kalo, D., & Roth, Z. (2017). Low level of mono(2-ethylhexyl) phthalate reduces oocyte developmental competence in association with impaired gene expression. *Toxicology*, 377, 38–48.
- 32) Kalo, D., Vitorino Carvalho, A., Archilla, C., Duranthon, V., Moroldo, M., Levin, Y., Kupervaser, M., Smith, Y., & Roth, Z. (2019). Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) induces transcriptomic alterations in oocytes and their derived blastocysts. *Toxicology*, 421, 59–73.
- 33) Kassotis, C. D., & Stapleton, H. M. (2019). Endocrine-Mediated Mechanisms of Metabolic Disruption and New Approaches to Examine the Public Health Threat. *Frontiers in endocrinology*, 10, 39.
- 34) Kim, SH y Park, MJ (2014). Exposición a ftalatos y obesidad infantil. *Annals of pediatric endocrinology & metabolism*, 19 (2), 69–75.
- 35) Klötting, N., Hesselbarth, N., Gericke, M., Kunath, A., Biemann, R., Chakaroun, R., Kosacka, J., Kovacs, P., Kern, M., Stumvoll, M., Fischer, B., Rolle-Kampczyk, U., Feltens, R., Otto, W., Wissenbach, D. K., von Bergen, M., & Blüher, M. (2015). Di-(2-Ethylhexyl)-Phthalate (DEHP) Causes Impaired Adipocyte Function and Alters Serum Metabolites. *PLOS ONE*, 10(12), e0143190.
- 36) Kratochvil, I., Hofmann, T., Rother, S., Schlichting, R., Moretti, R., Scharnweber, D., Hintze, V., Escher, BI, Meiler, J., Kalkhof, S. y von Bergen, M. (2019). El mono (2-etilhexil) ftalato (MEHP) y el mono (2-etil-5-oxohexil) ftalato (MEOHP), pero no el di (2-etilhexil) ftalato (DEHP), se unen productivamente al receptor y activado

- por el proliferador de peroxisomas. Comunicaciones rápidas en espectrometría de masas: RCM , 33 Suppl 1 (Suppl 1), 75–85.
- 37) Kroker, A. J., & Bruning, J. B. (2015). Review of the Structural and Dynamic Mechanisms of PPAR $\gamma$  Partial Agonism. *PPAR Research*, 2015, 1–15.
- 38) Lee, J. E., & Ge, K. (2014). Transcriptional and epigenetic regulation of PPAR $\gamma$  expression during adipogenesis. *Cell & Bioscience*, 4(1), 29.
- 39) Leonardini, A., Laviola, L., Perrini, S., Natalicchio, A., & Giorgino, F. (2009). Cross-Talk between PPAR $\gamma$  and Insulin Signaling and Modulation of Insulin Sensitivity. *PPAR Research*, 2009, 1–12.
- 40) Lowe, C. E., O'Rahilly, S., & Rochford, J. J. (2011). Adipogenesis at a glance. *Journal of cell science*, 124(Pt 16), 2681–2686.
- 41) Ma, X., Wang, D., Zhao, W., & Xu, L. (2018). Deciphering the Roles of PPAR $\gamma$  in Adipocytes via Dynamic Change of Transcription Complex. *Frontiers in Endocrinology*, 9.
- 42) Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK (2013) Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. *PLOS ONE* 8(1): e55387.
- 43) Martinelli, M. I., Mocchiutti, N. O., & Bernal, C. A. (2010). Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on lipolysis and lipoprotein lipase activities in adipose tissue of rats. *Human & experimental toxicology*, 29(9), 739–745.
- 44) Monneret, C. (2017). What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus Biologies*, 340(9 10), 403–405.

- 45) Murawska-Ciałowicz E. (2017). Adipose tissue - morphological and biochemical characteristic of different depots. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej* (Online), 71(0), 466–484.
- 46) Ntambi, J. M., & Young-Cheul, K. (2000). Adipocyte Differentiation and Gene Expression. *The Journal of Nutrition*, 130(12), 3122S-3126S.
- 47) Rosen, E. D., & MacDougald, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(12), 885–896.
- 48) Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2001). PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *The Journal of biological chemistry*, 276(41), 37731–37734.
- 49) Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M., & Mortensen, R. M. (1999). PPAR $\gamma$  Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro. *Molecular Cell*, 4(4), 611–617.
- 50) Schmidt, J. S., Schaedlich, K., Fiandanese, N., Pocar, P., & Fischer, B. (2012). Effects of Di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) on Female Fertility and Adipogenesis in C3H/N Mice. *Environmental Health Perspectives*, 120(8), 1123–1129.
- 51) Sen, C. K. (2014). *MicroRNA in Regenerative Medicine* (English Edition). In Chapter 21 - Adipogenesis and Obesity (1.a ed., pp. 539–565). Academic Press.
- 52) Sheikh, I. A., Abu-Elmagd, M., Turki, R. F., Damanhour, G. A., Beg, M. A., & Al-Qahtani, M. (2016). Endocrine disruption: In silico perspectives of interactions of di-(2-ethylhexyl)phthalate and its five major metabolites with progesterone receptor. *BMC structural biology*, 16(Suppl 1), 16.

- 53) Song, T., & Kuang, S. (2019). Adipocyte dedifferentiation in health and diseases. *Clinical science (London, England : 1979)*, 133(20), 2107–2119.
- 54) Uauy D, R., Martínez A, J. I., & Rojas B, C. V. (2000). Nutrición molecular, papel del sistema PPAR en el metabolismo lipídico y su importancia en obesidad y diabetes mellitus: regulation of lipid metabolism by peroxisome proliferator activated receptors (PPAR). Their relationship to obesity and diabetes mellitus. *Revista médica de Chile*, 128(4).
- 55) Uppenberg, J., Svensson, C., Jaki, M., Bertilsson, G., Jendeberg, L., & Berkenstam, A. (1998). Crystal Structure of the Ligand Binding Domain of the Human Nuclear Receptor PPAR $\gamma$ . *Journal of Biological Chemistry*, 273(47), 31108–31112.
- 56) W.O.F. (2021, 9 junio). Obesity and overweight. <https://www.who.int/>.
- 57) Wang, S., Dougherty, EJ y Danner, RL (2016). Señalización de PPAR $\gamma$  y oportunidades emergentes para mejorar la terapéutica. *Investigación farmacológica* , 111 , 76–85.
- 58) Wassenaar, P., & Legler, J. (2017). Systematic review and meta-analysis of early life exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and obesity related outcomes in rodents. *Chemosphere*, 188, 174–181.
- 59) Wu, Z., Xie, Y., Morrison, R. F., Bucher, N. L., & Farmer, S. R. (1998). PPAR $\gamma$  induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBP $\alpha$  during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 101(1), 22–32.



- 60) Xie, Y., Yang, Q., Nelson, B. D., & DePierre, J. W. (2002). Characterization of the adipose tissue atrophy induced by peroxisome proliferators in mice. *Lipids*, 37(2), 139–146.
- 61) Xu, Q., Qi, W., Zhang, Y., Wang, Q., Ding, S., Han, X., Zhao, Y., Song, X., Zhao, T., Zhou, L., & Ye, L. (2020). DNA methylation of JAK3/STAT5/PPAR $\gamma$  regulated the changes of lipid levels induced by di (2-ethylhexyl) phthalate and high-fat diet in adolescent rats. *Environmental science and pollution research international*, 27(24), 30232–30242.
- 62) Zhang, Y., Wang, S., Zhao, T., Yang, L., Guo, S., Shi, Y., Zhang, X., Zhou, L., & Ye, L. (2019). Mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) promoted lipid accumulation via JAK2/STAT5 and aggravated oxidative stress in BRL-3A cells. *Ecotoxicology and environmental safety*, 184, 109611.
- 63) Zhang, Y., Zhou, L., Zhang, Z., Xu, Q., Han, X., Zhao, Y., Song, X., Zhao, T., & Ye, L. (2020). Effects of di (2-ethylhexyl) phthalate and high-fat diet on lipid metabolism in rats by JAK2/STAT5. *Environmental science and pollution research international*, 27(4), 3837–3848.
- 64) Zhao, H. Y. (2019). Occurrence of Phthalate Monoesters in Environment: A Mini-Review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 233, 042005.
- 65) Zhou, L., Chen, H., Xu, Q., Han, X., Zhao, Y., Song, X., Zhao, T., & Ye, L. (2019). The effect of di-2-ethylhexyl phthalate on inflammation and lipid metabolic disorder in rats. *Ecotoxicology and environmental safety*, 170, 391–398.
- 66) Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, JR, Chen, XN, Noya, D., Rao, MS y Reddy, JK (1995). Organización estructural del gen del receptor gamma activado por el proliferador

de peroxisoma de ratón (mPPAR gamma): el uso de promotores alternativos y el empalme diferente producen dos isoformas de mPPAR gamma. Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América, 92 (17), 7921–7925.

## 11. ANEXOS

### 11.1 Composición de medios de cultivo.

- Medio de cultivo de proliferación (fibroblastos):

Medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

- Medio de cultivo de sincronización (fibroblastos):

Medio DMEM suplementado con 3% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

- Medio de cultivo de mantenimiento (preadipocitos y adipocitos):

Medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

- Medio de diferenciación 1 (MD1)

Medio de cultivo de mantenimiento al que se le añaden 5 µg/ml de insulina, 0,5 mM de IBMX y 0,25 µM de dexametasona.

- Medio de diferenciación 2 (MD2)

Medio de cultivo de mantenimiento al que se le añaden 5 µg/ml de insulina.

## 11.2 Constancias y participaciones en foros y congresos.



Otorga la presente

### CONSTANCIA

A: LUIS ENRIQUE GASCA PESTAÑAS, HERNÁNDEZ-PUGA ANA GABRIELA, PÉREZ-SERRANO ROSA MARTHA, VERGARA-CASTAÑEDA HAYDÉ AZENETH, RODRIGUEZ-TORRES ANGELINA, GARCÍA-SOLÍS PABLO

Por haber obtenido el TERCER LUGAR en la presentación de su trabajo en modalidad ORAL, en la mesa de ENFERMEDADES CRÓNICAS en el 7mo Foro Estatal de Investigación en Salud 2022, con título:


"LA EXPOSICIÓN A MONO-2-ETILHEXIL-FTALATO MODIFICA LA CAPTURA DE GLUCOSA, ACUMULACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS Y EXPRESIÓN DE PPAR-GAMMA EN ADIPOCITOS"

Realizado vía web  
31 de Agosto, 1 y 2 de septiembre  
(8 horas)



Dr. Jesús Enrique Espinoza Palomo  
Subdirector de Enseñanza, SESEQ

066-SE/FEIS-0102022




### PEQUES EN LA CIENCIA


### RECONOCIMIENTO

a: Luis Enrique Gasca Pestañas

Por su valiosa participación como INSTRUCTOR en el taller "PEQUES EN LA CIENCIA" actividad de divulgación científica del rubro Promoción de la Ciencia en Etapas Tempranas y Acceso Universal al Conocimiento Científico realizada el 29 de abril del 2022 dentro del programa CIENTIFIQUEMOS MÉXICO con una duración de 3 hrs en formato virtual dirigida a estudiantes de preescolar y primaria.



Dra. Guadalupe Maldonado  
Directora de la Facultad de Medicina



Dra. Rosa Mirella Pérez-Serrano  
Coordinadora del Departamento de Educación Continua



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina  
Maestría en Ciencias en Neurometabolismo  
Maestría y Doctorado en Ciencias en Biomedicina  
Seminario de Investigación 2021-1

Otorga la presente constancia a Luis Enrique Gasca Pestaña, alumno de la Maestría en Ciencias en Biomedicina, quien presentó el seminario titulado "Efecto de la exposición a Mono-2-ethylhexyl-ftalato (MEPH) en la captura de glucosa, acumulación de triglicéridos y cambios en la metilación del gen PPAR $\gamma$  en adipocitos maduros" dirigido a los docentes y alumnos de los diferentes programas de posgrado pertenecientes a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Santiago de Querétaro, Qro., a 10 de febrero del 2021.

"Educo en la Verdad y en el Honor"



Dr. Hebert Luis Hernández Montiel  
Coordinador de la Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga  
Coordinadora de la Maestría en Ciencias en Biomedicina

Dr. Pablo García Solís  
Coordinador del Doctorado en Ciencias en Biomedicina

Dr. Nicolás Camacho  
Jefatura de Investigación y Posgrado



SE OTORGA EL SIGUIENTE

### RECONOCIMIENTO

AL:

### I.B.T. Luis Enrique Gasca Pestañas

Por su participación en el cuarto "Bioviermes" y el haber impartido la ponencia "Disruptores endocrinos: un problema para la salud y su perspectiva desde la biomedicina" misma que se llevó a cabo de manera virtual el 20 de agosto de 2021.



Dra. Vanessa Vallejo Becerra  
COORDINADORA DEL PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA, UAQ



Samantha Ramirez  
PRESIDENTA DEL CAPITULO ESTUDIANTIL SOMIB UAQ



Iris Alejandra Benavides Paredes  
VICIPRESIDENTA DEL CAPITULO ESTUDIANTIL SOMIB UAQ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE INGENIERÍA



Maestría en Química Clínica Diagnóstica  
 Maestría y Doctorado en Ciencias en Biomedicina  
 Especialidad en Bioquímica Clínica  
 Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

Universidad Autónoma de Querétaro  
 Facultad de Medicina y Facultad de Química  
 Otorgan el presente

## RECONOCIMIENTO

A:

LUIS ENRIQUE GASCA-PESTAÑAS, PABLO GARCÍA-SOLÍS, ROSA MARTHA PÉREZ-SERRANO, HAYDÉ AZENETH VERGARA-CASTANEDA, ANGELINA RODRIGUEZ TORRES, ANA GABRIELA HERNANDEZ-PUGA

Por su destacada participación con el trabajo titulado

**Efecto en la captura de glucosa, acumulación de triglicéridos y cambios en la metilación del gen PPAR por la exposición a mono-2-etilhexil-ftalato (MEHP) en adipocitos maduros**

Presentado en el Segundo Coloquio en Ciencias Bio-médicas y Diagnóstico Molecular. Realizado en Querétaro, Qro. el 5 y 6 de Mayo del 2022.

*Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea*  
 Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea  
 Directora de la Facultad de Medicina

*Silvia Lorena Amaya Utrero*  
 Dra. Silvia Lorena Amaya Utrero  
 Directora de la Facultad de Química

*Joana*  
 Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Pita  
 Directora de la Secretaría de Investigación, Innovación y Posgrado

FOLIO:  
 00000100000000000000




Maestría en Química Clínica Diagnóstica  
 Maestría y Doctorado en Ciencias en Biomedicina  
 Especialidad en Bioquímica Clínica  
 Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

Universidad Autónoma de Querétaro  
 Facultad de Medicina y Facultad de Química  
 Otorgan el presente

## RECONOCIMIENTO

A:

LUIS ENRIQUE GASCA PESTAÑAS

Por su participación como ASISTENTE en el Segundo Coloquio en Ciencias Bio-médicas y Diagnóstico Molecular. Realizado en Querétaro, Qro. el 5 y 6 de Mayo del 2022.

*Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea*  
 Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea  
 Directora de la Facultad de Medicina

*Silvia Lorena Amaya Utrero*  
 Dra. Silvia Lorena Amaya Utrero  
 Directora de la Facultad de Química

*Joana*  
 Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Pita  
 Directora de la Secretaría de Investigación, Innovación y Posgrado

FOLIO:  
 00000100000000000000




Universidad Autónoma de Querétaro  
 Facultad de Medicina



Reconocimiento  
 a:

### Luis Enrique Gasca Pestañas

Director/a: Ana Gabriela Hernández Puga

Colaboradores: Fernando Manuel Guerrero Meza, Pablo García Solís, Rosa Martha Pérez Serrano

Por su valiosa participación en CARTEL DIGITAL/GALERÍA en el Foro de Investigación y Posgrado de la Facultad de Medicina 2021-1 del 12-17 de abril. Valor 20 hrs.

*Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea*  
 Dra. GUADALUPE ZALDÍVAR LELO DE LARREA  
 Directora

*Nicolás Camacho Calderón*  
 Dr. NICOLÁS CAMACHO CALDERÓN  
 Coordinador de Investigación y Posgrado

*Rosa Martha Pérez Serrano*  
 Dra. ROSA MARTHA PÉREZ-SERRANO  
 Coordinadora de Investigación de Posgrado