



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Químicas
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

*“EFECTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA DE CADMIO SOBRE EL TEJIDO
ADIPOSO CAFÉ EN RATAS WISTAR “*

Octubre del 2025

Tesis presentada para obtener el grado de: Licenciatura

pQFB. David Castillo Pérez

Lugar de realización:

Laboratorio de metabolómica y enfermedades crónico-
degenerativas

Instituto de Fisiología

Directores de tesis:

D.C. Samuel Treviño Mora

Asesor de tesis:

D.C. Víctor Enrique Sarmiento Ortega

Índice

Abreviaciones.....	4
1.- Introducción.....	6
2.- Marco teórico /antecedentes históricos	6
Cadmio.....	6
Exposición a Cadmio.....	7
Fuentes de Exposición Ambiental.....	7
Fuentes de Exposición Laboral	8
Grupos de riesgo	8
Dosis de mínimo riesgo	9
Absorción y distribución de cadmio dependientes de la vía de exposición.....	9
Toxicidad	10
Efectos tóxicos del cadmio en el tejido adiposo	11
Tejido Adiposo Café.....	13
Características y función del tejido adiposo café	14
Función Mitocondrial en el tejido adiposo café.....	16
Complejos mitocondriales.....	17
Complejos y Supercomplejos.....	17
3.- Planteamiento del problema.....	21
4.- Justificación.....	22
5.- Objetivos.....	23
General	23
Específicos.....	23
6.- Hipótesis	23
Nula.....	23
Alternativa	23
7.- Diagrama de trabajo.....	24
8.- Metodología.....	24
9.- Resultados.....	28
Discusión De Resultados.....	40
11.-Referencias.	51
12.-Anexos.	59

Anexo #1	59
Anexo #2	59
Anexo #3	60
Anexo #4	61
Anexo #5	62
Anexo #6	63
Anexo #7	63
Anexo #8	64
Anexo #9	64
Anexo #10	65
Anexo #11	66

Índice Esquemas

Esquema 1. Efectos metabólicos descritos por intoxicación de cadmio.	11
Esquema 2. Los tipos de adipocitos se describen mediante tonos de color.	12
Esquema 3. Efectos sobre la función del tejido adiposo mostrados por la exposición a cadmio.	13
Esquema 4. Activación del adiposo marrón en respuesta a estímulos simpáticos y hormona tiroidea.	15
Esquema 5. Los complejos del sistema de fosforilación oxidativa de la cadena transportadora de electrones mitocondrial.	18
Esquema 6. Representación esquemática de los diferentes modelos de ensamblaje de la cadena respiratoria mitocondrial.	19
Esquema 7. Dos posibles caminos para el ensamblaje del respirasoma.	19

Índice Figuras

Figura 1. Evaluación de los cambios Zoométricos.	28
Figura 2. Lípidos séricos.	30
Figura 3. Evaluación de hormonas relacionadas con la función adipocitaria.	31
Figura 4. Evaluación de los cambios morfológicos en el BAT.	33
Figura 5. Inmunofluorescencia del receptor activado por el proliferador peroxisomal alfa.	34
Figura 6. Inmunofluorescencia de receptor activado por el proliferador peroxisomal gamma.	35
Figura 7. Inmunofluorescencia para la proteína desacopladora 1 (UCP-1).	36
Figura 8. Efecto de la exposición a Cd sobre la actividad del complejo I y SC de la ETC mitocondrial en tejido adiposo marrón.	37
Figura 9. Efecto de la exposición a cadmio sobre la actividad del complejo IV y SC de la ETC mitocondrial en tejido adiposo marrón.	38
Figura 10. Resumen que describe las alteraciones metabólicas inducidas por la exposición crónica al cadmio, las cuales convergen en el adipocito marrón y favorecen su transición hacia un fenotipo similar al del adipocito blanco.	50

Abreviaciones

Acetil Coenzima A Carboxilasa (ACC- α)	Interleucina 6 (IL-6)
Ácido desoxirribonucleico (ADN)	Las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP1c)
Ácidos grasos libres (AGL)	Lipasa sensible a hormona (LSH)
Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades (ATSDR)	Lipoproteína de Alta Densidad (HDL)
Cadmio (Cd)	Lipoproteína de Baja Densidad (LDL)
Camp Response Element-Binding Protein (CREB)	Lipoproteína de Densidad Intermedia (IDL)
Cinasa de proteínas dependiente del AMP cíclico (PKA)	Lipoproteína de Muy Baja Densidad (VLDL)
Cloruro de cadmio (cdCl ₂)	Lipoproteína lipasa (LPL)
Del transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3),	Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR)
Diacilglicerol aciltransferasa 2 (DGAT2),	Metalotioneína (MT)
Dominio PR que contiene 16 (PRDM16)	Protein Kinasa activada por mitógenos / Kinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (MAPK-ERK 1/2)
Receptor adrenérgico β -3 (β 3-AR),	Monofosfato de adenosina cíclico (AMPc)
El tejido adiposo (TA)	Nivel más bajo de efecto adverso observable (LOAEL)
Elementos reguladores sensibles a PPAR (PPRE)	Nivel sin efecto adverso observable (NOAEL)
Especies reactivas de oxígeno (ROS)	Norepinefrina (NE),
Factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I)	Organización mundial de la salud (OMS)
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	Óxido de cadmio (cdO)
Factor de transcripción mitocondrial A (Tfam)	Partes por millón (ppm)
Factor de transcripción nuclear κ b (NF- κ b),	Policloruro de vinilo (PVC)
Glicerol 3-fosfato aciltransferasa mitocondrial (mGPAT)	Potencial de Hidrógeno (pH)
Glutación (GSH)	Protein Kinasa B (AKT)
Hormona estimulante de la tiroides (TSH)	Proteína desacopladora 1 (UCP-1)
Hormona estimulante de la tiroides (TSH)	Proteína quinasa AMP (AMPK)
Índice de masa corporal (IMC)	

Receptor de insulina (IR)	Transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3)
Receptor de la hormona tiroidea ($tr\beta$)	Transportado de Zinc tipo 8 (ZIP-8)
Receptores X de retinoides (RXR)	Transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4)
Ribosomal Protein S6 Kinase (S6K)	Transportador de metales divalentes 1 (DMT1)
Sintasa de Ácidos Grasos (FAS)	Triglicéridos (Tg)
Supresor de la señalización de citocinas 3 (SOCS3)	Triiodotironina (T3)
Tejido adiposo blanco (WAT)	Unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP1c)
Tejido adiposo marrón (BAT)	Uniportador de calcio mitocondrial (MCU)
Tiroxina (T4)	

1.- Introducción

Está demostrado que la exposición crónica a cadmio (Cd) en dosis de mínimo riesgo produce daño pancreático y resistencia a la insulina (RI) en múltiples tejidos periféricos, ya que aumenta la liberación de dicha hormona, induce hiperglucemia y altera el metabolismo de los lípidos. Es probable que estos cambios ocurran como consecuencia de la RI en tejidos dependientes y no dependientes a la hormona, lo que produce un fenotipo bioquímico similar al síndrome metabólico. Además, la exposición a Cd genera hiperleptinemia, inflamación y resistencia selectiva a la insulina en el hígado y el tejido adiposo. Particularmente nuestro grupo de trabajo ha observado que el tejido adiposo es disfuncional al presentar un fenotipo hipertrófico, lipolítico con acumulación gradual del metal en el tejido. Sin embargo, no se ha estudiado cual es papel de la exposición crónica a Cd sobre el tejido adiposo marrón.

2.- Marco teórico /antecedentes históricos

Cadmio

El Cd es un elemento químico de número atómico 48, aunque tiene una capa *d* cerrada, es un metal de transición y, por tanto, presenta características similares a los elementos del grupo principal (especialmente a los metales alcalinotérreos). En la tabla periódica de elementos, se encuentra en el quinto período y en el segundo subgrupo (grupo 12), o grupo del zinc. En los compuestos suele ser divalente, sus propiedades químicas son similares a las del zinc, pero a menudo forma compuestos complejos con un número de coordinación de 4 (ATSDR, 2021).

Desde su descubrimiento rara vez se utilizó, sino fue hasta hace apenas unos 50 años se le encontraron aplicaciones metalúrgicas. Generalmente, el Cd no se halla en el ambiente como un metal puro, es más abundante en la naturaleza en forma de óxidos complejos, sulfuros y carbonatos (Esmeralda et al., 2012).

Debido a su alta toxicidad, su aplicación ha disminuido ya que desde diciembre 2011 está prohibido en joyería, aleaciones para soldar y en PVC. Sin embargo, dadas sus propiedades fisicoquímicas aún sigue siendo ampliamente utilizado:

- Como protección contra la corrosión para materiales ferrosos (revestimiento de Cd).
- Como revestimiento de superficie para materiales de aluminio en ingeniería militar (p. Ej. Lanzacohetes).
- Para baterías de níquel-cadmio.
- Para pigmentos de color amarillo a rojo intenso de sulfuro y seleniuro de cd para pinturas y plásticos (mientras que su importancia práctica es baja debido a posibles riesgos para la salud, especialmente al quemar los artículos correspondientes).
- Como aleación de metal en aleaciones de baja fusión, por ejemplo, materiales de soporte.
- Como componente de materiales de soldadura.
- Para la producción de semiconductores.
- Aleaciones de cadmio y bismuto para fusibles
- Aleaciones de plata y cadmio como desoxidantes en la producción de plata esterlina.
- Para joyería: aleaciones oro-verde, oro-cadmio.

- Lámpara de Cd.
- Láseres de helio-cadmio (ATSDR, 2021).

Se estima que, entre 25.000 y 30 000 toneladas cada año de Cd son vertidas al medio ambiente, se estima que la mitad proviene de la erosión de las rocas que llega a los ríos y luego a los océanos, mientras que, las actividades humanas como la minería, industria manufacturera y el consumo de combustibles fósiles emiten entre 4.000 y 13.000 toneladas (Saini et al., 2020); siendo Canadá el principal país productor de este metal, mientras que los EE. UU., Australia, México, Japón y Perú también son los principales proveedores. México se ocupa el quinto lugar a nivel mundial en la producción de Cd, ya que produce el 6% de este metal (1,395 toneladas métricas) (Perez, 2020).

Este metal ocupa el séptimo lugar en la lista prioritaria de contaminantes tóxicos de la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades, debido a que representa una amenaza potencial a la salud humana debido a su alta toxicidad conocida y al potencial de exposición humana que existe (ATSDR, 2021).

Exposición a Cadmio

Las principales actividades de su emisión al medio ambiente son naturales y antropogénicas y es debido a ello que la población en general se encuentra expuesta a la interacción con Cd, gracias a su comportamiento químico, este metal puede estar presente, contaminado el aire, agua y suelos, medios con los cuales se interactúa cotidianamente y por lo tanto la población se encuentra expuesta a sus efectos tóxicos.

Fuentes de Exposición Ambiental.

La población general está expuesta al Cd a través del consumo de agua, alimentos o por fumar. Su fácil acumulación en la cadena alimentaria toma importancia cuando se refiere a la población no fumadora, ya que la dieta es la principal fuente de exposición al metal, puesto que, se estima que más del 80% de su ingesta proviene del consumo de cereales (principalmente arroz y trigo), hortalizas (hojas), raíces y tubérculos (principalmente papas y zanahorias), las cuales contienen niveles de cadmio elevado, aproximadamente de 0.05–0.12 mg/Cd/kg. Mientras que, en la población fumadora, debido a que las hojas de tabaco contienen altas cantidades de cadmio, se ha estimado que los fumadores de tabaco están expuestos a 1,7 µg de Cd por cigarrillo, la cuantificación de este metal en los tejidos ha confirmado que fumar aproximadamente duplica la cantidad de Cd en el cuerpo comparado con personas que no fuman (Saini et al., 2020; R. Wang et al., 2023).

- *Atmósfera*

La inhalación no es una ruta importante de exposición al Cd exceptuando a personas que viven cerca de industrias donde se manufactura con él. Bajo condiciones extremas de oxidación, refinado y fundición, el Cd puede dar lugar a óxido (CdO), que constituye un peligro para la salud, aunque también puede encontrarse en el aire como cloruro o sulfato en forma de partículas o vapores, dichos compuestos son contaminantes importantes debido a que, pueden recorrer grandes distancias en la atmósfera hasta ser depositados sobre la superficie del suelo (ATSDR, 2021; Saini et al., 2020).

- *Suelos*

La aplicación de estiércol de granja o algunos fertilizantes fosfatados puede aumentar los niveles de Cd en el suelo, además del proveniente de las actividades antropogénicas y naturales. Este se adhiere al suelo, con ello puede ser absorbido por las plantas e incorporarse entrando a las cadenas tróficas. La movilidad del metal en los suelos depende de varios factores, tales como: el pH (Los suelos ácidos permiten el aumento de la concentración de Cd en los cultivos), el potencial redox y la cantidad de materia orgánica (al adherirse fuertemente a la materia orgánica para permanecer inmóvil en el suelo), estos varían según los factores abióticos de cada ecosistema (ATSDR, 2021, Saini & Dhanial, 2020; Wang et al., 2023).

- *Medio acuático*

El Cd puede contaminar ríos y mares al presentarse tanto en compuestos solubles que se movilizan en el agua, como en insolubles que se depositan en el sedimento y son absorbidos por los suelos marinos donde ingresa a la cadena trófica de los organismos acuáticos, en ciertas especies de ostras, vieiras, mejillones y crustáceos. Tanto en el pasado como el presente, se han detectado niveles altos de Cd en suministros de agua cerca de industrias que lo liberan (ATSDR, 2021, Saini & Dhanial, 2020; Wang et al., 2023).

Fuentes de Exposición Laboral

Personas que laboran en empresas o instituciones donde se manufactura empleando este metal en algún paso de sus procesos, como:

- *Minería y metalurgia*: Las actividades mineras de metales no ferrosos son la principal fuente de liberación de Cd como subproducto, estos contaminan principalmente el agua, ya que proviene del agua de drenado de las minas, aguas residuales del procesamiento de los minerales, derrames de los depósitos de desechos, etc.
- *Industria*: Fabricación de baterías y acumuladores, cables, células fotoeléctricas, PVC, colorantes, fusibles, soldadura, etc.
- *Producción y uso de fertilizantes fosfatados*: El contenido de Cd en estos es muy variable y depende de la procedencia geográfica de las rocas empleadas para su fabricación, ya que el Cd puede sustituir al calcio en las rocas de tipo apatita.
- *Otras fuentes*: Incineración de residuos de madera y plásticos, combustión de carburantes fósiles, fabricación de cementos, disposición de residuos sólidos en terraplenes (Saini et al., 2020).

Como se puede apreciar estas actividades no solo afectan al sector de la población que labora en estos procesos, sino que tienen una repercusión directa sobre la población general. Por lo que, al absorberlo a través de la piel, inhalarlo o consumirlo en el agua o alimentos, la población en general puede verse afectada.

Grupos de riesgo

Algunos sectores de la población tienen una mayor probabilidad de exponerse a niveles peligrosos de Cd, o son propensos a padecer efectos más graves para la salud derivados de la intoxicación:

- Trabajadores en actividades donde esté presente el metal.
- Habitantes de áreas urbanas con alto nivel de industrialización, o bien de regiones donde haya contaminación del ambiente con Cd, o donde exista minería de zinc.
- Personas con enfermedades renales, pulmonares u óseas, fumadores crónicos, personas anémicas o con nutrición deficiente (Reservas bajas de hierro) (Charkiewicz et al., 2023).

Dosis de mínimo riesgo

Debido al potencial de exposición ambiental o laboral y los efectos tóxicos que representa el Cd, la ATSDR lo clasifica como el séptimo contaminante ambiental más importante de la categoría 1. En 2023, se estableció el límite superior de ingesta diaria tolerable de Cd (58.1 µg para una persona de 70 kg), lo que lleva a una ingesta potencial de por vida de aproximadamente 1,7 g. Existen diversos estudios que establecen los efectos patológicos observados después de la exposición a concentraciones altas del metal, en riñón, hígado, huesos y sobre todo por su potencial carcinogénico, es por ello que las organizaciones internacionales, como la ATSDR, la OMS y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, han establecido niveles de riesgo mínimos para la exposición diaria a Cd, minimizando así los riesgos para desarrollar cáncer, daño al ADN y otros efectos epigenéticos. Con ello se establecieron los límites máximos de ingesta de Cd en el agua potable (0,5 µg/kg/día) y los alimentos (1 µg/kg/día) con base en estos niveles mínimos de riesgo, se definen dos niveles de exposición ambiental para la ingesta oral de Cd:

- A. Nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) <1 µg de Cd/kg/día.**
- B. Nivel más bajo de efecto adverso observable (LOAEL) en el rango de 1 µg a 2 mg de Cd/kg/día.**

En años recientes, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la exposición oral a dosis de mínimo riesgo, a pesar de no tener un efecto carcinogénico, si tiene efectos patológicos sobre el metabolismo en ratas Wistar, aumentando la liberación de insulina y alterando el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Estos cambios probablemente son consecuencia de una sensibilidad reducida a la insulina. Esto genera un fenotipo similar al síndrome metabólico en humanos. Se ha evidenciado que las ratas expuestas a una dosis LOAEL, considerada no tóxica desarrollan resistencia a la insulina en múltiples tejidos, incluyendo el hígado, tejido adiposo y en sistema cardiovascular (Treviño et al., 2015, Sarmiento-Ortega et al., 2017).

Debido al tiempo, dosis y vía de administración de Cd, este trabajo tiene como objetivo exponer a ratas macho de la cepa Wistar a dosis NOAEL (15 ppm) y LOAEL (32 ppm) en agua de beber durante un periodo de 5 meses, con la finalidad de establecer la participación del tejido adiposo marrón en la mecánica del desarrollo de dislipidemia y disglucemia.

Absorción y distribución de cadmio dependientes de la vía de exposición.

Se estima que la carga corporal total de Cd por exposición no ocupacional es de 30 mg en América del Norte, de 10 a 18 mg en Europa y de 40 a 48 mg en Asia en “áreas no contaminadas” (Egger et al., 2019). La vía de entrada más importante del Cd es la absorción en el tracto gastrointestinal, ya que la mayor carga del metal en el cuerpo humano se produce principalmente a través del consumo de alimentos y agua contaminada. Además, una importante proporción de Cd inhalado ingresa al tracto

gastrointestinal. La absorción del metal por el tracto gastrointestinal es de aproximadamente del 3% al 8% de la ingesta (Charkiewicz et al., 2023).

El Cd en los alimentos se encuentra unido a las proteínas como el glutatión, metaloenzimas, metalotioneína y fitoquelatina, dados por el confinamiento vacuolar de los metales pesados en los vegetales, que al ser degradadas por el jugo gástrico, liberan al metal, potenciando su absorción intestinal por transportadores vinculados a metales divalentes. Se cree que, el pH ácido del vaciado gástrico hacia el duodeno puede ser un factor que favorezca la absorción, ya que fuera del duodeno, donde aumenta el pH, el metal se quela rápidamente por diferentes componentes de la dieta y, por lo tanto, su biodisponibilidad biológica disminuye. El transporte de Cd en el intestino delgado se facilita por diversos mecanismos, incluidas proteínas transportadoras de metales, como el transportador de metales divalentes 1 (DMT1), el transportador de Zinc tipo 8 (ZIP-8), canales iónicos de calcio, transportadores de aminoácidos (como conjugados de cisteína-cadmio) y por endocitosis de complejos cadmio-metalotioneína (Cd-MT). Siendo el DMT1 uno de los más importantes ya que se encuentra ampliamente localizado en el duodeno, eritrocitos, hígado y las células renales del túbulo contorneado proximal (Thévenod & Lee, 2013).

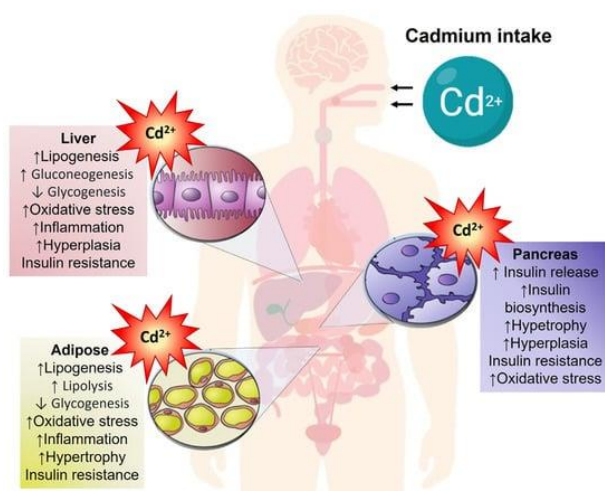
En circulación, principalmente se une a la albúmina y es transportado al hígado, donde se une al glutatión (GSH) y a la metalotioneína (MT). El complejo Cd-MT es secretado en la bilis y posteriormente reabsorbido a la sangre por medio de la circulación enterohepática. El Cd-MT es un complejo de bajo peso molecular (< 7 kD), que se adsorbe fácilmente en los órganos (Thévenod & Lee, 2013).

Toxicidad

Este metal se acumula principalmente en el hígado y riñones, tiene diversos efectos citotóxicos. Esto se debe a la capacidad de estos tejidos para sintetizar altas concentraciones de MT, que son proteínas inducibles por metales de transición que protegen las células. La forma biológica y por ende tóxica del Cd es el ion cadmio (Cd^{2+}), del que no se conocen efectos fisiológicos en el humano. Como ion metálico no esencial, el Cd^{2+} compite con iones metálicos esenciales (Zn^{2+}) en las células, donde causa disfunción en diferentes niveles (balance redox, inflamación, bioenergética, metabolismo y epigenético, por mencionar algunos), lo cual lleva al desarrollo enfermedades (Sabath & Robles-Osorio, 2012).

El metal no puede degradarse a especies menos tóxicas, siendo el hígado, riñones, pulmones, testículos, próstata, corazón, sistema esquelético, sistema nervioso y el sistema inmunológico los órganos blanco de la toxicidad del Cd. Cuando los reservorios del metal son el hígado, los pulmones, los huesos y los riñones (Moroni-González et al., 2023), causa nefrotoxicidad, osteoporosis, neurotoxicidad, genotoxicidad y teratogenicidad, o tiene efectos endocrinos y reproductivos, debido a que la vida media en estos tejidos es de 20 – 40 años (Sabath & Robles-Osorio, 2012).

Además de los efectos tóxicos mencionados, rara vez se menciona el daño en tejido adiposo o la disfunción de los islotes de Langerhans. Por tanto, diabetes y alteraciones metabólicas no suelen asociarse con la toxicidad del metal.



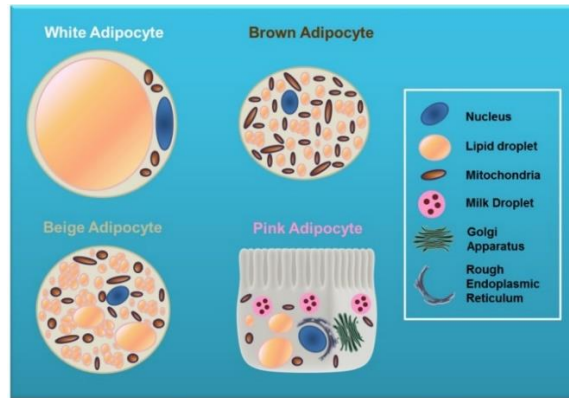
Esquema 1. Efectos metabólicos descritos por intoxicación de cadmio. Tomado de Moroni-González et al. 2023.

El eje páncreas-hígado-adiposo es fundamental para gestionar y almacenar carbohidratos y lípidos como se puede observar en el esquema 1, donde se muestra el papel potencial para el desarrollo de enfermedades de carácter metabólico.

Efectos tóxicos del cadmio en el tejido adiposo

Históricamente, el tejido adiposo se ha dividido en dos tipos, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón, que se distinguen claramente por el color del tejido debido principalmente por una alta densidad de mitocondrias. Estas células tienen diferencias fisiológicas que conducen a funciones tisulares especializadas (Richard et al., 2020).

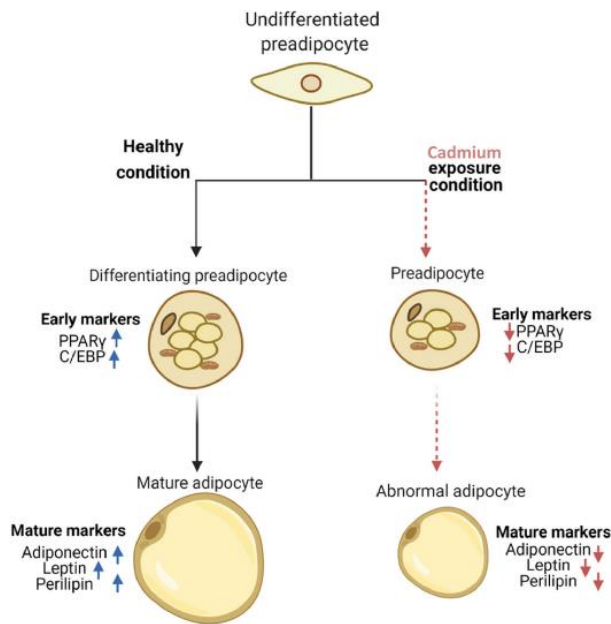
Los adipocitos marrones y blancos difieren en su forma, tamaño y estructura intracelular de sus orgánulos. Los adipocitos blancos generalmente tienen forma esférica y cada uno contiene una única gota de lípidos grande que empuja a todos los demás orgánulos, incluido el núcleo, hacia la periferia de la célula. Mientras que, los adipocitos marrones contienen múltiples gotitas de lípidos dispersas a lo largo de una célula de forma elipsoidal que está enriquecida con mitocondrias, lo que le da a la célula su tono característico. Los adipocitos marrones suelen crecer entre 15 y 50 μm , mientras que, las células de grasa blanca tienen una mayor capacidad de almacenamiento de lípidos y pueden expandirse alrededor de 100 μm de diámetro. Algunas diferencias morfológicas de los diferentes tipos de tejido adiposo se pueden observar en el esquema 2 (Richard et al., 2020).



Esquema 2. Los tipos de adipocitos se describen mediante tonos de color. Tomado de Richard A et al 2020.

El tejido adiposo (TA) tiene un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis sistémica y el flujo metabólico, realiza dos funciones principales: Adipogénesis asociada al resguardo y metabolismo de los lípidos y producción de adipocinas, hormonas regulan el metabolismo de lípidos y glucosa, nuestro grupo de trabajo ha evidenciado que la exposición a Cd afecta negativamente a estas funciones (Sarmiento-Ortega et al., 2022). Varios factores contribuyen a los efectos inducidos por el Cd, como la duración de la exposición, la vía de ingreso del metal, la dosis de exposición, el estado funcional previo de los tejidos y la respuesta de cada organismo. El riesgo de disfunción del tejido adiposo es alto ya que conduce a alteraciones metabólicas y, en consecuencia, a obesidad, resistencia a insulina, síndrome metabólico y diabetes (Sarmiento-Ortega et al., 2022).

Las alteraciones de la estructura de tejido adiposo y su composición celular conducen al deterioro de sus funciones fisiológicas vitales en la homeostasis metabólica, como lo son la lipogénesis y la lipólisis. Este tejido se caracteriza por su plasticidad que lo hace adaptable para acumular el excedente de energía en forma de triglicéridos. Sin embargo, en caso de toxicidad por metales, la adipogénesis se ve afectada y se deteriora la capacidad de diferenciación de los adipocitos. Se ha observado que en el tejido adiposo blanco tratado con Cd, hay un patrón de reducción en el nivel de expresión tanto de las proteínas de unión al potenciador de CCAAT (C/EBP) como de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas de tipo gamma (PPAR- γ), claves en la diferenciación adipocitaria. Esto afecta negativamente a la función principal de almacenamiento y, en consecuencia, a los procesos metabólicos y a la señalización sistémica. Estos efectos se resumen en el esquema 3 (Attia et al., 2021).



Esquema 3. Efectos sobre la función del tejido adiposo mostrados por la exposición a cadmio. Tomado de Attia et al. 2021

Las principales características de los adipocitos anormales debido a la exposición al Cd es la disminución de la expresión de PPAR- γ , C/EBP- α , afectando en consecuencia la expresión de adiponectina, leptina, el receptor de insulina (IR), el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) y la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL). Otra característica asociada a la disfunción del TA es la resistencia a insulina, en donde la expresión de GLUT4 se ve afectada por el Cd, la señalización de la insulina y la producción de leptina impidiendo la conversión de glucosa en glicerol y, en consecuencia, la esterificación de los ácidos grasos libres (AGL). El resultado de lo anterior es un nivel de AGL en circulación alto, generando un círculo vicioso en la señalización de la insulina, que en conjunto ocasiona un desequilibrio entre lipólisis y lipogénesis, lo cual es el principal indicador de disfunción de TA (Attia et al., 2021).

La mayoría de la información recopilada está centrada en los efectos que tiene el Cd sobre el tejido adiposo blanco, como el desarrollo de hipertrofia y obesidad, que en conjunto son pilares para el desarrollo de enfermedades metabólicas. Sin embargo, hasta la realización de este proyecto de investigación no existen reportes los cuales asocien el daño producido por la exposición a Cd con la disfunción del tejido adiposo marrón, un tejido metabólicamente importante, ya que es un órgano que provee de “Resistencia a la obesidad” debido a su alta actividad termogénica.

Tejido Adiposo Café.

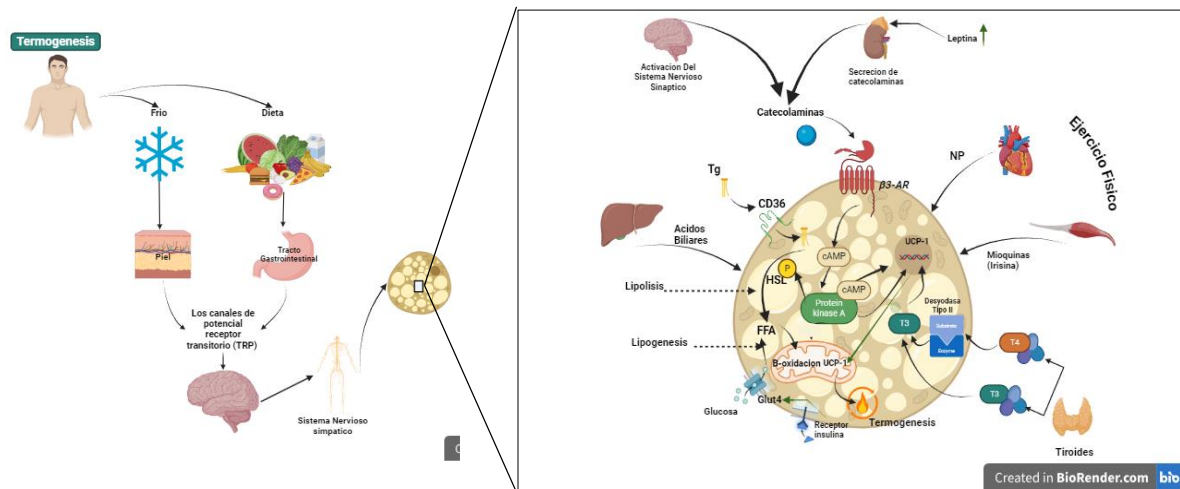
El BAT está presente en los mamíferos después del nacimiento, se especializa en el gasto de energía mitocondrial para liberarla en forma de calor, dando lugar a un proceso denominado termogénesis, el cual es fundamental para el mantenimiento de la temperatura corporal (Townsend & Tseng, 2012).

Características y función del tejido adiposo café

Originalmente se pensaba que el BAT estaba presente solo en recién nacidos, pero los estudios de imágenes han demostrado su presencia en las regiones supraclavicular y torácica de los adultos. En humanos sanos, la actividad BAT promueve la oxidación sistémica de grasas y la termogénesis, gracias a la presencia de numerosas mitocondrias que contienen a la proteína desacopladora 1 (UCP-1), un transportador de protones que cortocircuita el gradiente de protones que genera ATP, y permite la producción simultánea de calor a medida que fluyen los protones nuevamente a la matriz mitocondrial. La visión tradicional de la función del BAT es que su actividad metabólica (tanto la β -oxidación como la termogénesis a través de UCP-1) se regula mediante entradas del sistema nervioso simpático, como se describe a continuación: (Townsend & Tseng, 2012).

1. El sistema nervioso central activa al sistema nervioso simpático, el cual promueve la liberación del neurotransmisor catecolamina norepinefrina (NE), la cual se une a los receptores adrenérgicos β_3 del BAT.
2. Posteriormente gracias al incremento del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) se activa la vía de la cinasa de proteínas dependiente del AMP cíclico (PKA) con lo cual se da paso a la fosforilación de la lipasa sensible a hormona (LSH) y perilipina A, con el fin de promover la liberación de ácidos grasos, los cuales mediante la lanzadera de carnitina ingresan a la mitocondria.
3. Dentro de la mitocondria los ácidos grasos tendrán dos rutas para activar a UCP-1 y generar termogénesis, oxidarse mediante β -oxidación, para producir ATP o directamente activar la termogénesis mediante UCP-1.
4. Además de la vía de las catecolaminas, se sabe que las hormonas tiroideas intervienen en la función termogénica del tejido adiposo café. El ingreso al tejido de triiodotironina (T_3) y tiroxina (T_4), que se biotransforma a T_3 a través de una Desyodasa tipo 2, es esencial para la termogénesis adaptativa, ya que como se ha demostrado en los mamíferos hipotiroideos, sucumben rápidamente a la temperatura ambiental reducida. La T_3 , que es la forma activa de las hormonas tiroideas, interviene en la actividad mitocondrial y la transcripción nuclear de genes que inducen termogénesis, aumentando la transcripción nuclear de UCP-1 (Townsend & Tseng, 2012).

Los principales mecanismos de activación del BAT se resumen en el Esquema 4.



Esquema 4. Activación del adiposo marrón en respuesta a estímulos simpáticos y hormona tiroidea. Tomado y modificado de Corrêa et al., 2019; Hachemi & U-Din, 2023; Saito et al., 2016; Townsend & Tseng, 2012; Virtanen, 2019.

Se sabe que la asociación entre la obesidad y el desarrollo de patologías de carácter metabólico es ocasionada por la disfunción del tejido adiposo. Dado lo anterior es importante mencionar que recientemente se ha puesto especial enfoque en los PPAR, que desempeñan importantes funciones reguladoras que controlan la homeostasis del tejido adiposo mediante la regulación del equilibrio entre los procesos anabólicos y oxidativos. Por lo tanto, los defectos en los PPAR se han relacionado con la lipodistrofia, la obesidad y la resistencia a la insulina como resultado del deterioro de la capacidad de expansión y funcionalidad del TA. Al regular positivamente la capacidad del TA para expandirse y almacenar o disminuir el suministro de lípidos, intentando compensar el desajuste inducido y evitando el desarrollo de enfermedad metabólica (Corrales et al., 2018). Por lo que la expresión de los llamados PPAR son esenciales para la función del BAT.

- PPAR- γ es necesario para la diferenciación de las células grasas en todos los depósitos adiposos y contribuye a definir el umbral máximo de expansión del tejido adiposo blanco (WAT), facilitando la acumulación de grasa y conserva la funcionalidad al coordinar la adipogénesis, el transporte de grasa y la lipólisis, mientras que los defectos el comprometen la función, la plasticidad y la lipotoxicidad (Corrales et al., 2018).
- PPAR- α se expresa mayormente en BAT que en WAT, ya que, predomina en tejidos eminentemente oxidativos, ricos en contenido mitocondrial. En el WAT su activación disminuye la adiposidad y mejora la resistencia a la insulina. Mientras que, en BAT, ejerce un efecto termogénico, cooperando con el coactivador 1 α del receptor activado gamma del proliferador de peroxisoma (PGC1 α) para controlar la oxidación de lípidos y la termogénesis en respuesta a la estimulación β -adrenérgica en respuesta a la exposición al frío, y en individuos obesos aumenta el gasto energético y, activas vías termogénicas que facilitan la pérdida de peso (Corrales et al., 2018).

La generación de obesidad compromete la función del BAT, el cual es el principal órgano para evitarla. Diversos estudios se ha demostrado que, la obesidad daña de manera progresiva la función y

arquitectura del BAT, lo que resulta en un blanqueamiento progresivo de BAT y en una disminución de la densidad celular, lo cual repercute en la disminución de la termogénesis y la temperatura corporal. La disminución de la expresión PPAR- α resulta en una baja translocación de UCP-1 y en un bajo gasto de energía (Rangel-Azevedo et al., 2022).

Función Mitocondrial en el tejido adiposo café

Las mitocondrias en el BAT son más numerosas y aparentemente grandes, contienen crestas empaquetadas en comparación con las mitocondrias del WAT. El BAT convierte específicamente la energía química en calor en la termogénesis adaptativa. Cuando se activan mediante estimulación simpática, los adipocitos marrones y beige disipan la energía química almacenada en forma de triglicéridos mediante lipólisis y oxidación de ácidos grasos. Posteriormente, la energía de oxidación del sustrato se convierte en calor.

Las mitocondrias metabolizan el acetil coenzima A mediante el ciclo enzimático del ácido cítrico, el cual da lugar a productos como CO₂ y al NADH, este último cede electrones a la cadena de transportadores de electrones que se encuentra en la membrana de las crestas mitocondriales. Estos electrones pasan de un transportador a otro llegando como último paso al O₂, mediante una serie de reacciones redox para generar H₂O. En el proceso, los protones son bombeados desde la matriz a través de la membrana interna mitocondrial a través de los complejos respiratorios I, III y IV. Cuando los protones regresan a la matriz mitocondrial siguiendo su gradiente electroquímico, el ATP se sintetiza a través del complejo V. Pero en el caso del BAT, la UCP-1 localizada en la membrana interna mitocondrial disipa la fuerza motriz de protones (H⁺) generada por el transporte de electrones en los complejos mitocondriales en forma de calor. En este sentido, la respiración mitocondrial en BAT tiene un papel esencial en la regulación de la homeostasis energética de todo el cuerpo a través de la termogénesis adaptativa (Osellame et al., 2012).

Este proceso, llamado termogénesis sin temblores generado por el BAT, es importante para neonatos de mamíferos que necesitan una mayor producción de calor debido a la gran relación superficie-volumen. Por lo tanto, una correcta actividad de la cadena transportadora de electrones es esencial para una buena función termogénica. La disfunción mitocondrial es un componente importante en la fisiopatología de una variedad de enfermedades metabólicas y cardiovasculares. Entre todos los tejidos, el tejido adiposo café depende más de la respiración mitocondrial para mantener su función fisiológica normal de termogénesis. El producto final de la oxidación de los ácidos grasos endógenos y exógenos en el BAT es el acetil-CoA, que se oxida aún más a través del ciclo del ácido tricarbóxico, y la cadena de transporte de electrones, y todas estas reacciones requieren una función mitocondrial normal.

La expansión patológica del BAT se acompaña de una regulación negativa de las vías oxidativas mitocondriales, cambios en su forma y número, lo que conduce a la muerte celular. La disfunción mitocondrial tiene efectos nocivos sobre importantes procesos biológicos de los adipocitos (metabolismo de lípidos, diferenciación celular, sensibilidad a la insulina y termogénesis), lo que conduce a enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes tipo 2. Se ha informado que los individuos con obesidad tienen una expresión reducida de UCP-1 en los adipocitos y que la activación de UCP-1 mejora la obesidad y las complicaciones metabólicas (Rangel-Azevedo et al., 2022).

Complejos mitocondriales

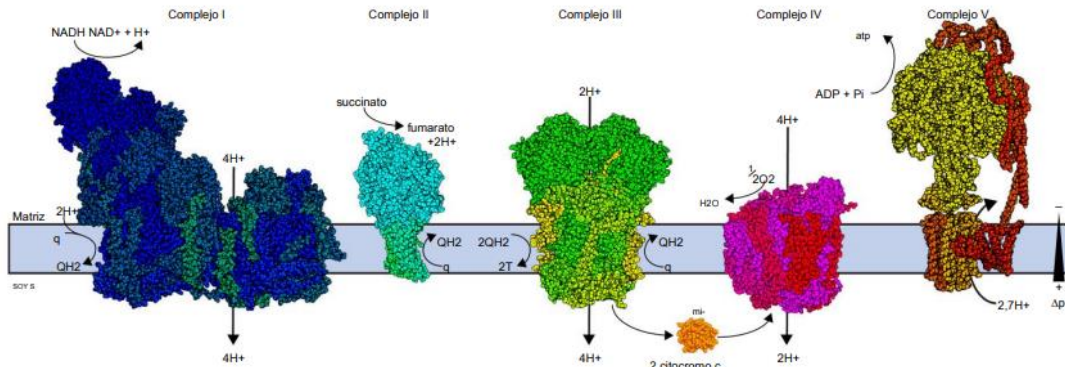
La cadena transportadora de electrones se conoce como cadena respiratoria, la cual se comprende de unas 40 proteínas, que se agrupan en tres complejos proteicos. Estos complejos al agruparse se denominan respirasoma, el cual se comprende por: el complejo de la nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) deshidrogenasa (Complejo 1 o CI), complejo citocromo b-c1 (Complejo 3 o CIII) y complejo del citocromo oxidasa (Complejo 4 o CIV), cada uno de ellos tiene grupos químicos que permiten el paso de protones a su través movidos por el transporte de electrones (Osellame et al., 2012).

Complejos y Supercomplejos

Durante la respiración celular, los electrones se obtienen del metabolismo de los azúcares, las aminoácidos y ácidos grasos. Los electrones pasan a través de la cadena de transporte de electrones (ETC) al oxígeno molecular (O_2), la cadena respiratoria en mamíferos consta de 5 complejos respiratorios nombrados según sus actividades enzimáticas, estos se ilustran en el esquema 5.

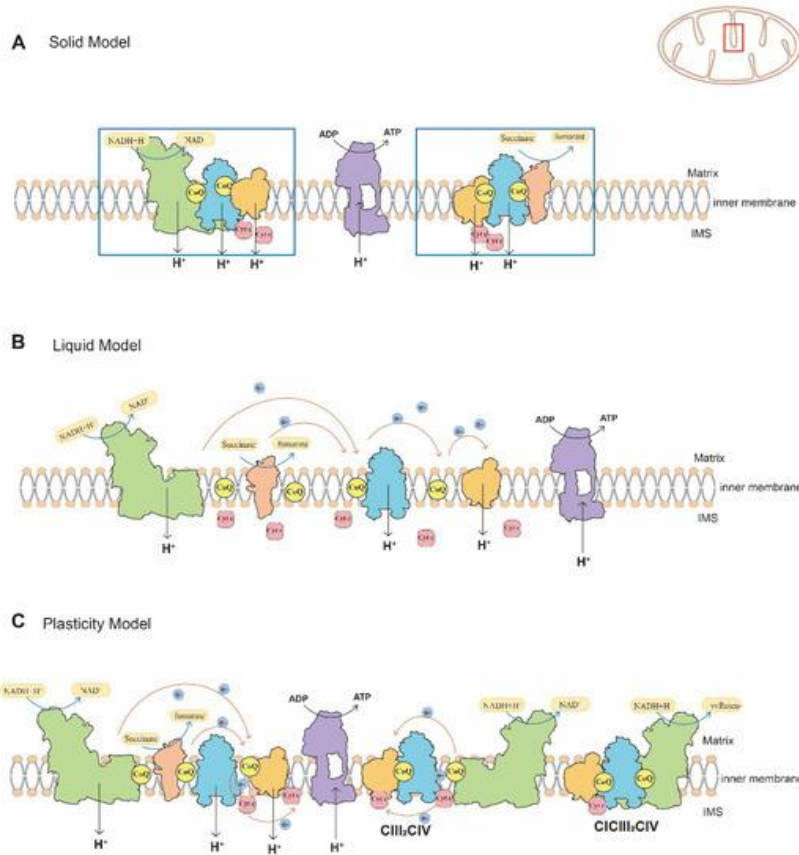
- **Complejo 1 (CI): Complejo NADH deshidrogenasa**, es el complejo más grande del ETC, este oxida el NADH al transferir dos electrones del NADH a la coenzima Q (CEQ) un transportador de electrones soluble en lípidos incrustado en la membrana mitocondrial interna (MMI), el NADH donante de dos electrones transfiere electrones al flavin mononucleótido (FMN), luego, el FMN reducido ($FMNH_2$) transfiere esos electrones a una serie de proteínas Fe-S, que son agentes de transferencia de un electrón. Para este propósito, la flavina de FMN puede actuar como un agente de transferencia de uno o dos electrones que une las proteínas NADH y Fe-S. Finalmente, se transfieren dos electrones del grupo Fe-S a CEQ.
- **Complejo 2 (CII): complejo succinato deshidrogenasa**, este complejo es el más pequeño de la ETC, representa el segundo punto de entrada de los agentes reductores al ETC, es el único complejo que no bombea protones a través de la MMI. Tiene dos actividades enzimáticas intrínsecas, succinato deshidrogenasa, que genera el flavín adenín dinucleótido reducido ($FADH_2$), mediante la oxidación de succinato a fumarato como parte del ciclo de krebs y actividad de la enzima succinato ubiquinona reductasa (SQR), la cual usa los electrones proporcionados por $FADH_2$ para reducir ubiquinona (UQ) a ubiquinona reducida (UQH_2).
- **Complejo 3 (CIII): complejo Ubiquinol-citocromo C oxidorreductasa**, este oxida el ubiquinol UQH_2 y transfiere dos electrones a dos moléculas de citocromo c, cuando se reduce la transferencia de electrones por un alto potencial de membrana o inhibidores del complejo III como la antimicina A, los electrones pueden fugarse en el complejo III y reaccionar con el oxígeno molecular, lo que da como resultado la generación de Especies reactivas de oxígeno mitocondrial (mROS).
- **Complejo 4 (CIV): complejo Citocromo C oxidasa**, contiene dos grupos hem (hem-a y hem-a3) y tres iones de cobre, dos en el centro Cu-A y uno en el sitio Cu-B. Este recibe un electrón de cada una de las cuatro moléculas de citocromo c y los transfiere a O_2 , convirtiéndolo en dos moléculas de agua mientras cuatro protones se translocan a través de la MMI.

- Complejo 5 (CV): complejo ATP Sintasa**, esta es una maquinaria molecular giratoria que consta de dos regiones funcionales principales, F_0 y F_1 , encargadas de la síntesis de ATP. Esta emplea el gradiente electroquímico creado por la translocación de protones que producen los complejos CI, CIII y CIV, alimentando la rotación del mecanismo motor del Complejo V cuando los protones regresan a la matriz, permitiendo que el CV sintetice ATP a partir de $ADP+P$. Así, la F_0 y F_1 de la ATP sintasa mitocondrial acoplan el retorno de protones situados en el espacio intermembrana mediante reacciones oxidativas a la síntesis de ATP.

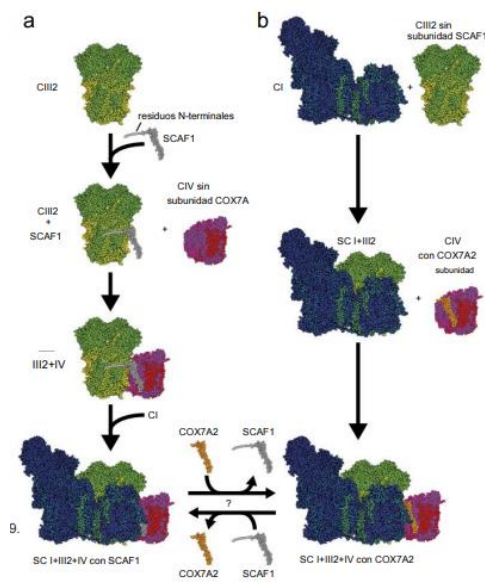


Esquema 5. Los complejos del sistema de fosforilación oxidativa de la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Tomado de Letts J. et al. 2017

Como se mencionó la cadena respiratoria en los mamíferos consta de cuatro complejos respiratorios insertados y ensamblados en la membrana mitocondrial interna y dos sustratos intermedios (coenzima Q y citocromo c). Durante los últimos 30 años, se pretendió entender la organización estructural de estos complejos respiratorios en términos de dos modelos: el modelo “fluido” y el “sólido”. El primero postula que todos los componentes redox son partículas difusibles sin restricciones con los portadores de electrones alternándose en medio de los gigantes complejos I-IV. Mientras que, el segundo postula que los complejos respiratorios establecen interacciones para formar estructuras supramoleculares de orden superior llamadas supercomplejos (SC), los cuales están formados por 2 unidades de complejo III, un número variable de complejo IV y presencia o ausencia de complejo I (EJ. $I_2 III_2 IV_{1-2}$ o $III_2 IV_{1-2}$), no se ha descrito la asociación de complejo II en los supercomplejos. Recientemente se ha propuesto un nuevo modelo de “plasticidad” que postula la existencia de conjuntos transitorios y de difusión lateral libre de unidades redox, tanto SC como componentes individuales libres pueden realizar sus acciones siendo los SC más eficientes en producción de energía con menos producción de ROS, es decir, la coexistencia de ambos modelos “fluido” y “sólido” (Vartak et al., 2013). Estos modelos se pueden observar en el esquema 6.



Esquema 6. Representación esquemática de los diferentes modelos de ensamblaje de la cadena respiratoria mitocondrial. Tomado de Guan et al. 2022



Esquema 7. Dos posibles caminos para el ensamblaje del respirasoma. Tomado de Letts J. et al. 2017

Se ha descrito que los complejos respiratorios se organizan en estructuras más grandes dentro de la MMI para realizar un transporte más rápido y eficiente de electrones, la proporción de los SC puede variar entre especies y tejidos, también puede alterarse en respuesta a las demandas metabólicas de la célula, las vías de formación de estas estructuras se ilustran en el esquema 7. Sin embargo, no se ha estudiado hasta ahora el papel que tiene la exposición a Cd sobre el respirasoma del BAT y su posible efecto en desarrollo de enfermedades metabólicas (Acín-Pérez et al., 2008; Escoll et al., 2019; Genova & Lenaz, 2014; Letts & Sazanov, 2017; Novack et al., 2020; Schon & Dencher, 2009).

3.- Planteamiento del problema

La obesidad es una condición que comúnmente está asociada a patologías como diabetes, hipertensión arterial, dislipidemias y enfermedad cardiovascular; de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), esta condición afecta a 2 000 millones de personas en todo el mundo y cada año causa la muerte de tres millones de adultos, a nivel global, estas cifras son alarmantes ya que su prevalencia se triplicó entre 1975 y 2016, hasta llegar a 650 millones de adultos. La región de las Américas tiene la prevalencia más alta de sobrepeso y obesidad (62.5%) entre todas las regiones de la OMS, pero en México todavía es más alta, ya que mientras que la obesidad en adultos es de 36.9% y el sobrepeso es 38.3%, la prevalencia de obesidad abdominal en personas con 20 o más años es de 81.0%. Estos datos ubican actualmente a México entre los cinco países con mayor prevalencia de obesidad en la región de las Américas y a causa de ello desde el año 2016, fue declarada por las autoridades de salud como una emergencia sanitaria en nuestro país; pero en años recientes se ha transformado en una emergencia económica ya que según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), quien en 2020 realizó un estudio en el cual señaló que la obesidad está detrás del 70% de todos los costos de tratamientos relacionados con la diabetes, del 23% relacionados con las enfermedades cardiovasculares y del 9% del cáncer, esto causara que de 2020 a 2025 haya una reducción promedio anual del PIB del 3.3% en los países de la OCDE. Además, en 2020, se dedicó el 8,4% del presupuesto total en salud al tratamiento de enfermedades relacionadas con la obesidad un equivalente a 311 mil millones de dólares.

En este sentido es importante resaltar que, aunque el desarrollo de la obesidad está fuertemente asociado a el estado socioeconómico dispar, la calidad de la alimentación, etc. También es importante denotar la influencia que puede tener la exposición a metales tóxicos como el Cd en el desarrollo de esta condición ya que, aunque los datos arrojados por diversas investigaciones acerca el vínculo entre la exposición al metal y el desarrollo de obesidad son hasta ahora son poco consistentes, ya que esto depende tanto de la dosis como del tiempo de exposición, existe información que, comprueba que la exposición al metal tiene un efecto funcional sobre la fisiología del tejido adiposo (Moroni-González et al., 2023).

Debido a que, el Cd está clasificado en el séptimo lugar en la lista prioritaria de contaminantes tóxicos (ATSDR, 2021), y México ocupa el quinto lugar a nivel mundial en producción de este metal (Perez, 2020). Es posible que la población mexicana se encuentre ampliamente expuesta al xenobiótico. La exposición de la población a este metal pesado debe ser un tema de relevancia ya que tiene diferentes efectos tóxicos en el organismo al acumularse en los diferentes órganos y tejidos de manera gradual causando su disfunción, generando patologías de carácter metabólico crónico degenerativas.

Derivado de lo anterior, se desarrolló la siguiente pregunta de investigación

¿Qué efecto tiene la exposición oral crónica a dosis de mínimo riesgo (NOAEL y LOAEL) de cadmio sobre la función del tejido adiposo café de rata Wistar?

4.- Justificación

El Cd es un metal pesado al que cualquier persona puede estar expuesta directamente o indirectamente a través de la exposición ambiental por la contaminación, en ambos casos dosis de mínimo riesgo de manera crónica se establecen a través de la ingesta en la dieta o inhalación. La exposición humana a este metal es una problemática urgente, ya que, al acumularse en diversos tejidos, afectan sus funciones, resultando en el desarrollo de patologías metabólicas que perjudican la calidad de vida de la población en general.

La mayoría de la información está centrada en los efectos que tiene el metal como inductor de cáncer. En menor proporción se ha investigado sobre los defectos metabólicos que genera su exposición. Y en este rubro, la información existente está enfocada sobre el eje hígado-páncreas-tejido adiposo blanco. Sin embargo, no ha estudiado el efecto del metal sobre el tejido adiposo marrón, el cual provee de "Resistencia a la obesidad".

Con fundamento en lo anterior este proyecto se centrará en evaluar la función del BAT ante una la exposición oral crónica a dosis de mínimo riesgo (NOAEL y LOAEL) de cadmio en un modelo murino como lo es la rata macho Wistar.

5.- Objetivos

General

Caracterizar la histología y función del tejido adiposo marrón de rata macho Wistar expuestas crónicamente a cadmio en dosis de mínimo riesgo.

Específicos

1.-Valorar el estado metabólico y zoométrico de ratas Wistar expuestas crónicamente a Cd en dosis de mínimo riesgo.

2.-Analizar la morfología y las proteínas de función (PPAR γ , PPAR α , UCP1) del tejido adiposo marrón mediante técnicas histológicas.

3.- Analizar la actividad en gel de la función mitocondrial del tejido adiposo marrón.

6.- Hipótesis

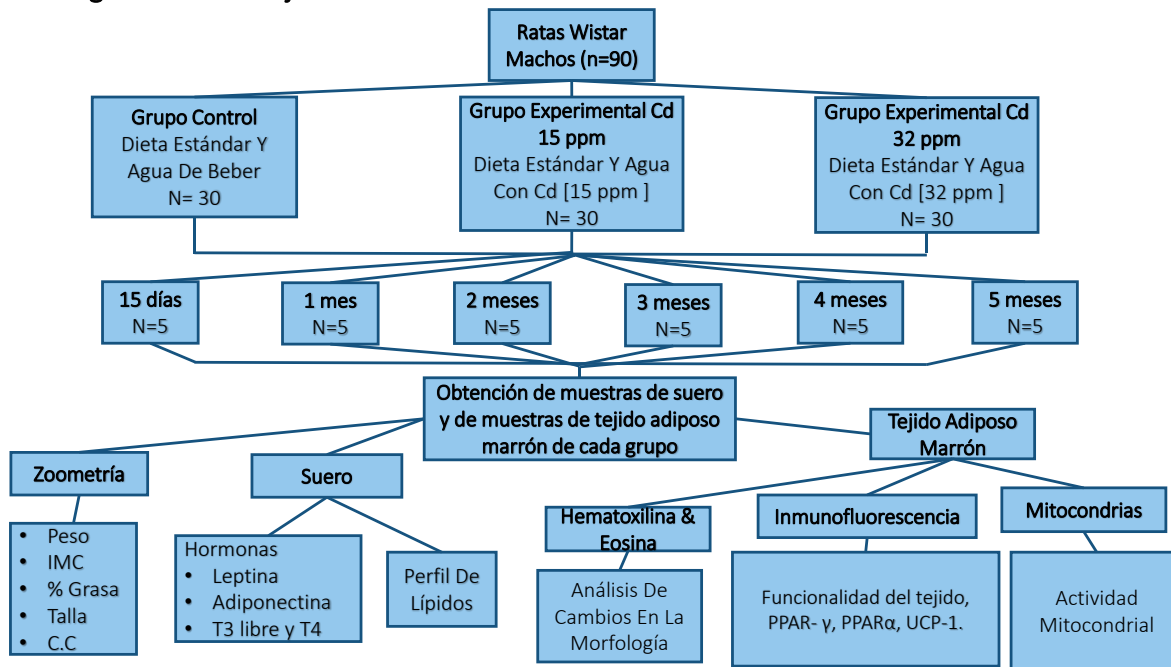
Nula

Las ratas expuestas crónicamente a cadmio en dosis de mínimo riesgo no desarrollaran blanqueamiento, pérdida de función o disminución de la actividad mitocondrial del tejido adiposo marrón.

Alternativa

Las ratas expuestas crónicamente a cadmio en dosis de mínimo riesgo desarrollaran blanqueamiento, pérdida de función o disminución de la actividad mitocondrial del tejido adiposo marrón.

7.- Diagrama de trabajo



8.- Metodología

Los animales empelados en este proyecto fueron manejados bajo los lineamientos de la guía del cuidado y uso de animales de laboratorio establecida por el CICUAL.

Etapa De Acondicionamiento.

En este estudio se emplearon 90 ratas macho de la cepa Wistar provenientes del bioterio “Claude Bernard”, con un rango de peso de 70 a 80 g, estos fueron pesados continuamente hasta que alcancen los 100 g, lo que equivale a 15 días de acondicionamiento bajo condiciones ambientales de ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, a 19-26 °C, con disponibilidad *ad libitum* de alimento y agua (dieta standard 5001, LabDiet; St. Louis, MO, EE. UU.).

Inducción de modelo de Cadmio.

Una vez terminado el proceso de acondicionamiento las 90 ratas fueron divididas aleatoriamente y agrupadas de la siguiente manera:

Primero en 3 grupos cada uno conformado por 30 ratas, estos grupos fueron identificados como Control el cual se alimentó con dieta LabDiet Rodent 5001 y agua libre de Cd, *ad libitum* (n=30), Cd 15ppm alimentado con dieta LabDiet Rodent 5001 y agua de bebida con 15 ppm de CdCl₂, *ad libitum* (n = 30), y Cd 32 ppm se le dio dieta LabDiet Rodent 5001 y agua de bebida con 32.5 ppm de CdCl₂, *ad libitum* (n = 30). Cada uno de estos a su vez se subdividió en 5 grupos los cuales se denominarán 15 días (n=5), 1 mes (n=5), 2 meses (n=5), 3 meses (n=5), 4 meses (n=5) y 5 meses (n=5). Estas condiciones fueron continuas durante el tiempo mencionado para cada grupo.

Las ratas fueron expuestas a una dosis LOAEL (Grupo 32ppm) y NOAEL (Grupo 15ppm), ambas dosis consideradas dosis de mínimo riesgo.

Zoometría.

Se llevó a cabo un monitoreo semanal de las medidas corporales de los animales de experimentación. Donde se evaluó el peso con ayuda de una balanza digital tarada con una caja de policarbonato y aserrín, mientras que las medidas del contorno de la cintura y la talla o la altura con ayuda de una cinta métrica tomada desde la base de la cola a la punta de la nariz y con estos datos se calculó:

- Índice de masa corporal (IMC).

$$IMC = \frac{Peso}{Talla^2}$$

- Porcentaje de grasa según el índice de Lee para modelos de roedores (Rogers and Webb, 1980).

$$\%Grasa\ Corporal = \frac{Peso^{0.33}(gr)}{Talla\ (cm)} \times 100$$

Obtención de muestras.

Muestra sanguínea.

Un día después del término del periodo de exposición indicado para cada subgrupo se procedió a sacrificar a los cinco animales que conformaban a cada uno de estos. El día del sacrificio se sometió a los grupos a condiciones de ayuno de 4 a 5 horas. Tras anestesiarse a las ratas con una dosis de ketamina + xilazina (0.2 ml/100 gr) vía intraperitoneal, se procedió a tomar muestra por punción intracardiaca y se les extrajo 5 ml de sangre (aproximadamente). Los cuales fueron recolectados en tubos BD Vacutainer para suero con gel separador centrifugados a 3,500 rpm durante 10 minutos. El suero fue separado y almacenado a -70 °C hasta su análisis.

Biopsia de tejido adiposo café.

Posteriormente a la eutanasia de los animales y toma de muestra sanguínea por punción cardiaca, de inmediato se realizó una perfusión cardiaca para limpiar los tejidos con solución salina isotónica (fría) y se procedió a realizar la biopsia de tejido adiposo café.

La biopsia de tejido adiposo café fue extraída de la zona subescapular de la rata. Cada tejido obtenido se dividió en 2 lóbulos de los cuales uno de ellos se almacenó en una eppendorf de 2 mL rotulado con los datos correspondientes a su grupo y almacenado a -70°C destinado para su posterior procesamiento en BN-PAGE, mientras que el otro lóbulo fue almacenado en un tubo eppendorf de 2 mL con formalina buferada al 4% a un pH de 7.4 para su posterior análisis histológico. (Anexo 1)

Determinaciones séricas.

Bioquímicas.

Luego de la obtención sanguínea, mediante pruebas espectrofotométricas con kits comerciales, basadas en reacciones de oxidación y su posterior acople a reacciones colorimétricas cuya absorbancia se mide a 505 nm y es proporcional a la concentración de los analitos en la muestra. Los parámetros bioquímicos séricos que se determinaron fueron triglicéridos, colesterol, colesterol HDL, colesterol LDL, las cuales fueron analizadas en un espectrofotómetro automatizado Biosystem modelo A-25 con reactivos de la marca Spinreact. Mientras que los ácidos grasos libres se realizaron según el método reportado por Soloni en 1973, el cual se basa en la extracción con cloroformo y la posterior reacción colorimétrica con el reactivo de cuprizona. (Anexos 1-5)

Hormonas.

Las concentraciones séricas de las distintas hormonas leptina, adiponectina, T₃ (Libre) y T₄, se analizaron mediante la técnica de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) de manera automatizada con un equipo StatFax 4700. (*Anexo 6*)

Ensayos Tisulares.

Técnicas histológicas.

Una vez que el tejido fue fijado con formalina, las muestras se deshidrataron eliminando gradualmente el agua por medio de lavados con xilol y alcohol (*Anexo 7*) y finalmente se realiza la impregnación con parafina hasta la completa inclusión del tejido, tomando en cuenta la orientación del tejido. Los tejidos fueron cortados en un micrótopo Leica RM2125 a un grosor de 5 µm y colocados en portaobjetos previamente embebidos en poli-L-lisina al 0.1%, resguardándose hasta su uso para las diferentes técnicas utilizadas obteniendo 7 laminillas de cada subgrupo.

Hematoxilina & eosina

El análisis histológico se realizó con tinción una tinción hematoxilina & eosina utilizando procedimientos estándar las laminillas rotuladas adecuadamente con los tejidos de cada grupo experimental fueron desparafinadas, teñidas y rehidratadas por procedimiento estándar, las fotomicrografías de las estructuras fueron tomadas en un microscopio Optimus de campo claro con el objetivo de 20x, para su posterior análisis. (*Anexo 8*)

Inmunofluorescencia

Se incubaron secciones de tejidos para desparafinarse con calor seco en una estufa a 60°C, posteriormente se sumergieron las muestras en xilol, para quitar el exceso de parafina (5 min), enseguida se ingresaron al tren de deshidratación para realizar los lavados de la siguiente forma xilol (15 lavados), seguido de alcohol 50%-xilol 50% (15 lavados), alcohol absoluto (15 lavados), alcohol absoluto (15 lavados), alcohol al 96% (15 lavados), y finalmente se lavó con agua destilada (3 lavados) y se mantuvo en hidratación en buffer de fosfatos (PBS 1x). Posteriormente se siguió a la recuperación antigénica, la cual se realizó con una solución Diva Decloaker de BioCare dilución 1:10 a 60 °C por 40 min y se deja enfriar. Se realizó el bloqueo con una solución de albúmina al 2% en solución salina isotónica en frío. Se lavó y se colocó el anticuerpo primario diluido en albúmina libre de inmunoglobulina al 1%, toda la noche se cubrió con aluminio y se dejó incubando a 4°C, al día siguiente se lavó el exceso del anticuerpo primario y se colocó el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo en las mismas condiciones de dilución, únicamente por 2 horas, siempre en oscuridad, para teñir los núcleos se empleó DAPI y se protegen con vecta shield.

Los anticuerpos empleados en este protocolo fueron: PPAR-α (sc-398394 santa cruz), PPAR-γ (sc-7273 santa cruz), UCP-1(U6382 sigma) todos con una dilución 1:200, seguido de marcaje con anticuerpos secundarios con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en dilución 1:400 FITC anti-mouse (115-095-146) para PPAR-α y PPAR-γ, mientras que para UCP-1 se empleó rodamina anti-rabbit (111-295-144) (*Anexo 9*). De los cuales se obtuvieron fotomicrografías (objetivo de 40 x) empleando un microscopio de fluorescencia conectado a una cámara (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania), con el fin de semicuantificar y normalizar unidades arbitrarias (píxeles) empleado el programa ImageJ.

BN-PAGE

Para evaluar la actividad de los complejos I, IV en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la formación de supercomplejos, en el tejido adiposo café de los grupos experimentales, se realizaron corrimientos electroforéticos en condiciones nativas (Blue-Native Gel). Para ello primero se aislaron las mitocondrias de cada una de las muestras, medición de proteínas para lo cual se siguió el método Bradford (*Anexo 10*), y así calcular el volumen de carga, que correspondió a 100 µg de muestra, posterior a esto se realizó el tratamiento con digitoina al 20% para solubilizar la membrana mitocondrial y obtener los complejos proteicos. Finalmente se realizaron los corrimientos electroforéticos en condiciones nativas para logara la separación de los complejos por su peso molecular, para finalmente evaluar la actividad en gel (*Anexo 11*).

Análisis Estadístico

Se realizó una comparación entre grupos control y grupos problema de cada uno de los periodos de exposición a Cd, estos datos fueron recabados y procesados para obtener los siguientes parámetros estadísticos el promedio, la desviación estándar, y el error estándar de la media, los cuales fueron analizados mediante: ANOVA de 1 vía post hoc Bonferroni, para determinar si existen diferencias significativas respecto al grupo control. Lo anterior empleando el programa Graphpad prism Versión 9.0.

9.- Resultados.

Efectos del cadmio en la zoometría de la rata Wistar.

Para poder evaluar los cambios zoométricos de los grupos expuestos a cadmio, se monitorearon parámetros como talla, peso, IMC entre otros los resultados se encuentran graficados en la Figura 1.

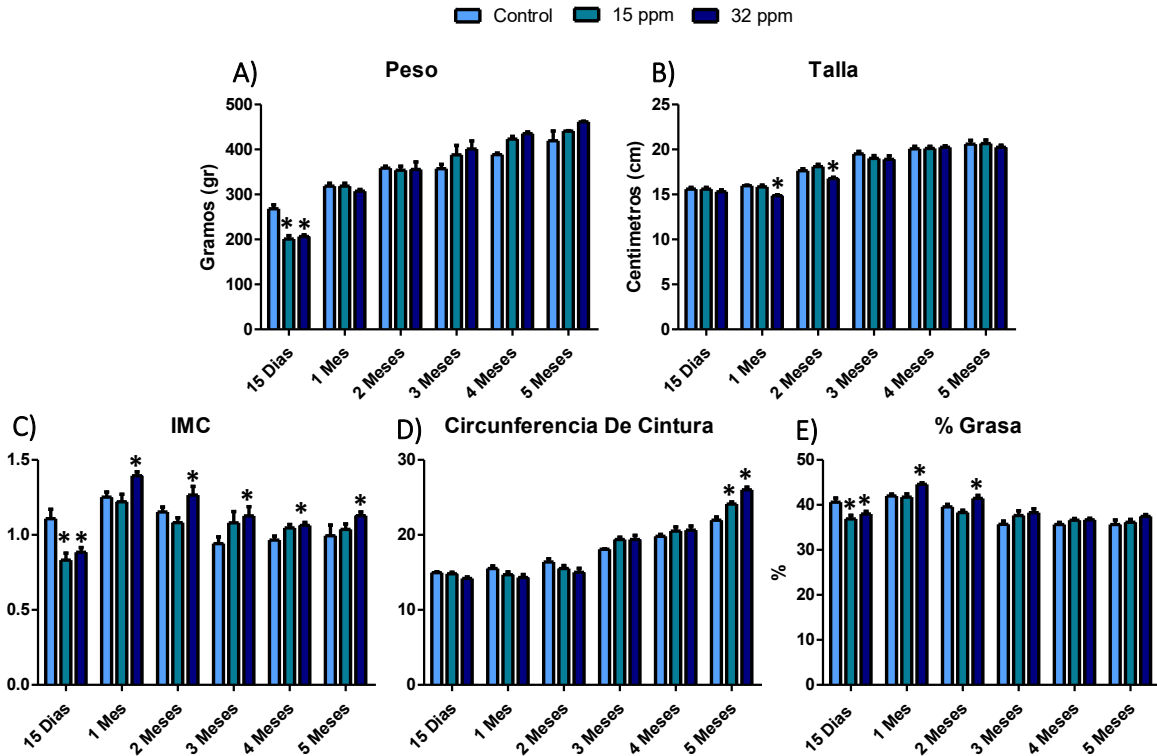


Figura 1. Evaluación de los cambios zoométricos. A) Peso. B) Talla. C) Índice de masa corporal. D) Circunferencia de la cintura. E) Porcentaje de grasa corporal. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

Al monitorear el peso de los animales se observó que hay un incremento en el peso de los animales expuestos a las dosis experimentales (Figura 1A), sin embargo, solo se aprecian cambios estadísticamente significativos a los 15 días de exposición ante ambas dosis experimentales la cuales muestran una disminución del peso de los animales del 24% (15 ppm) y 23% (32 ppm), y aunque hay una notable y gradual tendencia hacia el alza en el peso en los periodos posteriores, este incremento aun no muestra diferencias estadísticamente significativas al compararlos con el grupo control en los diferentes tiempos de exposición para ninguna de las dos dosis 32 ppm y 15 ppm.

En cuanto a la talla (Figura 1B), hubo una disminución que representaba cambios respecto al grupo control ante la dosis de 32 ppm al primer y segundo mes de exposición del 6% y 4% respectivamente, sin embargo, estas diferencias significativas no se observaron en los siguientes periodos de exposición ante ambas dosis de Cd. Al evaluar el índice de masa corporal (Figura 1C) se observó una baja en este parámetro ante la primer interacción con el modelo experimental mostrando descenso del 24% y 20% para 15 ppm y 32 ppm respectivamente, más tarde se apreció un incremento en los grupos

experimentales siendo los grupos expuestos a la dosis de 32 ppm los cuales mostraron un incremento del IMC del 11% (1 mes), 9% (2 meses), 43% (3 meses), 9% (4 meses) y finalmente del 18% (5 meses) los cuales al ser comparados con el grupo control representaban cambios estadísticamente significativos.

La circunferencia abdominal (Figura 1D) presento un patrón en el que ante los primeros meses de exposición a ambas dosis se puede notar un descenso en el parámetro de esta medida sin diferencias estadísticamente significativas. Es a partir del segundo mes de exposición ante ambas dosis cuando podemos apreciar incrementos en la medida de la circunferencia abdominal, siendo el 3er, 4º mes los que han incrementado respecto al grupo control, sin embargo, es en el 5º mes donde se observa el máximo del incremento de este parámetro en ambas dosis para 15 ppm del 9% mientras que para la dosis de 32 ppm del 18%.

El porcentaje de grasa (Figura 1E), en los primeros grupos de exposición al modelo estos bajan el porcentaje respecto al grupo control, pero estos descensos ante las dosis de exposición de 15 ppm y 32 ppm sin embargo estas bajas son estadísticamente significativas solo a los 15 días mostrando un 9% (15 ppm) y 7% (32 ppm). A pesar de que este parámetro incremento en los periodos posteriores de exposición este solo represento cambios estadísticamente significativos respecto al grupo control ante la dosis de 32 ppm al primer mes de exposición mostrando un 6% y al segundo mes con un 4% y aunque este incremento persistió en los periodos posteriores y aunque hay incremento del porcentaje de grasa respecto al grupo control estos mismos no presentan diferencias significativas.

Efectos de la exposición de cadmio sobre lípidos séricos.

El monitoreo periódico del panel de lípidos ante los diferentes tiempos de exposición se realizó con la finalidad de evaluar la dinámica sérica la movilización de lípidos, los gráficos obtenidos en estos análisis estadísticos se encuentran graficados en la Figura 2.

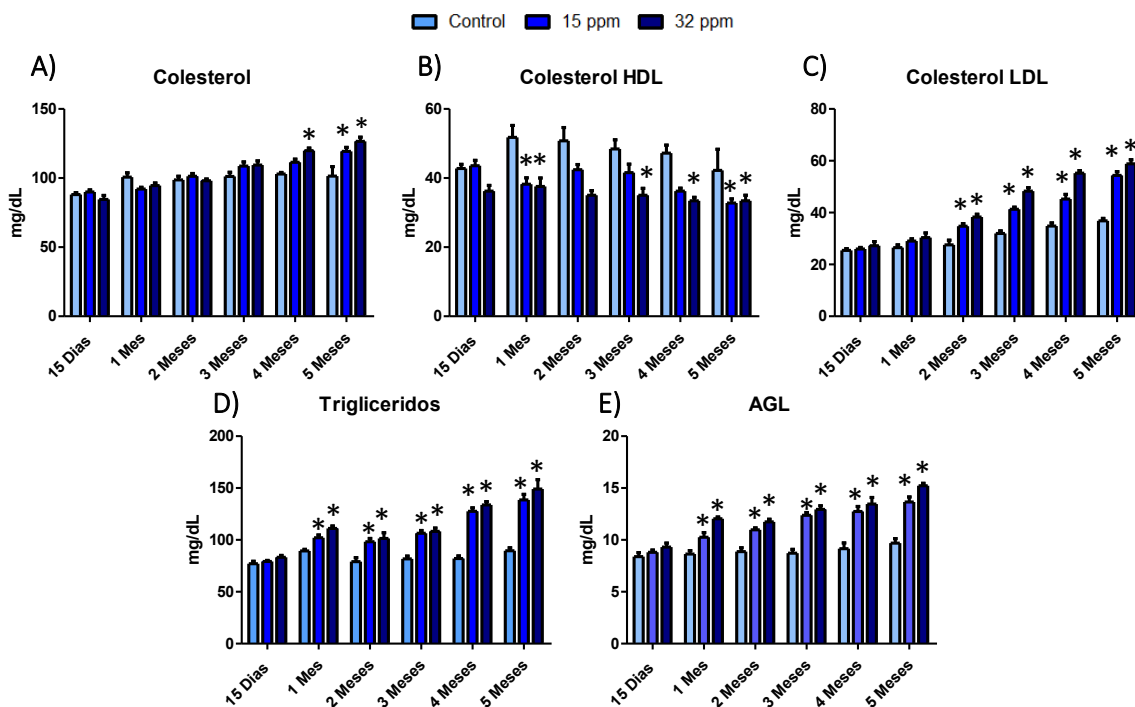


Figura 2. Lípidos séricos. A) Colesterol. B) Colesterol HDL. C) Colesterol LDL. D) Triglicéridos (TG), E) Ácidos Grasos Libres (AGL). Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos ± EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

En los grupos expuestos 15 días, 1 mes, 2 meses, 3 meses se apreció que los niveles séricos de colesterol total de los grupos experimentales mostraron un incremento gradual al ser expuestos a dosis 15 ppm y 32 ppm respecto al control (Figura 2A), siendo los grupos expuestos a dosis de 32 ppm los que mostraron un mayor incremento, sin embargo, al evaluar estos niveles a los 4 meses, se observa un aumento del 8% en el grupo 15 ppm, mientras que el grupo 32 ppm aumento 16% respecto a su grupo control. Finalmente, a los 5 meses de exposición ambos grupos mostraron aumentos con diferencias notables, las cuales fueron del 18% para el grupo 15 ppm y del 25% del grupo 32 ppm.

Los niveles séricos de Colesterol HDL disminuyeron desde el primer mes de exposición al Cd para ambos grupos, 15 ppm (26%) y 32 ppm (27%) (Figura 2B), a los 2 meses del 16% y 31%, a los 3 meses del 14% en ambos grupos, a 4 meses del 23% y 29%, y a los 5 meses fue de 32% y 31%, respecto al grupo control. Por el contrario, los niveles séricos de Colesterol LDL incrementaron estadísticamente después de dos meses en ambos grupos 26% y 39%, al tercer mes 29% y 51%, en el cuarto mes 30% y 58%, y al quinto mes 47% y 60% (Figura 2C).

Por su parte, la concentración de triglicéridos comenzó a mostrar en los grupos expuestos a Cd incremento estadísticamente significativo desde al primer mes 14% (15 ppm) y 24% (32 ppm) respecto al grupo control (Figura 2D), a los dos meses 24% y 28%, al 3er mes del 30% y 32%, al 4º mes del 56% y 63%, y en el quinto mes fue del 55% y 66%, respectivamente. Adicionalmente se determinó la concentración de AGL, los cuales se incrementan a partir del primer mes en 19% y 39% (Figura 2E), al segundo mes 33% y 32%, al tercer mes 42% y 48%, al cuarto mes 39% y 47%, y al quinto mes 41% y 57%.

Efecto de la exposición de cadmio sobre la concentración de hormonas.

Evaluamos la concentración de hormonas secretadas por el tejido adiposo blanco; leptina y adiponectina y hormonas tiroideas que activan termogénesis en el BAT (Figura 3). Los niveles de T_3 se incrementaron estadísticamente después de la exposición a cadmio hasta el primer mes solo para el grupo de 32 ppm siendo del 47%. Este incremento continuó mostrando diferencias estadísticamente significativas frente al respectivo grupo control en todos los periodos posteriores ante ambas dosis sin embargo este fue mayor en el grupo de 32 ppm, en el segundo mes fue de 30% y 79% para 15 ppm y 32 ppm, en el tercer mes fue de un 15 ppm fue del 32% y el de 32 ppm 85%, mientras que en el cuarto mes hubo un incremento en el grupo de 15 ppm (29%) y en el grupo de 32 ppm (69%) cuando se compara al grupo control. Por su parte, a los 5 meses de exposición este incremento se hace significativo para ambos grupos expuestos a Cd en 60% y 65 % para 15 ppm y 32 ppm respectivamente (Figura 3A).

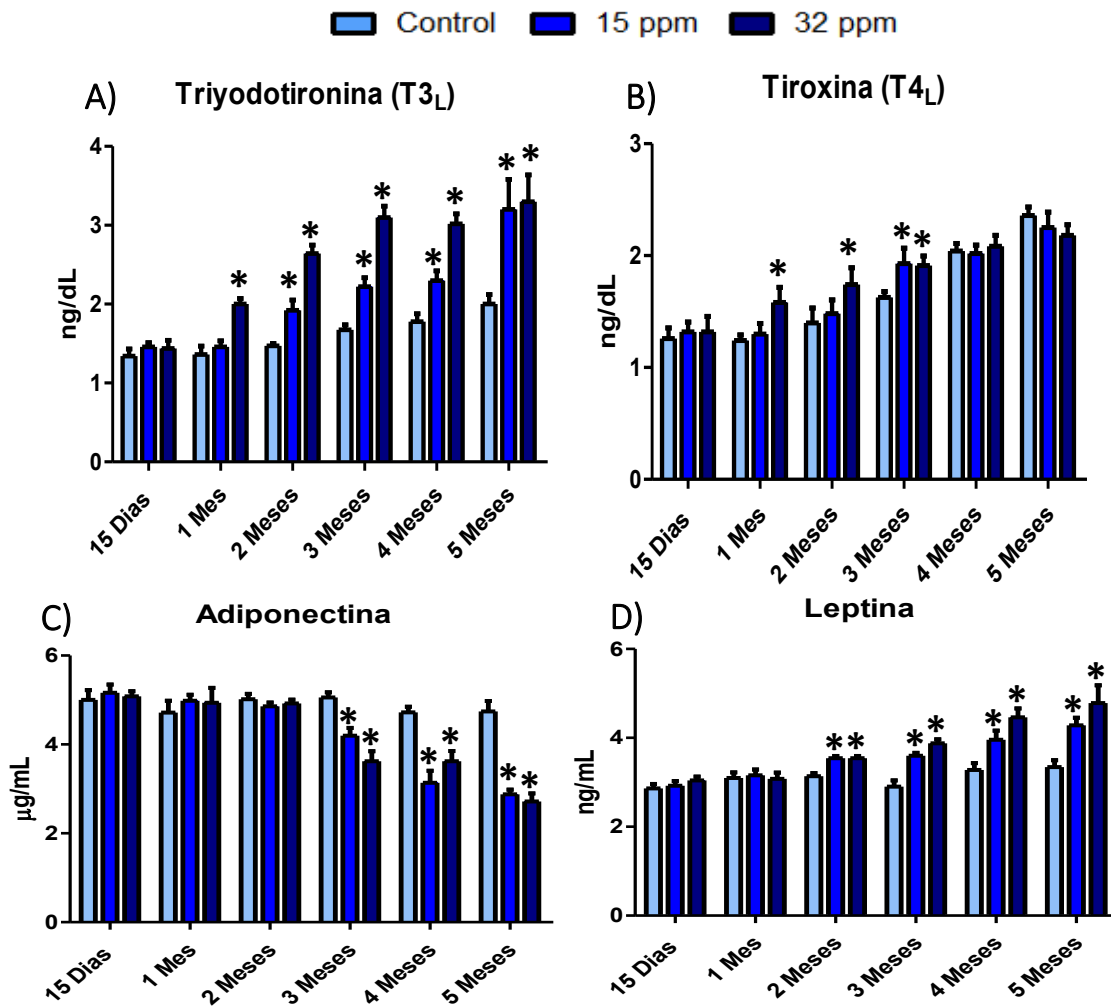


Figura 3. Evaluación de hormonas relacionadas con la función adipocitaria. Las barras muestran el promedio de 5 experimentos \pm EEM para cada periodo donde fueron evaluados los siguientes parámetros. A) Adiponectina. B) Leptina. C) Triyodotironina (T_3). D) Tiroxina (T_4). (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

Por su parte, a pesar de que se logran apreciar tendencias en el incremento de la hormona T₄ (Figura 3B) en ambos grupos expuestos a cadmio, esta tendencia presento cambios estadísticamente significativos al compararlos contra el grupo control solo en los grupos expuestos a la dosis de 32 ppm mostrando un incremento en el 1er mes del 6%, mientras que en el 2º del 11%, mientras que en 3º se presentó ambos grupos experimentales 15 ppm y 32 ppm un incremento del 6% y 10% respectivamente frente al grupo control.

Al evaluar la concentración de adiponectina (Figura 3C), se evidencio que a los dos meses se comienza denotar una disminución gradual en los niveles de esta hormona, pero no es hasta los tres meses en donde se observa una disminución significativa de forma estadística respecto al grupo control siendo esta disminución de 17% y 28% para el grupo 15 ppm y 32 ppm del respectivamente, a los 4 meses esta disminución se hace mayor, siendo de 33% para 15 ppm y del 23% para 32ppm, por su parte, al quinto mes se encontró la mayor diferencia significativa respecto al grupo control encontrando una disminución del 39% (15 ppm) y 42% (32 ppm).

Por su parte, los niveles de leptina tuvieron el efecto inverso en los grupos expuestos a Cd (Figura 3D), al igual que en otros parámetros los cambios se presentan a partir del segundo mes con un 12% (15 ppm) y 13% (32 ppm), en el tercer mes experimental se observan incrementos significativos del 24% para 15 ppm y del 34% para 32 ppm, en el cuarto mes este cambio mantuvo un incremento de 21% y 36% para los grupos 15 ppm y 32 ppm respectivamente, y nuevamente fue el quinto mes quien mostro los mayores porcentajes de incremento de leptina para los grupos 15 ppm del 28%, mientras que el expuesto a 32 ppm en un 43%.

Efecto de la exposición a cadmio sobre la morfología del tejido adiposo café.

En la Figura 4A se observa que la exposición crónica a Cd en ambas dosis de mínimo riesgo ocasionó hipertrofia en el BAT. Para corroborar esto se realizó un análisis cuantitativo, donde se contó el número de células por campo, el cual disminuye significativamente en los grupos experimentales 15 y 32 ppm, de manera gradual en dependencia del tiempo. A los 15 días hubo una baja en el número de células en el grupo de 15 ppm del 11%. En el segundo mes ante la dosis de 32 ppm hubo un cremento respecto al grupo control del 15%, mientras tercer mes el número de células fue 14% y 17% menor en los grupos 15 ppm y 32 ppm, en el cuarto mes fue de 11% y 18%, y finalmente, en el quinto fue del 20% y 27%, respectivamente.

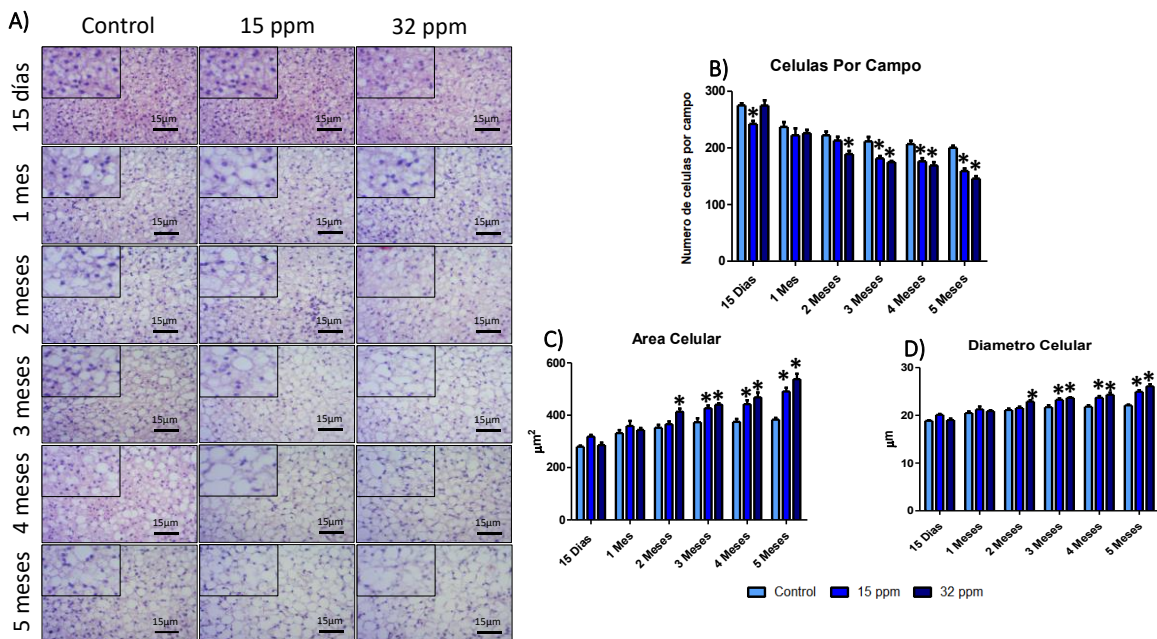


Figura 4. Evaluación de los cambios morfológicos en el BAT. A) Muestra cortes de tejido adiposo café (5µm) de la una tinción de hematoxilina & eosina de los grupos experimentales y el grupo control. Las barras muestran el promedio de 25 campos diferentes donde fueron evaluados los siguientes parámetros. B) Células por campo. C) Área Celular. D) Diámetro Celular. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni para los gráficos C y D, mientras que para el grafico B se aplicó ANOVA de una vía para no paramétricos con análisis post hoc de Dunn.

El análisis del área celular de los adipocitos marrones (Figura 4C) incrementó a partir de los dos meses de exposición el grupo 32 ppm (17%). Y a partir de los 3 meses de exposición incrementó en ambos grupos expuestos 14% (15 ppm) y 18% (32 ppm), a los 4 meses 18% y 25%, y a los 5 meses 28% y 40%, lo que indica una hipertrofia en del BAT asociada a la exposición crónica a Cd. Adicionalmente, se evaluó el diámetro de los adipocitos (Figura 4D), donde a partir del segundo mes en el grupo 32 ppm incrementó 8.3%, este indicador incrementó en las cohortes temporales de 3 a 5 meses ambos grupos expuestos a Cd, en 7%, 9% y 13 en el grupo 15 ppm; mientras que en el grupo 32 ppm incrementó 9%, 11% y 18%.

Efecto de la exposición a Cadmio sobre la expresión de factores de transcripción nucleares.

Primero se evaluó los efectos que tiene la exposición crónica a dosis de mínimo riesgo sobre la expresión de PPAR- α , mediante inmunofluorescencia (Figura 5A). El análisis de inmunorreactividad demostró que la expresión de este factor disminuye respecto al tiempo de exposición a Cd. En el grupo 15 ppm desde el primer mes se presentó una baja significativa en la expresión de PPAR- α que correspondió a 42%, a los 2 meses fue de 16%, al 3er mes fue de 28%, al 4º mes fue de 38.12 %, y al 5º mes fue del 30%. En el grupo de 32 ppm disminuyó en 55% (2º mes), 52% (3er mes), 34% (4º mes) y 43% (5º mes; Figura 5B).

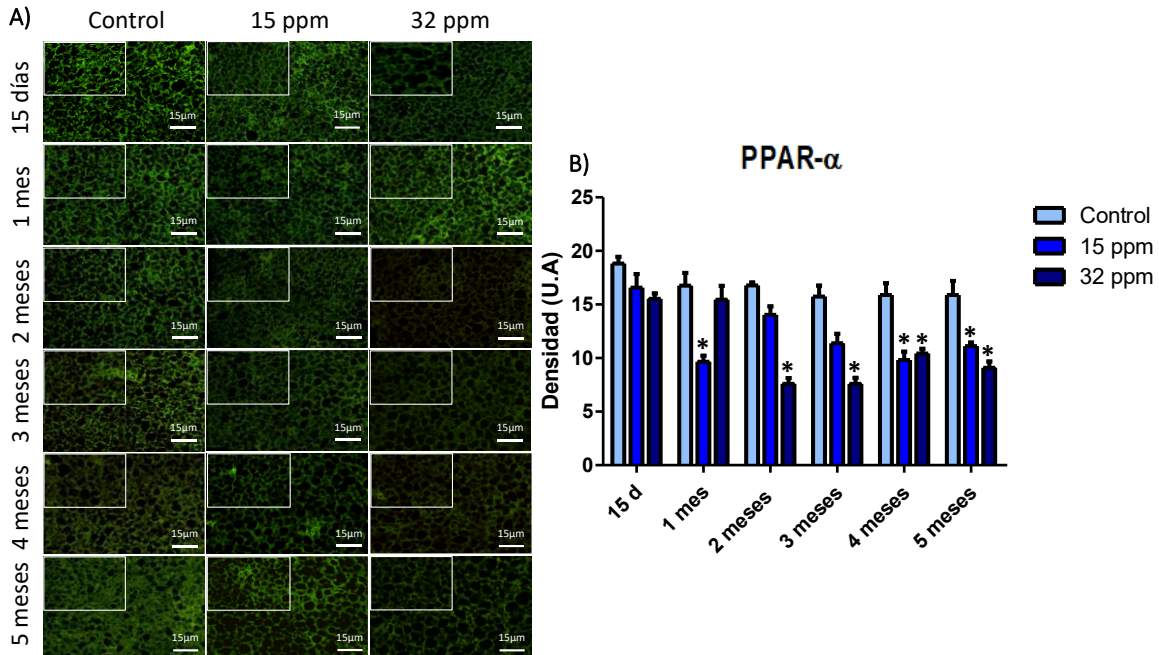


Figura 5. Inmunofluorescencia del receptor activado por el proliferador peroxisomal alfa. A) Muestra cortes de tejido adiposo café ($5\mu\text{m}$) de la inmunorreactividad para PPAR- α en los grupos experimentales y grupo control. B) Se muestra el análisis densitométrico de las fotomicrografías, las barras muestran el promedio de 20 campos diferentes. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

También evaluamos la expresión de PPAR- γ quien tuvo un comportamiento variable y mayormente al incremento en los grupos expuestos a Cd (Figura 6A). En el grupo 15 ppm la expresión de PPAR- γ incrementó 57% (15 días), 37% (2 meses), 25% (3 meses), y 25% (5 meses). Mientras que, en el grupo 32 ppm incrementó 65% (15 días), 26% (1 mes), 43% (2 meses), 41% (3 meses), 13% (4 meses) y 24% (5 meses; Figura 6B).

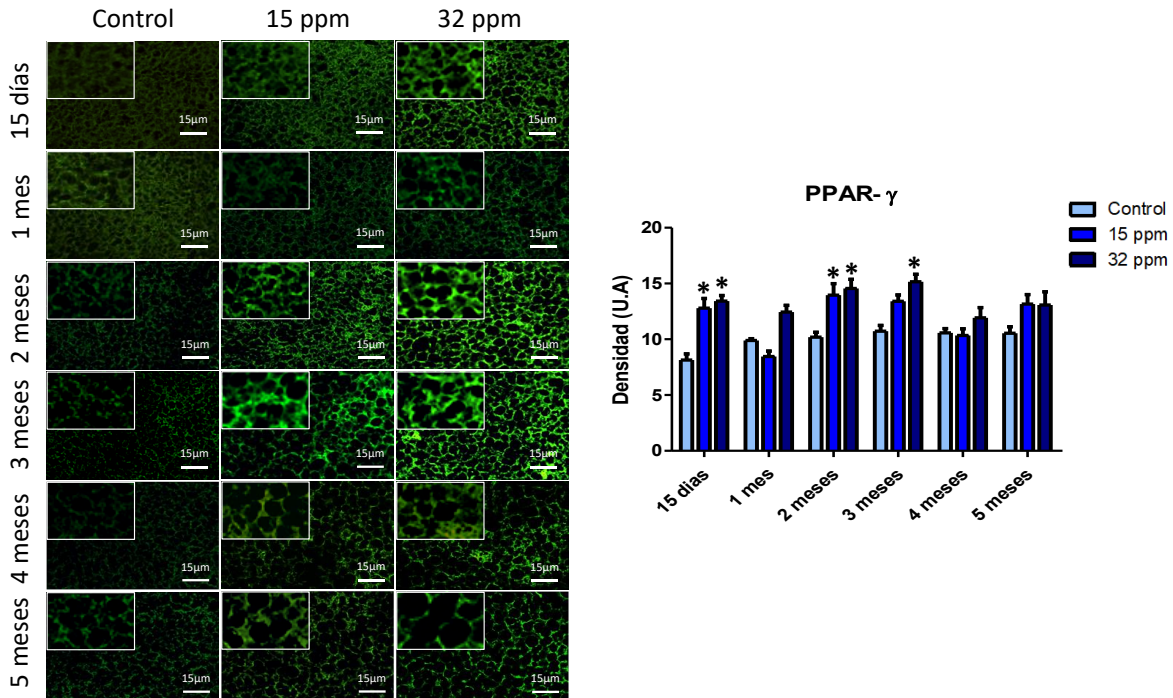


Figura 6. Inmunofluorescencia de receptor activado por el proliferador peroxisomal gamma. A) Muestra cortes de tejido adiposo café (5 μ m) de la inmunorreactividad para PPAR- γ en los grupos experimentales y grupo control. B) Se muestra el análisis densito métrico de las fotomicrografías, las barras muestran el promedio de 20 campos diferentes. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

Efecto de la exposición a cadmio sobre la expresión de la UCP-1

Debido a que se encontró un gradual descenso en la expresión de un factor de transcripción esencial para la expresión de genes termogénicos ante una exposición crónica a Cd a dosis de mínimo riesgo, se decidió evaluar la expresión de la proteína UCP-1 (Figura 7A). Interesantemente, se encontró que desde etapas muy tempranas de la exposición a Cd disminuye la expresión de esta proteína, encontrando diferencias estadísticamente significativas en los grupos expuestos (Figura 7B). A los 15 días disminuyó en 31% para el grupo 15 ppm y 25% para el grupo 32 ppm, a 1 mes fue del 29% y 13%, a 2 meses fue del 49% y 34%, a 3 meses fue de 37% y 28%, a los 4 meses fue del 27 % y 30 %, y a 5 meses fue del 69% y 60%, respectivamente.

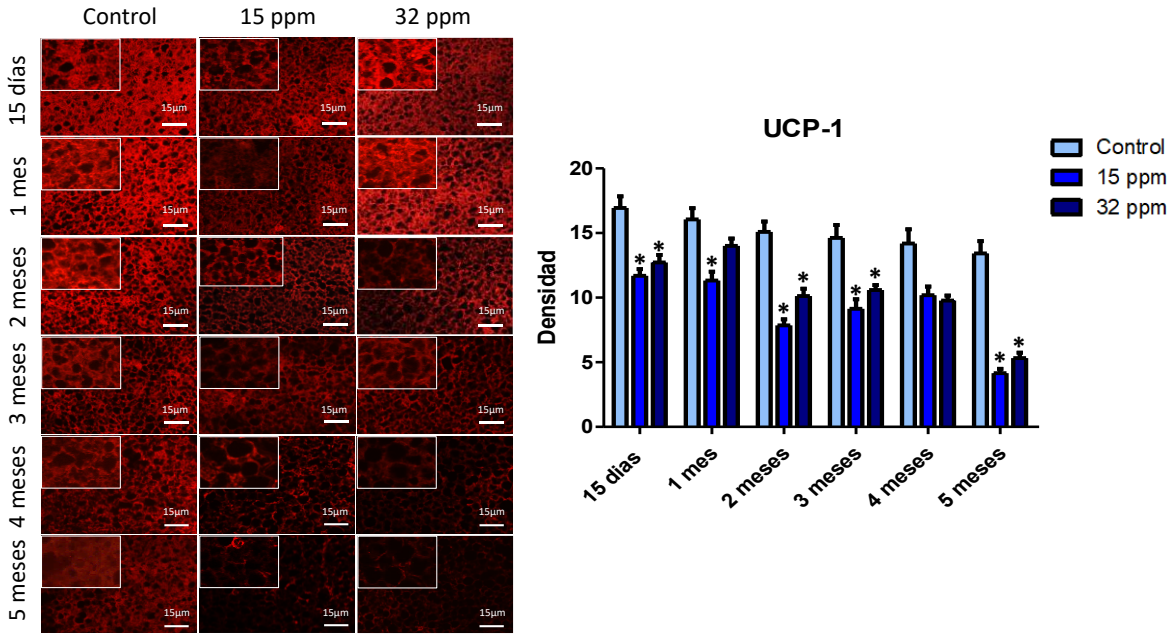


Figura 7. Inmunofluorescencia para la proteína desacopladora 1 (UCP-1). A) Muestra cortes de tejido adiposo café (5 μ m) de la inmunorreactividad para UCP-1 en los grupos experimentales y grupo control. B) Se muestra el análisis densitométrico de las fotomicrografías, las barras muestran el promedio de 20 campos diferentes. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

Efecto de la exposición a cadmio sobre la actividad mitocondrial del tejido adiposo café.

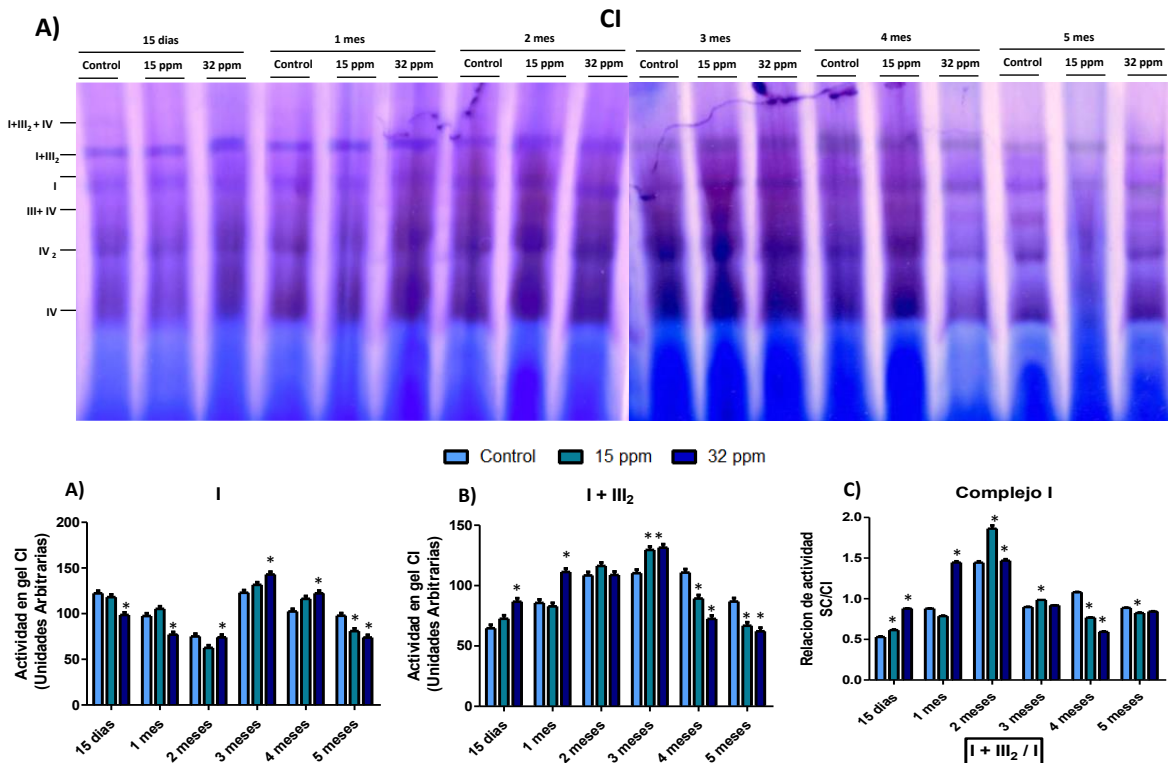


Figura 8. Efecto de la exposición a Cd sobre la actividad del complejo I y SC de la ETC mitocondrial en tejido adiposo marrón. A) BNGE mostrando la actividad de CI y SC (morado). B) Actividad en gel de CI libre. C) Actividad en gel del supercomplejo (I + III₂). D) Relación de la actividad del CI en SC. Los resultados mostrados son el promedio del análisis densitométrico de 3 experimentos ± EEM. () Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por ANOVA de una vía de una vía para no paramétricos con análisis post hoc de Dunn.*

La Figura 8A presenta el corrimiento electroforético, así como la actividad del CI de la CTE mitocondrial del tejido adiposo café. En la cual se observa el efecto sobre la actividad del monómero del complejo, donde se evidencia una disminución en los primeros tres tiempos de exposición. Sin embargo, solo el grupo expuesto a 32 ppm durante un mes mostró diferencia estadísticamente significativa. En el tercer mes de exposición, incrementó 16% su actividad en el grupo 32 ppm. Este incremento se presentó en el cuarto y quinto en los grupos 15 ppm (13% y 17%) y 32 ppm (19% y 24%).

Por otra parte, en la Figura 8B, se muestra la actividad del SC I + III₂. Ante la exposición a 32 ppm de Cd, incrementa la actividad respecto del tiempo en 19% (15 días) y 29% (1 mes). Esta tendencia se mantuvo hasta el tercer mes, donde se alcanzó el máximo de su actividad, incrementando en ambos grupos, 17% y 19% para 15 ppm y 32 ppm. No obstante, hacia la fase final de la exposición a Cd, se registró una disminución progresiva en su actividad, disminuyendo 19% y 23% en el grupo 15 ppm y 34% y 28% en el grupo 32 ppm al cuarto y quinto mes.

Por último, La Figura 8C muestra la relación I + III₂/I. En este SC, se encontró un incremento estadísticamente significativo en respuesta a la exposición a 32 ppm, con aumentos del 43% a los 15 días y del 63% al mes. El incremento también se observó a los 2 meses en el grupo expuesto a 15 ppm, con un aumento del 28%. Durante la fase final del modelo, se registraron disminuciones de la actividad del 29% y 45% para 15 ppm y 32 ppm en el cuarto mes. En el quinto mes, la disminución de la actividad continuó para 15 ppm y 32 ppm; no obstante, estos cambios no fueron estadísticamente significativos.

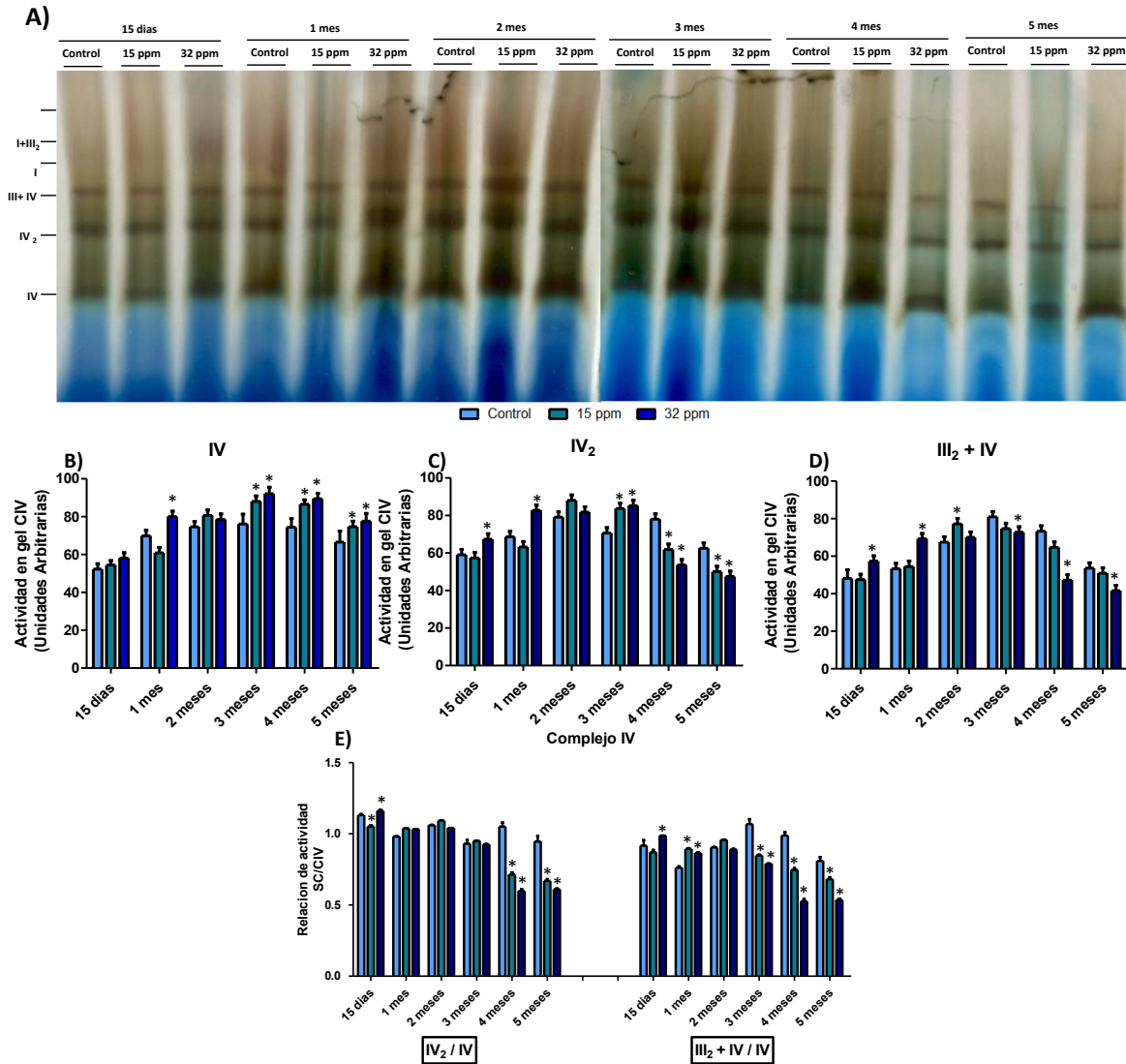


Figura 9. Efecto de la exposición a cadmio sobre la actividad del complejo IV y SC de la ETC mitocondrial en tejido adiposo marrón. A) BNGE mostrando la actividad de CIV y SC (café). B) Actividad en gel de CIV libre. B) Actividad en gel del dímero (IV₂). C) Actividad en gel del supercomplejo (III₂ + IV) D) Relación de la actividad del CIV en SC. Los resultados mostrados son el promedio del análisis densitométrico de 3 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por ANOVA de una vía de una vía para no paramétricos con análisis post hoc de Dunn.

La Figura 9A presenta el corrimiento electroforético, así como la actividad del complejo IV de la cadena de electrones mitocondrial del tejido adiposo café. En la Figura 9B, se observa que, tras la exposición al cadmio, la actividad del monómero del complejo IV aumentó gradualmente. Sin embargo, aunque en los tiempos cohorte de 15 días, 1 y 2 meses se percibe un incremento en la actividad, estos cambios no resultaron estadísticamente significativos. No obstante, a los 3, 4 y 5 meses se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas, registrándose incrementos del 15%, 16% y 12% en el grupo 15 ppm y 21%, 20% y 16% en el grupo 32 ppm.

Por otro lado, en la Figura 9C se presenta la actividad del dímero del complejo IV. Durante la primera etapa de exposición (15 días, 1 mes y 2 meses), se percibe un leve incremento en la actividad ante la exposición al cadmio, siendo más pronunciado en los grupos expuestos a 32 ppm. Sin embargo, solo el grupo expuesto a 32 ppm durante 1 mes mostró diferencias estadísticamente significativas, con un aumento del 20%. La actividad del dímero del complejo IV alcanzó su máximo incremento a los 3 meses, con aumentos del 18% y 20% para 15 ppm y 32 ppm. Mientras que, a los 4 y 5 meses se evidenció una disminución significativa de la actividad, con reducciones del 20% y 19% en el grupo 15 ppm y del 31% y 24% en el grupo 32 ppm.

En cuanto al supercomplejo $III_2 + IV$ (Figura 9D), los resultados mostraron un incremento en su actividad durante las primeras etapas de exposición, registrando aumentos del 19% a los 15 días y del 30% al mes. Posteriormente, a partir del tercer mes de exposición, se observa una tendencia decreciente en la actividad. Aunque esta disminución es visible en el gráfico, el análisis estadístico reveló que solo los grupos expuestos a 32 ppm durante 4 y 5 meses presentaron diferencias estadísticamente significativas, con reducciones del 35% y 22%.

Finalmente, la Figura 9D muestra la relación entre la actividad de los supercomplejos formados por el complejo IV y la actividad del monómero del complejo IV (IV_2/IV). Durante los primeros meses de exposición, se registró una tendencia al incremento. No obstante, a los 4 y 5 meses de exposición disminuyó estadísticamente, con reducciones del 31% y 29% en el grupo 15 ppm y en 42% y 35% en el grupo 32 ppm. Adicionalmente, la relación $III_2 + IV/IV$ mostró un incremento del 17% y 13% ante dosis de 15 ppm y 32 ppm durante el primer mes de exposición. Esta tendencia al alza se mantuvo durante la fase inicial de exposición al cadmio. Sin embargo, a los 3, 4 y 5 meses se presentó una disminución estadísticamente significativa del 20%, 24% y 29% en el grupo 15 ppm y del 25%, 46% y 35% en el grupo 32 ppm.

Discusión De Resultados.

Los trabajos más recientes de nuestro grupo de trabajo, han demostrado que, ante la exposición subaguda, subcrónica y crónica de Cd a dosis de mínimo riesgo por vía oral en diferentes concentraciones (NOAEL y LOAEL) en modelos murinos, se desarrollan alteraciones metabólicas, las cuales generan un fenotipo similar al síndrome metabólico y diabetes observado en humanos. El metal no puede metabolizarse en especies menos tóxicas, siendo el hígado, riñones, pulmones, testículos, próstata, corazón, sistema esquelético, sistema nervioso y sistema inmunológico los órganos blanco de la toxicidad del Cd (Moroni-González et al., 2023; Sarmiento-Ortega et al., 2025). Órganos donde el Cd genera alteración del equilibrio intracelular del calcio, la inducción de estrés oxidativo, la alteración de los procesos de señalización celular y alteraciones epigenéticas. Aunado lo anterior a causa de su bioacumulación lo que conduce a la disfunción y al daño tisular (Qu & Zheng, 2024). En cuanto a los efectos que tiene la exposición a dosis de mínimo riesgo de Cd sobre el WAT, se ha demostrado que induce resistencia a la insulina, inflamación, estrés oxidativo, hipertrofia, alteración en la producción de hormonas de origen adipocitario, lo que contribuye a la resistencia a insulina, lipólisis e intolerancia a la glucosa en el WAT (Sarmiento-Ortega et al., 2025). Sin embargo, aunque hay diversos artículos sobre los efectos tóxicos de la exposición a Cd, la mayor parte de esta información está centrada en el WAT, mientras que la información sobre el efecto en el BAT es nula.

La obesidad se define como la acumulación excesiva o anormal de grasa o tejido adiposo en el cuerpo, lo cual puede tener consecuencias adversas para la salud (Panuganti et al., 2023). Se ha demostrado que la expansión no saludable del WAT incrementa el riesgo de desarrollar síndrome metabólico. Esta expansión se caracteriza típicamente por hipertrofia de adipocitos, inflamación crónica y fibrosis, condiciones que se asocian con la resistencia a la insulina (Маклаков et al., 2004). La hipertrofia adipocitaria impacta en los parámetros zoométricos de los murinos, como se ha evidenciado en estudios previos realizados por nuestro grupo. En investigaciones anteriores, se reportó que la exposición crónica a Cd, incluso en dosis consideradas de bajo riesgo (15 ppm y 32 ppm), induce modificaciones significativas en la zoometría de la rata Wistar, observándose un aumento en el peso corporal, el perímetro abdominal, el índice de masa corporal (IMC) y el porcentaje de grasa corporal, factores que se correlacionan con el tiempo de exposición al Cd. Estos cambios se atribuyen a la hipertrofia del WAT visceral (Sarmiento-Ortega et al., 2017, 2025). En concordancia con estos hallazgos, nuestros resultados también indican un aumento gradual en las medias de IMC, peso, porcentaje de grasa, circunferencia abdominal y talla en las ratas expuestas al Cd, con un incremento estadísticamente significativo observado a los tres meses de exposición, siendo más pronunciado en el grupo expuesto a 32 ppm como se muestra en la Figura 1. Evaluación de los cambios Zoométrico.

Es muy claro que las dislipidemias ocasionadas son causadas principalmente debido a la resistencia a la insulina y que tiene 3 componentes principales; aumento de los niveles de triglicéridos, cambios en la composición de LDL y disminución de HDL. Sin embargo, estas características son asociadas al consumo de dietas hipercalóricas y condiciones como la obesidad (Howard, 1999). No obstante, la disrupción del metabolismo lipídico ocasionado por la exposición a Cd es un tema relativamente reciente, por lo tanto, la información a acerca de esto es escasa. En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, Sarmiento y colaboradores han demostrado que la exposición crónica a dosis de mínimo riesgo del xenobiótico, generan hiperinsulinemia e hiperglicemia la cual es tiempo y dosis dependiente de la concentración de Cd al que fueron expuestas. A través de modelos matemáticos

como lo son índice de HOMA-IR y de resistencia hepática a insulina LIRI, se describió que las ratas expuestas a Cd desarrollan resistencia a la insulina desde el primer mes de exposición, demostrando que la exposición a Cd tiempo- dosis dependiente causa alteraciones en la respuesta de la hormona, tanto en niveles NOAEL como LOAEL, siendo en esta última más temprana su observación. Además, al evaluar la activación del receptor de insulina se encontró hiperfosforilación de residuos de treonina (causando retroalimentación negativa) la cual se originó al primer mes de exposición y aumento periódicamente (Sarmiento, 2017).

La resistencia a la insulina se identifica como una respuesta biológica alterada en tejidos diana de la hormona, como el músculo esquelético y tejido adiposo, ocasionando una pobre captura de glucosa, ocasionando hiperglicemia la cual generara un aumento del estado hiperinsulinémico, induciendo lipogénesis y gluconeogénesis hepática (Courtney & Olefsky, 2007; Moroni, 2019).

Se ha descrito que, en condiciones de resistencia a la insulina, el hígado no tiene la capacidad de inhibir la gluconeogénesis, y de manera paradójica la lipogénesis es sostenida. Aunque está claro el papel clave que juega la resistencia a la insulina sobre la lipogénesis hepática, en el año 2017 Sarmiento y colaboradores demostraron el Cd en dosis NOAEL y LOAEL es un inductor mitogénico al activar la vía MAPK-ERK 1/2 secundaria a la generación de ROS e inflamación, la cual tiene una proteína en común (S6K) que está involucrada en la activación y translocación de transcritores nucleares como las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP1c), induciendo así la *lipogénesis de Novo*. La activación de este factor transcripcional favorece la expresión de enzimas clave como la glicerol 3-fosfato aciltransferasa mitocondrial (mGPAT), acelerando la vía glucolítica que sustenta la lipogénesis, al menos en la primer etapa del tiempo de exposición a Cd, mientras que enzimas como la acetil coenzima A carboxilasa (ACC α), la sintasa de ácidos grasos (FAS) y la diacilglicerol acil-transferasa 2 (DGGT2), tienen mayor peso en la segunda etapa de exposición del modelo dada por sustratos como ácidos grasos, por lo que al menos por esta vía, el Cd puede promover la lipogénesis hepática aunado a la resistencia a insulina (Sarmiento, 2017).

La *lipogénesis de novo* hepática es una ruta biosintética que genera lípidos destinados a ser almacenados o secretados en lipoproteínas. En nuestro trabajo observamos un aumento en la concentración sérica de triglicéridos desde el primer mes de exposición para el grupo experimental con la dosis de 32 ppm mientras que para el grupo de 15 ppm este se observa hasta el segundo mes. Estos valores se elevan conforme el tiempo de exposición al modelo avanza, es decir, son tiempo y dosis dependientes (Sarmiento-Ortega et al., 2017).

Con base en lo anterior, el comportamiento de las fracciones de colesterol también fue analizado, ya que se sabe que, mientras la lipogénesis sea mayor, también lo es la movilización. En este trabajo se encontró que, en respuesta a la exposición de Cd en ambas dosis, la concentración de las lipoproteínas de baja densidad incrementa y las lipoproteínas de alta densidad disminuye. Fisiológicamente, debido a que, el colesterol y los triglicéridos son insolubles en agua, estos deben asociarse a partículas complejas que tienen un núcleo hidrofóbico de lípidos no polares (ésteres de colesterol y triglicéridos), rodeado por una membrana hidrofílica que consta de fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteína; las cuales son llamadas lipoproteínas que permitan el transporte de lípidos hidrófobos como fosfolípidos, triglicéridos y colesterol en plasma para que estos lleguen desde el hígado a los tejidos periféricos y viceversa (Feingold & Grunfeld, 2000; Juárez Casso & Farzam, 2022; Sanders & Griffin, 2016).

Cuando en el hígado hay exceso de ácidos grasos o carbohidratos, estos son biotransformados en triacilgliceroles y ésteres de colesterol, que se empaquetan en VLDL y son liberadas a torrente sanguíneo para que sean captadas por los tejidos (Tejido adiposo uno de ellos). La actividad de lipoproteína lipasa (LPL), activada por un estímulo de insulina, libera ácidos grasos de los triacilgliceroles contenidos en las lipoproteínas. Los ácidos grasos liberados, ingresan a las células y se utilizan en procesos energéticos o se almacenan como triacilgliceroles. Por lo que, la resistencia a insulina impulsa la lipogénesis hepática (acelerada por la exposición a Cd), el flujo de lípidos hacia tejido adiposo, promoviendo su resguardo e hipertrofia (Feingold & Grunfeld, 2000; Juárez Casso & Farzam, 2022; Sanders & Griffin, 2016). Adicionalmente, el exceso de LDL está asociado a hipertrigliceridemia (Berneis & Krauss, 2002), como se observa en nuestros resultados, generan un mayor número de remanentes, dando así lugar a una mayor concentración de LDL en los grupos expuestos a 15 y 32 ppm. Este incremento sostenido de LDL podría explicar por qué vemos el fenómeno de hipercolesterolemia hasta el cuarto mes de exposición para la dosis de 32 ppm, ya que estas son lipoproteínas ricas en colesterol.

Clásicamente se creía que, la única función del tejido adiposo era el resguardo de grasa. Sin embargo, en años recientes se ha puesto de manifiesto que desempeña múltiples funciones, como la regulación energética, mantenimiento del metabolismo de carbohidratos y lípidos, secreción de adipocinas y termogénesis sin escalofríos (Estornino, 2023), solo por citar algunas de las más estudiadas. Con la finalidad de contrastar los resultados obtenidos en este proyecto, en este apartado nos enfocaremos en la influencia que tienen adipocinas como leptina y adiponectina en la dinámica metabólica de los lípidos ante la exposición a Cd, ya que el tejido adiposo tiene la capacidad de responder al flujo de nutrientes para igualar demandas metabólicas.

Estas dos hormonas son secretadas y funcionan como nexo entre adipocito y los tejidos implicados en el metabolismo de la glucosa, los lípidos y la energía. Estudios han evidenciado la importancia de la adiponectina en la proliferación celular y la diferenciación de preadipocitos en adipocitos maduros. Este proceso mejora el almacenamiento de lípidos y fomenta una expansión saludable del tejido adiposo, evitando así la acumulación de lípidos en otros tejidos, gracias a que favorece la adipogénesis y mejora la sensibilidad a la insulina (Fu et al., 2005). A nivel hepático se ha demostrado que estas hormonas suprimen la lipogénesis. Activan a través del sistema nervioso central y los nervios simpáticos α -adrenérgicos a la proteína quinasa AMP (AMPK) (fosforilando ACC-1 enzima limitante de la lipogénesis) y PPAR α que estimulan la beta-oxidación (Awazawa et al., 2009; Miyamoto et al., 2012). Particularmente, la adiponectina previene y evita la lipotoxicidad en diferentes tejidos promoviendo la quema de lípidos.

Además, la leptina regula el apetito y el metabolismo energético, actuando sobre el hipotálamo para controlar el balance energético. En cultivos de adipocitos reduce la acumulación de lípidos (William et al., 2002). Estudios *in vivo*, se ha demostrado la reducción de triglicéridos hepáticos y plasmáticos, al aumentar la oxidación de ácidos grasos y la cetogénesis (Huang et al., 2006). Aumenta el gasto calórico, promoviendo la actividad de tejidos con una alta tasa de gasto energético, como en el BAT (termogénesis sin escalofríos). En ratones (ob/ob) deficientes en leptina se ha registrado una baja temperatura corporal y disminución de UCP-1 en BAT (Harris et al., 1998).

Por lo que es importante tener en cuenta el funcionamiento endocrino del WAT y su influencia tanto en tejidos periféricos como en el BAT. Son escasos los estudios que evalúan los efectos que tiene la

exposición a Cd sobre la secreción y acción de estas hormonas, y cabe recalcar que nuestro modelo es el primero que evalúa la concentración sérica de esta hormona ante la exposición a dosis de mínimo riesgo de Cd. En este trabajo encontramos una tendencia inicial al alza de los niveles sérico de adiponectina. Sin embargo, a partir del tercer mes de exposición decaen los niveles de esta hormona ante la dosis de 32 ppm, y en el grupo 15 ppm hasta el cuarto mes, lo cual nos indica que los efectos observados en la disminución de la concentración de adiponectina ante la exposición a Cd son dosis y tiempo dependiente.

En otros estudios se ha observado que al administrar a ratones macho dosis de 0, 5, 10 y 20 $\mu\text{mol/kg}$ de Cd vía subcutánea durante 2 semanas disminuye la expresión de ARNm de la adiponectina (Kawakami et al., 2010). La administración vía subcutánea diaria durante 7 días de CdCl_2 en dosis de 0, 0.5 y 0.75 mg Cd/kg en ratones sin metalotioneína disminuye el nivel de expresión de adiponectina y la exposición en cultivos de estos adipocitos genero una supresión de la síntesis de lípidos e incremento la lipólisis (Kawakami et al., 2013). La disminución en la síntesis y secreción de adiponectina ante la exposición a Cd, limita su función beta oxidante en tejidos periféricos, por lo cual la quema de lípidos en tejidos periféricos se ve atenuada, esto corrobora y podría explicar en parte, los resultados observados en la dinámica de los lípidos séricos.

Mientras que para la leptina al igual que en el caso de la adiponectina la información es escasa ante la exposición a Cd, de acuerdo con algunos estudios informan que la expresión de leptina se redujo bajo la exposición al Cd dependiente de la dosis (Levy et al., 2000) y coincidiendo con los estudios de Kawakami donde postula también una baja en la expresión de leptina, aunque con diferentes dosis como se mencionó anteriormente (Kawakami et al., 2010, 2013). Nuestros resultados son opuestos a lo reportado en otros estudios, ya que en la primera etapa de exposición no observamos diferencias significativas respecto a los controles. Sin embargo, en el tercer mes podemos apreciar como ante la exposición a 32 ppm hay un incremento significativo en los niveles séricos de leptina mientras que para la dosis de 15 ppm suceden hasta el quinto mes de exposición.

Actualmente la información acerca de cómo se disrumpe este mecanismo fisiológico es sumamente escasa, lo anterior puede estar fundamentado en mecanismo potenciales que proponen que, a raíz de una expansión no saludable del tejido adiposo, se incrementa la secreción de leptina. Sin embargo, se ve atenuada su acción, coincidiendo con estados hiperleptinemicos con resistencia a dicha hormona, el cual hasta la fecha no se había reportado en la exposición a Cd. Dentro de los mecanismos potenciales para estos cambios, se incluyen procesos que disminuyen la señalización celular del receptor de leptina, por estados inflamatorio u oxidativos. Existen reportes *in vivo* que sugieren que, SOCS-3 una proteína en respuesta a citocinas inflamatorias, inhibe la vía de señalización de leptina e insulina. Por lo tanto, la actividad excesiva de SOCS-3 en células sensibles a la leptina es un mecanismo potencial para la resistencia a la leptina (Bjørnbæk et al., 1999), por lo que el Cd podría de manera indirecta ser un activador de SOCS-3, a través de la inflamación y estrés oxidativo, como la vía JAK/STAT (Carow & Rottenberg, 2014).

Por otro lado, las hormonas tiroideas tienen un efecto directo en el BAT al inducir beta oxidación. La forma inactiva de la hormona tiroidea, T_4 , y su forma activa, la T_3 , regulan los procesos metabólicos encargados de gestionar el uso de energía. En el BAT, la actividad de estas hormonas está regulada por la desyodasa tipo 2, que cataliza la conversión de T_4 en T_3 (Arrojo E Drigo et al., 2013; Bianco & Kim, 2006). Se sabe que esta hormona desempeña un papel clave en el equilibrio energético y en el funcionamiento adecuado del organismo. En relación con nuestra investigación, existen estudios que destacan sus beneficios en el metabolismo basal, la termogénesis, la biogénesis mitocondrial y la regulación de grasas y carbohidratos.

Estas hormonas incrementan tanto la síntesis como el número de proteínas mitocondriales, lo que evidencia su papel crucial en la estimulación de la biogénesis y la actividad mitocondriales (Lesmana et al., 2016; Sinha et al., 2015). En experimentos con adipocitos primarios de BAT de ratones hipertiroideos tratados con T₃ (10 µg/100 g de peso corporal) durante 10 días, se observó un aumento en la oxidación de ácidos grasos, la respiración mitocondrial, el flujo autofágico, la mitofagia y la biogénesis mitocondrial. Se ha demostrado que el gen UCP-1 está regulado de por la T₃, y que en ratones hipotiroideos por la ablación de la desyodasa tipo 2 (-/-) en el BAT altera la termogénesis adaptativa y la aparición de hipotermia indicativos de disfunción del tejido (Christoffolete et al., 2004).

Nuestros resultados muestran un incremento constante en los niveles de T₃ séricos desde el primer mes de exposición a Cd indicando que los efectos apreciados en el tránsito sérico de esta hormona son tiempo-dosis dependiente. Para el caso de T₄ observamos una ligera tendencia hacia el alza la cual es mayor en la dosis de 32 ppm, esta tendencia permanece hasta el final del tiempo de exposición, sin ser estadísticamente significativos.

La toxicidad endocrina del Cd puede causar alteraciones en la función tiroidea, como hiperfunción o hipofunción. La tirotoxicidad química se refleja en niveles desajustados de T₄, T₃ o de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), que son indicadores comunes de la función tiroidea en humanos y animales de laboratorio (Buha et al., 2018). Reforzando nuestros resultados existen estudios que demuestran que, al analizar los niveles plasmáticos y urinarios de Cd, también incrementan los niveles de T₃ y T₄ totales y libres, mientras se reducen los niveles de TSH, lo que sugiere un posible hipertiroidismo subclínico (Yorita Christensen, 2013; Hammouda et al., 2008; Sun et al., 2018).

Este aumento en la circulación sérica de las hormonas tiroideas podría estar relacionado con un intento del organismo por recuperar la homeostasis, alterada debido a los efectos tóxicos del Cd. Proceso que busca restaurar la actividad termogénica del BAT, que expresa bajas cantidades de UCP-1, cuya síntesis es estimulada por la T₃. Además, los resultados obtenidos por Sun en 2018, indican que la exposición al Cd reduce la expresión del receptor de esta hormona y de la desyodasa tipo 2, dos elementos cruciales para el funcionamiento adecuado del BAT (Sun et al., 2018). Lo anterior es relevante dado que fisiológicamente la concentración de T₄ en el suero es mayor que la de T₃, para evitar efectos fisiológicos excesivos y preservar la homeostasis metabólica. Por lo tanto, sugerimos que esta podría ser la razón detrás de la disminuida sensibilidad del tejido a la acción de la T₃ en la capacidad termogénica del tejido adiposo marrón después de la exposición a Cd.

Se ha demostrado que el cadmio ingresa a las células de diversos órganos y ejerce su toxicidad al interferir en rutas metabólicas, un efecto atribuido al mimetismo molecular. Este fenómeno le permite imitar la estructura y función de metales esenciales como Fe²⁺, Zn²⁺ y Ca²⁺, al desplazarlos logra ingresar a las células de los órganos a través el mecanismo de transporte de metales y el metabolismo del calcio (Chmielowska-Bak et al., 2013). Nuestro grupo de trabajo ha evidenciado que la exposición a dosis de mínimo riesgo eleva los niveles séricos de cadmio a partir del tercer mes, manteniéndose en ascenso hasta el quinto mes. Análisis posteriores confirmaron su acumulación en órganos metabólicamente activos, incluido el tejido adiposo epididimal, donde la exposición a 15 ppm resultó en 0.30-0.42 µg/g de tejido, mientras que con 32 ppm este valor se triplicó (Sarmiento-Ortega et al., 2025). Según investigaciones previas, se ha observado que, tras la exposición a una concentración de 100 mg/L de cadmio en el agua potable durante 18 semanas, este metal se acumuló en mayor cantidad en el BAT que en el WAT (Zhu et al., 2024). Basándonos en estos antecedentes, nuestro

proyecto se enfocó en evaluar si la exposición a dosis de mínimo riesgo de Cd tiene efectos tóxicos sobre el BAT en ratas Wistar.

Los distintos fenotipos de los adipocitos en mamíferos les permiten cumplir tareas opuestas unos de otros, ya que mientras el WAT almacena el exceso de energía en forma de triglicéridos, el BAT promueve la β -oxidación para disipar en forma de calor el exceso de triacilgliceroles a través de la UCP-1 presente en sus mitocondrias (Corrales et al., 2018). Gracias a la acción de los factores de transcripción los cuales son proteínas que controlan la transcripción genética, asegurando que los genes adecuados se expresen en las células correctas y en el momento preciso (Khan Academy, n.d.). Nosotros evaluamos la expresión de los receptores activados PPAR, específicamente las isoformas PPAR α y PPAR γ importantes en el metabolismo lipídico en el tejido adiposo marrón, que actúan como sensor de lípidos, hormonas, vitaminas y metabolitos endógenos. Los PPARs ejercen su control transcripcional sobre genes que albergan elementos reguladores sensibles a PPAR (PPRE) en asociación con los receptores X de retinoides (RXR), estos se encuentran ampliamente distribuidos en diversos órganos donde ejercen acciones como sensores de lípidos y reguladores del metabolismo de los lípidos (Berger & Moller, 2002).

A raíz del incremento en la prevalencia de la obesidad con los trastornos metabólicos asociados y apreciando las funciones y amplia distribución de los PPARs, se ha buscado dar un mejor enfoque del papel de los PPAR en estas dinámicas patológicas. Sin embargo, se ha hecho a un lado el papel que estas tienen ante estímulos nocivos ocasionados por la exposición crónica a metales pesados como el Cd, a raíz de ello en nuestro trabajo es el primero en evaluar la expresión de estas isoformas ante la exposición de dosis de mínimo riesgo en el BAT.

El fenotipo β -oxidativo del BAT, es su principal distintivo. En el WAT existen altos niveles de PPAR γ y bajos de PPAR α , mientras que en el BAT se expresan niveles elevados de ambos (Kelly et al., 1998; Shen et al., 2020). En términos de funcionalidad del BAT, es crucial mantener un equilibrio en la expresión de los PPARs. Ya que son reguladores transcripcionales esenciales que contribuyen tanto a aumentar la capacidad de almacenamiento como de efectos prooxidantes (Corrales et al., 2018). Recientes investigaciones, como las realizadas por Shen y colaboradores, han destacado la importancia del equilibrio en la dinámica de PPARs en el BAT. Al exponer ratones a agonistas de PPARs y bajas temperaturas, identificaron sitios genómicos compartidos por PPAR α y PPAR γ , que incluyen un subconjunto de 16 genes, entre ellos *Ucp1*, cuya expresión está regulada por ambos PPARs. Estos sitios genómicos compartidos son claramente relevantes para la termogénesis (Shen et al., 2020).

Estudios indican que PPAR α regula el metabolismo hepático, la inflamación y la aterogénesis al estimular la oxidación de ácidos grasos en mitocondrias y peroxisomas. Su ausencia afecta la función del BAT, generando hipotermia y niveles elevados de ácidos grasos libres en sangre (Kersten et al., 1999; Lalloyer et al., 2011). Estudios demuestran que el tratamiento con agonistas selectivos de PPAR α tuvieron un aumento del gasto energético, además del aumento de la expresión de genes relacionados con la termogénesis en el BAT como los genes implicados en la termogénesis como PPAR- α , coactivador 1 α de PPAR- γ , factor respiratorio nuclear 1, factor de transcripción mitocondrial A, PRDM16, receptor adrenérgico β -3, y proteína desacopladora 1 (Rachid et al., 2015). *In vitro*, se ha demostrado que PPAR α está involucrado en la inducción PGC-1 α que a su vez un mecanismo para la inducción concertada de genes termogénicos como UCP-1 en ratones (Hondares et al., 2011).

Tras su descubrimiento, se reconoció a PPAR γ como uno de los principales reguladores del desarrollo de las células adiposas, manteniendo la expresión del fenotipo de resguardo lipídico en el WAT. Esto se confirmó con investigaciones que mostraron cómo mejora la sensibilidad a la insulina al coordinar procesos metabólicos como la adipogénesis, el transporte de lípidos, la lipólisis y la secreción de adipocinas. Estudios muestran que en ratones con ablación de PPAR γ 2 en un contexto (*ob/ob*) mostraron una falta de la capacidad de expansión del WAT, lo que desencadena resistencia a la insulina, insuficiencia de las células β , dislipidemia y lipotoxicidad en múltiples tejidos (Medina-Gomez et al., 2007; Rosen et al., 1999).

Los estudios de la desregulación de PPARs ocasionados por la exposición a Cd son escasos, y en su mayoría están centrados en la expresión de PPARs en el hígado como los descubrimientos de Wang y colaboradores donde al exponer a lechones a una dieta suplementada con $15 \pm 0,242$ mg/kg de CdCl₂, se activa la vía AMPK/PPAR- γ /NF- κ B, inhibiéndose sinérgicamente PPAR- γ en el hígado (H. Wang et al., 2022). En ratones tratados con inyecciones intraperitoneales de CdCl₂ a una dosis de 1.0 mg/kg de peso corporal cada dos días durante 5 semanas se presenta una alteración metabólica de lípidos asociada a la vía de señalización de PPAR (Zeng et al., 2023). Además, al exponer ratones a 100 mg/L de CdCl₂ en agua durante 2, 4 y 18 semanas, se observó una alteración en la expresión génica con un aumento en la expresión de PPAR α , PRDM16 y UCP-1 en WAT, lo que resulta en una mayor tolerancia al frío (Zhu et al., 2024). Diversas investigaciones han evidenciado que el Cd induce la activación de NF- κ B, lo que provoca un incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- α , en células monocíticas (Freitas & Fernandes, 2011); los cuales está demostrado inhiben la actividad PPAR γ (Ye, 2008).

Nuestros hallazgos representan el primer estudio en explorar la dinámica de los PPARs en el tejido adiposo marrón bajo una exposición crónica a dosis de mínimo riesgo de Cd. Observamos que, la exposición crónica al metal induce una disminución constante y pronunciada en los niveles de expresión de PPAR α , la cual se manifiesta desde el segundo mes de exposición para la dosis de 32 ppm y hasta los 4 meses para la dosis de 15 ppm. Además, evidenciamos un aumento periódico en la expresión de PPAR γ de una forma tiempo y dosis dependiente. La pérdida del equilibrio entre PPAR α y PPAR γ tiene una influencia directa sobre la inducción del fenómeno de “blanqueamiento” del BAT. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis que a consecuencia de las disrupciones metabólicas causados por la exposición a Cd, inducen el blanqueamiento de tejido adiposo café asociada a una mayor expresión de PPAR γ y una disminución en la expresión de PPAR α .

Se ha identificado que el BAT es exclusivo de los mamíferos. Desde el hallazgo de tejido adiposo marrón activo en adultos en 2013, junto con la observación de su baja actividad en personas obesas y sedentarias, las investigaciones se han enfocado en descubrir las proteínas responsables de su función. Esto llevó a la identificación de la UCP-1, que se activa mediante ácidos grasos de cadena larga y es exclusiva del tejido adiposo marrón. Se ha confirmado que esta proteína es funcional y está presente tanto en humanos como en roedores, con una función de BAT relativamente comparable en ambas especies (Esteve Ràfols, 2014; Ježek & Garlid, 1998; Porter et al., 2016).

Se determinó que esta proteína es la responsable de la acción termogénica del BAT al estar altamente expresada en las mitocondrias de los adipocitos marrones donde desacopla el gradiente de protones generado por la cadena de transporte de electrones mitocondrial el cual en vez de ser empleado para la síntesis de ATP a través de complejo V (ATP sintasa), gracias a su alta expresión en mitocondrias

esta proteína funciona como un simportador que transporta ácidos grasos de cadena larga⁻/protones⁺, gracias ello disipa el gradiente de protones en forma de calor al permitir que los protones fluyan de nuevo a través de la membrana mitocondrial interna sin pasar por la ATP sintasa (Fedorenko et al., 2012). Se ha demostrado el papel esencial de la alta expresión y actividad de UCP-1 en BAT mejora la obesidad y resistencia a la insulina (Kozak & Anunciado-Koza, 2008), ya que se ha demostrado que la inducción de la actividad beta oxidante mejora condiciones como la obesidad mientras que su disminución se asocia con la expansión del tejido adiposo (resguardo de lípidos) (Gyurina et al., 2023).

Nosotros evidenciamos una disminución en la expresión de UCP-1 desde los 15 días de exposición a Cd, esta disminución es constante respecto del tiempo de exposición, indicando que estos efectos sobre la expresión de UCP-1 son tiempo y dosis dependientes. Hipotetizamos que el metal inhibe su expresión secundariamente a raíz de las disrupciones metabólicas asociadas, como la resistencia a insulina, dislipidemia, disglucemia, alteración de hormonas tiroideas, que en conjunto afectan el equilibrio PPAR γ /PPAR α y la expresión de UCP-1. Por lo tanto, se sugiere que la baja expresión de UCP-1 desde etapas tempranas de exposición al Cd, contribuye al blanqueamiento del BAT al inhibir a uno de los pilares más importantes de la termogénesis.

En este sentido, la hipertrofia de los adipocitos se define como el aumento de su tamaño debido a un exceso energético prolongado, lo que genera un incremento en su resguardo y, por lo tanto, su tamaño. Este proceso refleja una interacción compleja entre el balance energético y factores genéticos, factores transcripcionales, el flujo de lípidos y el microambiente celular lo que contribuyen a la expansión del tejido adiposo (Horwitz & Birk, 2023). Nuestros resultados muestran que el BAT expuesto a Cd se vuelve hipertrófico, al incrementar su tamaño/diámetro/área de las células, el cual es ligeramente más marcado en la dosis de 32 ppm desde los dos meses de exposición, lo que demuestra nuevamente un efecto son tiempo y dosis dependiente.

Aunque el BAT es un tejido termogénico protector contra la obesidad, su función puede verse comprometida por el exceso calórico, que puede deberse a un mayor consumo nutrimental o a la disminución de quema calórica inclusive con aporte “normal” de macronutrientes, lo que disminuye su capacidad para disipar energía y contribuye al desequilibrio metabólico. Este es un fenómeno llamado “blanqueamiento” en el que los adipocitos multiloculares se transforman en células uniloculares, perdiendo gradualmente sus características y adoptando propiedades fenotípicas similares al WAT. Acumulando lípidos y observando una menor oxidación de sustratos asociado a una disfunción mitocondrial. Este cambio, ligado al deterioro de los mecanismos que regulan la termogénesis, puede derivar en complicaciones metabólicas como el incremento de la inflamación, el estrés oxidativo, un incremento de la resistencia a insulina y un mayor flujo de ácidos grasos libres al tejido adiposo marrón (Ziqubu et al., 2023; Rangel-Azevedo et al., 2022).

La mayoría de los estudios sobre el blanqueamiento del BAT se basan en obesidad, deficiencia del receptor de leptina, el deterioro en la señalización β -adrenérgica y la falta de lipasa pueden provocar infiltración de macrófagos, muerte de adipocitos marrones (Kotzbeck et al., 2018). Sin embargo, aunque el blanqueamiento del BAT es multifactorial, estas dinámicas están ampliamente descritas ante una inducción por dietas hipercalóricas. Sin embargo, la información acerca del papel del Cd en el cambio del fenotipo y disfunción del del BAT es prácticamente nulo, y hasta la fecha según nuestro conocimiento no existen reportes que muestren dicho efecto. Por lo que nuestro trabajo es el primero

en demostrar que la exposición crónica a dosis de mínimo riesgo de Cd afecta la arquitectura celular del BAT mostrando una disfunción que asemeja al WAT.

Este “blanqueamiento” del tejido marrón está fuertemente asociado con disfunción de diversos organelos celulares, principalmente con la disfunción mitocondrias, ya que este organelo tiene un papel esencial para el mecanismo termogénico desacoplado de la habitual síntesis de ATP a través de la CTE (Kotzbeck et al., 2018). Debido a la función crucial de las mitocondrias en el BAT, se han desarrollado diversos métodos para evaluar la actividad de los complejos de la ETC mitocondrial, lo que permite evaluar la función de las mitocondrias (Frazier et al., 2020). En este contexto, evaluamos la actividad de la CTE de las mitocondrias del BAT en los grupos expuestos a Cd mediante la actividad de los complejos y super complejos de la CTE, mediante PAGE.

Nuestros resultados mostraron que la exposición a Cd, genera una disminución de la actividad del complejo I en su forma monomérica en los tiempos más cortos de exposición (15 días, 1 mes y 2 meses), mientras que en el caso de la actividad del supercomplejo (I + III₂) en este mismo periodo de tiempo aumentó, lo cual podría deberse a un periodo de adaptación o compensación por parte del tejido debido a la alta presión metabólica ocasionada por el incremento del tránsito sérico de ácidos grasos y triglicéridos. Sin embargo, en la segunda etapa de exposición al Cd, el modelo evidencia como la actividad del complejo en su forma monomérica aumenta para después de caer en el quinto mes de evaluación. Mientras que la actividad del supercomplejo (I + III₂) tiene un máximo de actividad, sin embargo, rumbo al final del tiempo de evaluación su actividad decae drásticamente. Estos efectos fueron mayores en el grupo 32 ppm.

Por su parte la relación (I + III₂ / I) ante la exposición temprana a Cd incrementó su actividad y formación del supercomplejo I + III₂, lo que disminuye su forma monomérica. Sin embargo, a tiempos más prolongados de la exposición al metal observamos un incremento de la actividad de su forma monomérica lo que indica que hay menos formación y actividad del supercomplejo I + III₂. La actividad del complejo IV monomérico, dimérico (IV₂) y el supercomplejo (III₂ + IV) muestran una tendencia en el incremento de su actividad. La actividad del monómero IV incrementa en ambas dosis, mientras tanto la actividad de dímero (IV₂) disminuye drásticamente en ambos grupos expuestos a cadmio siendo mayor en grupo de 32 ppm. Aunque la actividad del supercomplejo (III₂ + IV) también disminuye en ambos grupos expuestos a Cd, solo el grupo expuesto a 32ppm representa cambios estadísticamente significativos. Finalmente, al evaluar las relaciones (IV₂/IV) y (III₂ + IV/IV) se concluyó que ante la exposición a Cd el tejido aumenta la actividad y formación de IV₂ y III₂+IV, mientras que en tiempos más prolongados la dosis de 15 ppm disminuye la actividad IV₂ pero no de III₂ + IV. Sin embargo, la dosis la dosis de 32 ppm disminuye la actividad tanto del dímero como del supercomplejo, en ambos casos evidenciando una mayor actividad del monómero del complejo IV, lo que nos demuestra nuevamente que los efectos inducidos son tiempo y dosis dependientes.

Se ha demostrado que aproximadamente el 90% del complejo I se asocia con un dímero del complejo III y múltiples unidades del complejo IV, formando dos supercomplejos principales: I+III₂ y I+III₂+CIV₁₋₄. Por otro lado, alrededor del 80% de los complejos III y IV permanecen en su forma monomérica, aunque ambos interactúan de forma dinámica para formar el supercomplejo III₂+CIV (Moreno-Lastres et al., 2012)

Con la comprensión de que la formación de estructuras supramoleculares denominadas supercomplejos tiene una función fisiológica relevante, ya que otorga ventajas evolutivas significativas

(Acín-Pérez et al., 2008). Además, la formación de estos supercomplejos constituye un proceso dinámico que organiza el flujo de electrones, optimizando de esta manera el aprovechamiento de los sustratos disponibles (Lapuente-Brun, 2013). Esta organización también contribuye a estabilizar complejos particularmente inestables en su forma monomérica, como el complejo I, lo que consecuentemente reduce la producción de especies reactivas de oxígeno (Lobo-Jarne & Ugalde, 2018).

Mientras que el desmontaje y la pérdida de los supercomplejos respiratorios tienen diversas consecuencias funcionales en la respiración mitocondrial, como la pérdida de la canalización enzimática de los complejos I y III, la presencia de los complejos en su forma individual favorece la generación de ROS, especialmente en el caso del complejo I (Maranzana et al., 2013), esto se debe a que los complejos en su forma monomérica son altamente inestables, especialmente los complejos I y IV, a diferencia del complejo III, que prevalece principalmente en forma de dímero, una forma más estable, estas disrupciones conducen a una disfunción mitocondrial (Lim et al., 2016, 2018).

Está demostrado que el Cd ingresa a las mitocondrias. Recientemente, se evidenció que el transportador de metales divalentes 1 (DMT1) en la membrana mitocondrial externa transporta Cd^{2+} tan eficientemente como Fe^{2+} ; otra vía de entrada a las mitocondrias es a través del uniportador de calcio mitocondrial (MCU) que transporta Ca^{2+} al desplazar al calcio, el Cd^{2+} ingresa a las mitocondrias (Thévenod et al., 2019). Las investigaciones previas sugieren que la inhibición de la cadena respiratoria por Cd podría ocurrir mediante dos mecanismos principales: la inhibición directa de las enzimas o transportadores de la cadena debido a la unión del Cd y el daño oxidativo causado por ROS inducidos por este metal. Estos efectos se deben a la interacción del Cd con los grupos tiol y al desplazamiento de metales como Fe y Cu en los sitios activos de los complejos de la CTE (Kurochkin et al., 2011).

Diversos trabajos se han encargado de demostrar estos efectos de fallas en la cadena respiratoria inducida por el Cd, donde se ha demostrado que la exposición de 10 μM de CdCl_2 en células INS1 induce mitofagia y reduce la masa mitocondrial (Chang et al., 2013). Asimismo, la exposición a 12,5 μM de Cd inhibe significativamente la oxidación del sustrato y aumenta la conductancia de protones a través de la MMI (Kurochkin et al., 2011). Estudios en mitocondrias de tejidos como hígado, cerebro y corazón expuestas a 1-4 μM de Cd confirman que este metal inhibe la actividad del complejo III de la CTE. Esto ocurre porque el complejo III contiene grupos 2Fe-2S como subunidades catalíticas, permitiendo que el Cd se una entre la semiubiquinona y el citocromo b_{566} en el sitio Q_o , lo que provoca la acumulación de semiubiquinonas inestables. Estas pueden transferir electrones al oxígeno molecular, generando superóxido y aumentando la producción de ROS (Y. Wang et al., 2004). Por otro lado, el complejo I, que contiene nueve grupos Fe-S con un total de 20-26 átomos de hierro (Branca et al., 2020), también se ve afectado. Se ha descrito que concentraciones de Cd entre 3.3 y 40 μM interactúan con el complejo I o con enzimas dependientes de NADH, actuando como agente descomplejante (Cameron et al., 1986). Cabe destacar que esta inhibición es reversible, ya que puede revertirse mediante la quelación del Cd con agentes como el EDTA. Además, se ha identificado como una inhibición no competitiva a través del sitio Q_o del complejo III (Y. Wang et al., 2004)

Estos hallazgos confirman que el Cd puede inhibir la actividad de la cadena respiratoria. Sin embargo, este estudio es el primero en evaluar la función de los complejos mitocondriales del BAT ante una exposición crónica a dosis mínimas de riesgo, consideradas no tóxicas. Investigaciones previas del

grupo muestran que, tras tres meses de exposición a Cd, el número de mitocondrias en páncreas se redujo significativamente. Además, la exposición al metal disminuyó la actividad de supercomplejos y complejos individuales I, III y IV (Moroni, 2019).

En conjunto nuestros resultados evidencian que la disrupción metabólica inducida por la exposición a Cd ocasiona una acentuada disfunción del tejido adiposo marrón, como causa o consecuencia de la resistencia a insulina, de la dislipidemia y de la disfunción del tejido adiposo blanco (Moroni, 2019; Sarmiento-Ortega et al., 2017), lo que generara un mayor flujo de ácidos grasos libres al BAT, condicionando un fenotipo de resguardo (blanqueamiento) esto evidenciando por la disminución de PPAR α , UCP-1 y un incremento PPAR γ , disminuyendo así su fenotipo β oxidante, lo cual a nivel mitocondrial ocasiona una deficiencia significativa en la actividad de la CTE mitocondrial comprometiendo la estabilidad y actividad de los complejos respiratorios, disminuyendo los niveles de los complejos I, III, IV y de los supercomplejos en estado estacionario, estos mecanismos se resumen en la figura 10.

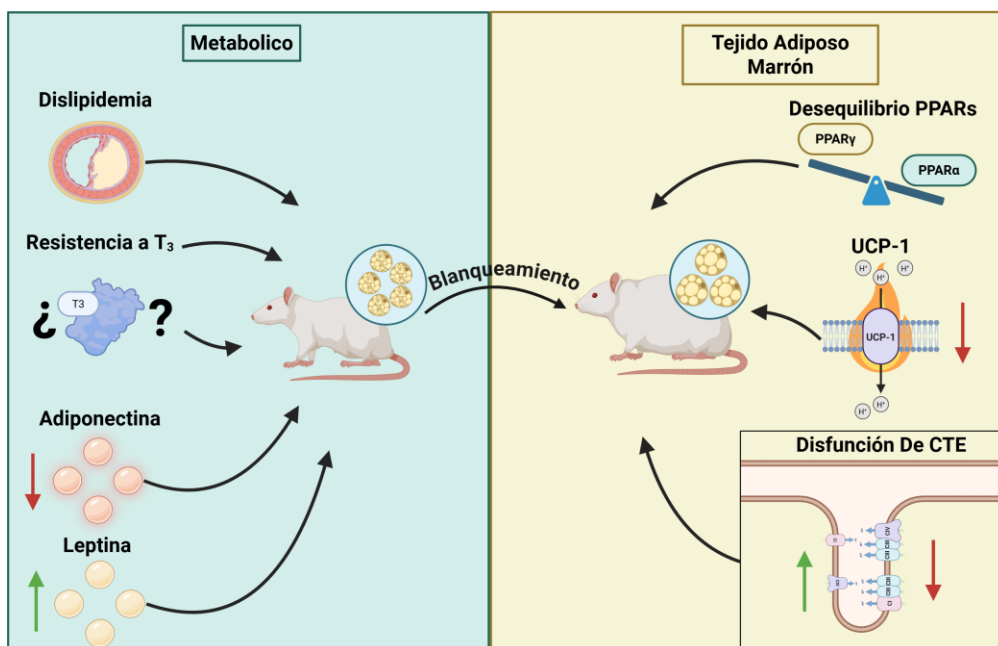


Figura 10. Resumen que describe las alteraciones metabólicas inducidas por la exposición crónica al cadmio, las cuales convergen en el adipocito marrón y favorecen su transición hacia un fenotipo similar al del adipocito blanco.

10.-Conclusiones.

La exposición crónica de cadmio en dosis de mínimo riesgo induce un fenotipo similar al síndrome metabólico en humanos.

La exposición crónica a cadmio en dosis NOAEL y LOAEL induce blanqueamiento del tejido adiposo café de ratas Wistar macho y pérdida de su función.

La exposición crónica al cadmio afecta la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones favoreciendo las formas monoméricas inestables.

11.-Referencias.

- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, 32(4), 529–539. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2008.10.021>
- Arrojo E Drigo, R., Fonseca, T. L., Werneck-De-Castro, J. P. S., & Bianco, A. C. (2013). Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1830, pp. 3956–3964). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.08.019>
- ATSDR. (2021). *Agency for Toxic Substance and Disease Registry. Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA.* <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=15>
- Attia, S. M., Varadharajan, K., Shanmugakonar, M., Das, S. C., & Al-Naemi, H. A. (2021). Cadmium: An Emerging Role in Adipose Tissue Dysfunction. *Exposure and Health 2021 14:1*, 14(1), 171–183. <https://doi.org/10.1007/S12403-021-00427-3>
- Awazawa, M., Ueki, K., Inabe, K., Yamauchi, T., Kaneko, K., Okazaki, Y., Bardeesy, N., Ohnishi, S., Nagai, R., & Kadowaki, T. (2009). Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.131>
- Berger, J., & Moller, D. E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. In *Annual Review of Medicine* (Vol. 53, pp. 409–435). <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104018>
- Berneis, K. K., & Krauss, R. M. (2002). Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 43, pp. 1363–1379). <https://doi.org/10.1194/jlr.R200004-JLR200>
- Bianco, A. C., & Kim, B. W. (2006). Deiodinases: Implications of the local control of thyroid hormone action. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 116, pp. 2571–2579). <https://doi.org/10.1172/JCI29812>
- Bjørnbæk, C., El-Haschimi, K., Frantz, J. D., & Flier, J. S. (1999). The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 30059–30065. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.30059>
- Branca, J. J. V., Pacini, A., Gulisano, M., Taddei, N., Fiorillo, C., & Becatti, M. (2020). Cadmium-Induced Cytotoxicity: Effects on Mitochondrial Electron Transport Chain. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 604377. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.604377>
- Buha, A., Matovic, V., Antonijevic, B., Bulat, Z., Curcic, M., Renieri, E. A., Tsatsakis, A. M., Schweitzer, A., & Wallace, D. (2018). Overview of cadmium thyroid disrupting effects and mechanisms. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19051501>

- Cameron, I., McNamee, P. M., Markham, A., Morgan, R. M., & Wood, M. (1986). The effects of cadmium on succinate and NADH-linked substrate oxidations in rat hepatic mitochondria. *Journal of Applied Toxicology*, *6*, 325–330. <https://doi.org/10.1002/jat.2550060505>
- Carow, B., & Rottenberg, M. E. (2014). SOCS3, a major regulator of infection and inflammation. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00058>
- Charkiewicz, A. E., Omeljaniuk, W. J., Nowak, K., Garley, M., & Nikliński, J. (2023). Cadmium Toxicity and Health Effects—A Brief Summary. *Molecules*, *28*(18), 6620. <https://doi.org/10.3390/molecules28186620>
- Chmielowska-Bak, J., Izbiańska, K., & Deckert, J. (2013). The toxic Doppelgänger: On the ionic and molecular mimicry of cadmium. In *Acta Biochimica Polonica* (Vol. 60, pp. 369–374). Acta Biochimica Polonica. https://doi.org/10.18388/abp.2013_1994
- Christoffolete, M. A., Linardi, C. C. G., De Jesus, L., Ebina, K. N., Carvalho, S. D., Ribeiro, M. O., Rabelo, R., Curcio, C., Martins, L., Kimura, E. T., & Bianco, A. C. (2004). Mice with Targeted Disruption of the Dio2 Gene Have Cold-Induced Overexpression of the Uncoupling Protein 1 Gene but Fail to Increase Brown Adipose Tissue Lipogenesis and Adaptive Thermogenesis. *Diabetes*, *53*, 577–584. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.3.577>
- Corrales, P., Vidal-Puig, A., & Medina-Gómez, G. (2018). PPARs and Metabolic Disorders Associated with Challenged Adipose Tissue Plasticity. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(7). <https://doi.org/10.3390/IJMS19072124>
- Courtney, C. H., & Olefsky, J. M. (2007). Insulin resistance. In *Mechanisms of Insulin Action: Medical Intelligence Unit* (pp. 185–209). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72204-7_10
- Egger, A. E., Grabmann, G., Gollmann-Tepeköylü, C., Pechriggl, E. J., Artner, C., Türkcan, A., Hartinger, C. G., Fritsch, H., Keppler, B. K., Brenner, E., Grimm, M., Messner, B., & Bernhard, D. (2019). Chemical imaging and assessment of cadmium distribution in the human body. *Metallomics*, *11*(12), 2010–2019. <https://doi.org/10.1039/C9MT00178F>
- Esmeralda, P., García, P., Isabel, M., & Cruz, A. (2012). Rev Esp Méd Quir Volumen 17, Núm. 3, julio-septiembre. *Rev Esp Méd Quir*, *17*(3), 199–205. www.nietoeditores.com.mx
- Esteve Ràfols, M. (2014). Tejido adiposo: Heterogeneidad celular y diversidad funcional. In *Endocrinología y Nutrición* (Vol. 61, pp. 100–112). <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>
- Factores de la transcripción (artículo) | Khan Academy.* (n.d.). <https://es.khanacademy.org/science/biology/gene-regulation/gene-regulation-in-eukaryotes/a/eukaryotic-transcription-factors>.
- Fedorenko, A., Lishko, P. V., & Kirichok, Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*, *151*, 400–413. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.010>
- Feingold, K. R., & Grunfeld, C. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In *Endotext*.

- Frazier, A. E., Vincent, A. E., Turnbull, D. M., Thorburn, D. R., & Taylor, R. W. (2020). Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymes in cells and tissues. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 155, pp. 121–156). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.11.007>
- Freitas, M., & Fernandes, E. (2011). Zinc, cadmium and nickel increase the activation of NF- κ B and the release of cytokines from THP-1 monocytic cells. *Metallomics*, *3*, 1238–1243. <https://doi.org/10.1039/c1mt00050k>
- Fu, Y., Luo, N., Klein, R. L., & Timothy Garvey, W. (2005). Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *Journal of Lipid Research*, *46*, 1369–1379. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400373-JLR200>
- Gyurina, K., Yarmak, M., Sasi-Szabó, L., Molnár, S., Méhes, G., & Röszer, T. (2023). Loss of Uncoupling Protein 1 Expression in the Subcutaneous Adipose Tissue Predicts Childhood Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*. <https://doi.org/10.3390/ijms242316706>
- Harris, R. B., Zhou, J., Redmann, S. M., Smagin, G. N., Smith, S. R., Rodgers, E., & Zachwieja, J. J. (1998). A leptin dose-response study in obese (ob/ob) and lean (+/?) mice. *Endocrinology*, *139*, 8–19. <https://doi.org/10.1210/endo.139.1.5675>
- Hondares, E., Rosell, M., Díaz-Delfín, J., Olmos, Y., Monsalve, M., Iglesias, R., Villarroya, F., & Giral, M. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) induces PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: Involvement of PRDM16. *Journal of Biological Chemistry*, *286*, 43112–43122. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.252775>
- Horwitz, A., & Birk, R. (2023). Adipose Tissue Hyperplasia and Hypertrophy in Common and Syndromic Obesity—The Case of BBS Obesity. In *Nutrients* (Vol. 15). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/nu15153445>
- Howard, B. V. (1999). Insulin resistance and lipid metabolism. *American Journal of Cardiology*, *84*, 28–32. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(99\)00355-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(99)00355-0)
- Huang, W., Dedousis, N., Bandi, A., Lopaschuk, G. D., & O'Doherty, R. M. (2006). Liver triglyceride secretion and lipid oxidative metabolism are rapidly altered by leptin in vivo. *Endocrinology*, *147*, 1480–1487. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0731>
- Ježek, P., & Garlid, K. D. (1998). Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *30*, 1163–1168. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00076-4](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00076-4)
- Juarez Casso, F. M., & Farzam, K. (2022). Biochemistry, Very Low Density Lipoprotein. In *StatPearls*.
- Kawakami, T., Nishiyama, K., Kadota, Y., Sato, M., Inoue, M., & Suzuki, S. (2013). Cadmium modulates adipocyte functions in metallothionein-null mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *272*, 625–636. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.07.015>
- Kawakami, T., Sugimoto, H., Furuichi, R., Kadota, Y., Inoue, M., Setsu, K., Suzuki, S., & Sato, M. (2010). Cadmium reduces adipocyte size and expression levels of adiponectin and Peg1/Mest in adipose tissue. *Toxicology*, *267*, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.07.022>

- Kelly, L. J., Vicario, P. P., Thompson, G. M., Candelore, M. R., Doebber, T. W., Ventre, J., Wu, M. S., Meurer, R., Forrest, M. J., Conner, M. W., Cascieri, M. A., & Moller, D. E. (1998). Peroxisome proliferator-activated receptors γ and α mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. *Endocrinology*, *139*, 4920–4927. <https://doi.org/10.1210/endo.139.12.6384>
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., & Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *Journal of Clinical Investigation*, *103*, 1489–1498. <https://doi.org/10.1172/JCI6223>
- Kotzbeck, P., Giordano, A., Mondini, E., Murano, I., Severi, I., Venema, W., Cecchini, M. P., Kershaw, E. E., Barbatelli, G., Haemmerle, G., Zechner, R., & Cinti, S. (2018). Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *Journal of Lipid Research*, *59*, 784–794. <https://doi.org/10.1194/jlr.M079665>
- Kozak, L. P., & Anunciado-Koza, R. (2008). UCP1: Its involvement and utility in obesity. In *International Journal of Obesity* (Vol. 32, pp. S32–S38). <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.236>
- Kurochkin, I. O., Etkorn, M., Buchwalter, D., Leamy, L., & Sokolova, I. M. (2011). Top-down control analysis of the cadmium effects on molluscan mitochondria and the mechanisms of cadmium-induced mitochondrial dysfunction. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *300*. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00279.2010>
- Lalloyer, F., Wouters, K., Baron, M., Caron, S., Vallez, E., Vanhoutte, J., Baugé, E., Shiri-Sverdlov, R., Hofker, M., Staels, B., & Tailleux, A. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor- α gene level differently affects lipid metabolism and inflammation in apolipoprotein E2 knock-in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *31*, 1573–1579. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.220525>
- Lapiente-Brun, E. (2013). *El ensamblaje de supercomplejos determina el flujo de electrones en la cadena de transporte de electrones mitocondrial*. <https://doi.org/10.1126/ciencia.1230381>
- Lesmana, R., Sinha, R. A., Singh, B. K., Zhou, J., Ohba, K., Wu, Y., Yau, W. W., Bay, B. H., & Yen, P. M. (2016). Thyroid hormone stimulation of autophagy is essential for mitochondrial biogenesis and activity in skeletal muscle. *Endocrinology*, *157*, 23–38. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1632>
- Levy, J. R., Gyarmati, J., Lesko, J. M., Adler, R. A., & Stevens, W. (2000). Dual regulation of leptin secretion: Intracellular energy and calcium dependence of regulated pathway. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *278*. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.278.5.e892>
- Lim, S. C., Hroudová, J., Van Bergen, N. J., Lopez Sanchez, M. I. G., Trounce, I. A., & McKenzie, M. (2016). Loss of mitochondrial DNA-encoded protein ND1 results in disruption of complex I biogenesis during early stages of assembly. *FASEB Journal*, *30*, 2236–2248. <https://doi.org/10.1096/fj.201500137R>
- Lim, S. C., Tajika, M., Shimura, M., Carey, K. T., Stroud, D. A., Murayama, K., Ohtake, A., & McKenzie, M. (2018). Loss of the Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation Protein Medium-Chain Acyl-

- Coenzyme A Dehydrogenase Disrupts Oxidative Phosphorylation Protein Complex Stability and Function. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18530-4>
- Lobo-Jarne, T., & Ugalde, C. (2018). Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 76, pp. 179–190). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.07.021>
- Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G., & Genova, M. L. (2013). Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19, 1469–1480. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4845>
- Medina-Gomez, G., Gray, S. L., Yetukuri, L., Shimomura, K., Virtue, S., Campbell, M., Curtis, R. K., Jimenez-Linan, M., Blount, M., Yeo, G. S. H., Lopez, M., Seppänen-Laakso, T., Ashcroft, F. M., Orešič, M., & Vidal-Puig, A. (2007). PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genetics*, 3, 0634–0647. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030064>
- Miyamoto, L., Ebihara, K., Kusakabe, T., Aotani, D., Yamamoto-Kataoka, S., Sakai, T., Aizawa-Abe, M., Yamamoto, Y., Fujikura, J., Hayashi, T., Hosoda, K., & Nakao, K. (2012). Leptin activates hepatic 5'-AMP-activated protein kinase through sympathetic nervous system and α 1-adrenergic receptor: A potential mechanism for improvement of fatty liver in lipodystrophy by leptin. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 40441–40447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.384545>
- Moreno-Lastres, D., Fontanesi, F., García-Consuegra, I., Martín, M. A., Arenas, J., Barrientos, A., & Ugalde, C. (2012). Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metabolism*, 15, 324–335. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.015>
- Moroni, D. (2019). "Evaluación de la función mitocondrial en islotes pancreáticos de ratas con resistencia a insulina inducida por exposición a dietas hipercalóricas y cadmio." https://Correobuap-My.Sharepoint.Com/Personal/Diana_moronig_alumno_buap_mx/Documents/Lab%20DC%20Smanuel%20Trevi%C3%B1o/Tesis%20y%20Dictámenes/Maestr%C3%ADa/Tesis%20Maestría%20Diana%20Moroni%20Gonz%C3%A1lez.Pdf?Login_hint=david.Castillope%40alumno.Buap.Mx
- Moroni-González, D., Sarmiento-Ortega, V. E., Diaz, A., Brambila, E., & Treviño, S. (2023). Pancreas–Liver–Adipose Axis: Target of Environmental Cadmium Exposure Linked to Metabolic Diseases. *Toxics* 2023, Vol. 11, Page 223, 11(3), 223. <https://doi.org/10.3390/TOXICS11030223>
- Osellame, L. D., Blacker, T. S., & Duchon, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26(6), 711–723. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003>
- Panuganti, K. K., Nguyen, M., & Kshirsagar, R. K. (2023). Obesity. In *StatPearls*.
- Perez, A. A. (2020). The Mineral Industry of Mexico in 2019. *Servicio Geológico Mexicano*, 14–17.
- Physiology and pathophysiology of adipose tissue.* (n.d.). <https://www.nature.com/collections/bfaigcccdh>

- Porter, C., Herndon, D. N., Chondronikola, M., Chao, T., Annamalai, P., Bhattarai, N., Saraf, M. K., Capek, K. D., Reidy, P. T., Daquinag, A. C., Kolonin, M. G., Rasmussen, B. B., Borsheim, E., Toliver-Kinsky, T., & Sidossis, L. S. (2016). Human and Mouse Brown Adipose Tissue Mitochondria Have Comparable UCP1 Function. *Cell Metabolism*, *24*, 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.004>
- Qu, F., & Zheng, W. (2024). Cadmium Exposure: Mechanisms and Pathways of Toxicity and Implications for Human Health. In *Toxics* (Vol. 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/toxics12060388>
- Rachid, T. L., Penna-de-Carvalho, A., Bringham, I., Aguilá, M. B., Mandarim-de-Lacerda, C. A., & Souza-Mello, V. (2015). PPAR- α agonist elicits metabolically active brown adipocytes and weight loss in diet-induced obese mice. *Cell Biochemistry and Function*, *33*, 249–256. <https://doi.org/10.1002/cbf.3111>
- Rangel-Azevedo, C., Santana-Oliveira, D. A., Miranda, C. S., Martins, F. F., Mandarim-de-Lacerda, C. A., & Souza-Mello, V. (2022). Progressive brown adipocyte dysfunction: Whitening and impaired nonshivering thermogenesis as long-term obesity complications. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *105*, 109002. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2022.109002>
- Resumen de Salud Pública: Cadmio (Cadmium) | PHS | ATSDR*. (n.d.). Retrieved August 8, 2024, from https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs5.html
- Richard, A. J., White, U., Elks, C. M., & Stephens, J. M. (2020). Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction. *Endotext*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555602/>
- Sabath, E., & Robles-Osorio, M. L. (2012). Medio ambiente y riñón: nefrotoxicidad por metales pesados. *Nefrología*, *32*(3), 279–286. <https://doi.org/10.3265/NEFROLOGIA.PRE2012.JAN.10928>
- Saini, S., & Dhanía, G. (2020). Cadmium as an Environmental Pollutant: Ecotoxicological Effects, Health Hazards, and Bioremediation Approaches for Its Detoxification from Contaminated Sites. In *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety* (pp. 357–387). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3426-9_15
- Saini, S., Dhanía, G., Saini, S., & Dhanía, G. (2020). Cadmium as an Environmental Pollutant: Ecotoxicological Effects, Health Hazards, and Bioremediation Approaches for Its Detoxification from Contaminated Sites. *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*, 357–387. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3426-9_15
- Sanders, F. W. B., & Griffin, J. L. (2016). De novo lipogenesis in the liver in health and disease: More than just a shunting yard for glucose. *Biological Reviews*, *91*, 452–468. <https://doi.org/10.1111/brv.12178>
- Sarmiento, V. E. (2017). “Evaluación del desarrollo de resistencia a Insulina hepática y su relación en la ruta lipogénica en ratas Wistar expuestas a Cd.” https://Correobuap-My.Sharepoint.Com/Personal/Diana_moronig_alumno_buap_mx/Documents/Lab%20DC%20S amuel%20Trevi%C3%B1o/Tesis%20y%20Dictámenes/Maestr%C3%ADa/Tesis%20Maestría%20Victor%20Sarmiento%20Ortega.Pdf?Login_hint=david.Castillope%40alumno.Buap.Mx

- Sarmiento-Ortega, V. E., Alcántara-Jara, D. I., Moroni-González, D., Díaz, A., Vázquez-Roque, R. A., Brambila, E., & Treviño, S. (2025). Chronic cadmium exposure to minimal-risk doses causes dysfunction of epididymal adipose tissue and metabolic disorders. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 495. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2024.117203>
- Sarmiento-Ortega, V. E., Moroni-González, D., Díaz, A., Eduardo, B., & Samuel, T. (2022). Oral Subacute Exposure to Cadmium LOAEL Dose Induces Insulin Resistance and Impairment of the Hormonal and Metabolic Liver-Adipose Axis in Wistar Rats. *Biological Trace Element Research*, 200(10), 4370–4384. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-03027-z>
- Sarmiento-Ortega, V. E., Treviño, S., Flores-Hernández, J. Á., Aguilar-Alonso, P., Moroni-González, D., Aburto-Luna, V., Díaz, A., & Brambila, E. (2017). Changes on serum and hepatic lipidome after a chronic cadmium exposure in Wistar rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 635, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.10.003>
- Shen, Y., Su, Y., Silva, F. J., Weller, A. H., Sostre-Colón, J., Titchenell, P. M., Steger, D. J., Seale, P., & Soccio, R. E. (2020). Shared PPAR α / γ Target Genes Regulate Brown Adipocyte Thermogenic Function. *Cell Reports*, 30, 3079–3091.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.032>
- Sinha, R. A., Singh, B. K., Zhou, J., Wu, Y., Farah, B. L., Ohba, K., Lesmana, R., Gooding, J., Bay, B. H., & Yen, P. M. (2015). Thyroid hormone induction of mitochondrial activity is coupled to mitophagy via ROS-AMPKULK1 signaling. *Autophagy*, 11, 1341–1357. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1061849>
- Thévenod, F., Fels, J., Lee, W. K., & Zarbock, R. (2019). Channels, transporters and receptors for cadmium and cadmium complexes in eukaryotic cells: myths and facts. *BioMetals*, 32, 469–489. <https://doi.org/10.1007/s10534-019-00176-6>
- Thévenod, F., & Lee, W.-K. (2013). *Toxicology of Cadmium and Its Damage to Mammalian Organs* (pp. 415–490). https://doi.org/10.1007/978-94-007-5179-8_14
- Townsend, K., & Tseng, Y.-H. (2012). Brown adipose tissue: Recent insights into development, metabolic function and therapeutic potential. *Adipocyte*, 1(1), 13. <https://doi.org/10.4161/ADIP.18951>
- Treviño, S., Waalkes, M. P., Flores Hernández, J. A., León-Chavez, B. A., Aguilar-Alonso, P., & Brambila, E. (2015). Chronic cadmium exposure in rats produces pancreatic impairment and insulin resistance in multiple peripheral tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 583, 27–35. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2015.07.010>
- Vartak, R., Porras, C. A.-M., & Bai, Y. (2013). Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein & Cell*, 4(8), 582–590. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-3032-y>
- Wang, H., Wang, A., Wang, X., Zeng, X., & Xing, H. (2022). AMPK/PPAR- γ /NF- κ B axis participates in ROS-mediated apoptosis and autophagy caused by cadmium in pig liver. *Environmental Pollution*, 294. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118659>

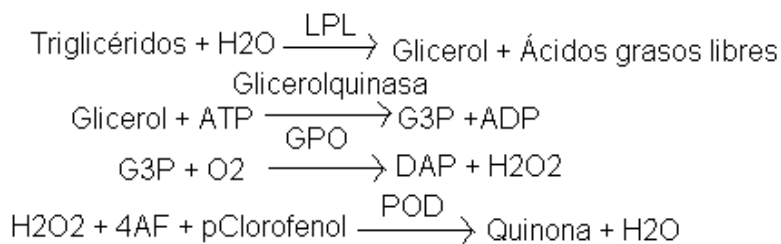
- Wang, R., Sang, P., Guo, Y., Jin, P., Cheng, Y., Yu, H., Xie, Y., Yao, W., & Qian, H. (2023). Cadmium in food: Source, distribution and removal. *Food Chemistry*, 405, 134666. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.134666>
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S., & Rao, K. M. K. (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 1434–1443. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010>
- William, W. N., Ceddia, R. B., & Curi, R. (2002). Leptin controls the fate of fatty acids in isolated rat white adipocytes. *Journal of Endocrinology*, 175, 735–744. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1750735>
- Ye, J. (2008). Regulation of PPAR γ function by TNF- α . In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 374, pp. 405–408). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.068>
- Yorita Christensen, K. L. (2013). Metals in blood and urine, and thyroid function among adults in the United States 2007-2008. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216, 624–632. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.08.005>
- Zeng, L., Zhou, J., Zhang, Y., Wang, X., Li, Y., Song, J., Shao, J. F., & Su, P. (2023). Paternal cadmium exposure induces glucolipid metabolic reprogramming in offspring mice via PPAR signaling pathway. *Chemosphere*, 339. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139592>
- Zhu, Y., Cheng, P., Peng, J., Liu, S., Xiang, J., Xu, D., Chen, Y., Chen, Z., Wang, X., Luo, C., Xu, P., & Sheng, J. (2024). Cadmium exposure causes transcriptomic dysregulation in adipose tissue and associated shifts in serum metabolites. *Environment International*, 185. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108513>
- Ziqubu, K., Dlodla, P. V., Mthembu, S. X. H., Nkambule, B. B., Mabhida, S. E., Jack, B. U., Nyambuya, T. M., & Mazibuko-Mbeje, S. E. (2023). An insight into brown/beige adipose tissue whitening, a metabolic complication of obesity with the multifactorial origin. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1114767>
- Маклаков, К. В., Оленев, Г. В., & Кряжимский, Ф. В. (2004). Типы онтогенеза и территориальное распределение мелких грызунов. *Экология*, 366–374. <https://doi.org/574.3:599.323.4:591.363>

12.-Anexos.

Anexo #1

Concentración de triglicéridos.

Fundamento. La concentración sérica de triglicéridos, se realiza por química líquida mediante reacciones acopladas que corresponde a una reacción coloreada que se evalúa por espectrofotometría, en la cual los triglicéridos se hidratan mediante una lipasa, en la cual se obtienen glicerol y ácidos grasos libres, el glicerol reacciona con ATP contenido en el reactivo reacción propiciada por la enzima glicerol cinasa, resultando glicerol-3-fosfato y ADP, el glicerol-3-fosfato se oxida por una reacción acoplada por una G-3-P-oxidasa dicha reacción tiene por productos dihidroxiacetona-P y peróxido de hidrógeno, este reacciona a su vez con 4-aminoantipirina y 4-clorofenol mediante una peroxidasa obteniéndose una reacción coloreada de quinonaimina que es mediada a una longitud de onda de 505 nm.



Método (Glicerolfosfato deshidrogenasa- Peroxidasa).

Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

Pipetear en un tubo de ensayo:

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón		10µL	
Muestra			10µL
Reactivo	1 mL	1 mL	10µL

Agitar bien e incubar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco (el color es estable como mínimo 30min).

Cálculos.

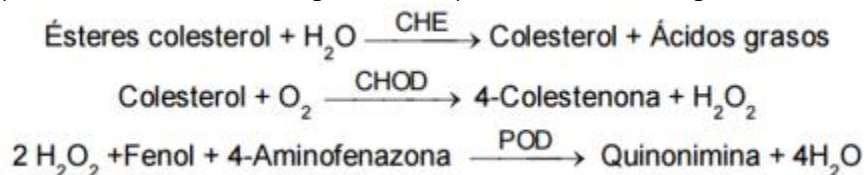
La concentración de triglicéridos en la muestra se calcula a partir de la siguiente formula.

$$\frac{\text{Abs Patrón}}{\text{Abs Muestra}} \times \text{Concentración Patrón} = \text{Concentración trigliceridos en muestra (mg/dL)}$$

Anexo #2

Colesterol total

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada.

Procedimiento.

Condiciones del ensayo:

- Longitud de onda: 505 nm (500-550).
- Cubeta:1 cm paso de luz.
- Temperatura37°C /15-25°C.

- I. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- II. Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón		10µL	
Muestra			10µL
Reactivo	1 mL	1 mL	10µL

- III. Mezclar e incubar 10 min a temperatura ambiente.
- IV. Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 60 minutos.

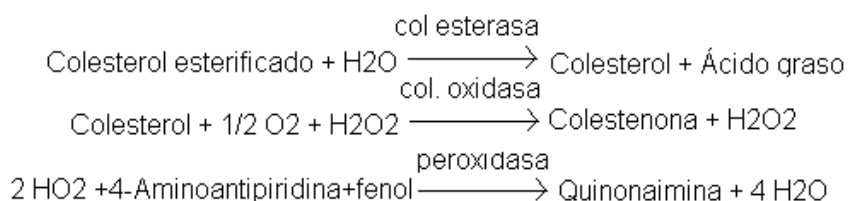
Cálculos.

$$\frac{\text{Abs Patrón}}{\text{Abs Muestra}} \times \text{Concentración Patrón} = \text{Concentración colesterol (mg/dL)}$$

Anexo #3

Colesterol LDL reactivo precipitante

Fundamento. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la muestra, precipitan en presencia de polivinil. La concentración de colesterol LDL se calcula por diferencia entre los valores de colesterol en el suero y el sobrenadante obtenido tras la precipitación. El colesterol se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación.



Procedimiento

- I. Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda: 600 (590-700) nm
 - Cubeta:1 cm paso de luz
 - Temperatura: 37°C
- II. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- III. Pipetear en un tubo:

Muestra	400 µL
Reactivo	200 µL

- IV. Agitar bien y dejar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- V. Centrifugar durante 15 min. a 4,000 r.p.m.
- VI. Recoger con cuidado el sobrenadante
- VII. Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.
- VIII. Pipetear en un tubo de ensayo:

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua Destilada	20 µL		
Reactivo		20 µL	
Patrón			20 µL
Muestras	1 mL	1mL	10 µL

- IX. Agitar bien e incubar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente
- X. Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco. El color es estable como mínimo 30 min.

Cálculos

La concentración de colesterol en el sobrenadante se calcula a partir de la siguiente formula.

$$\frac{\text{Abs Muestra} \times [\text{Patrón}] \times \text{Fact. Dilución de la muestra}}{\text{Abs Patrón}} = \text{Colesterol en sobrenadante}$$

La concentración de colesterol LDL en la muestra se calcula:

$$\text{Colesterol LDL(mg/dL)} = \text{Colesterol total} - \text{Colesterol en sobrenadante}$$

Anexo #4

Colesterol HDL reactivo precipitante

Fundamento. El colesterol de las proteínas de baja densidad (LDL), las de muy baja densidad (VLDL) y los quilomicrones es hidrolizado por un colesterol oxidasa mediante una reacción enzimática acelerada no formadora de color. El detergente presente en el reactivo solubiliza el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) de la muestra. El colesterol de HDL se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación. El colesterol esterificado se hidrata mediante una colesterol esteras, dando como resultado colesterol y ácidos grasos libres, el colesterol resultante sufre una semioxidación e hidratación por una colesterol oxidasa, dando como resultado colesteno y peróxido de hidrógeno, este se acopla a una reacción coordinada por una peroxidasa con 4-aminoantipirina y una solución buffer DSBmT obteniéndose como producto final quinonaimina, que presenta color y este es detectado por espectrofotometría a una longitud de onda de 505 nm.

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y baja densidad (LDL) del suero o plasma, se precipitan con fosfotungstato en presencia de iones magnesio. Tras su centrifugación, el sobrenadante claro conteniendo las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se emplea para determinar el colesterol HDL

Procedimiento.

Precipitación

1. Dosificar en tubos de centrifuga:

Reactivo	100 µL
----------	--------

Muestra	1 mL
---------	------

1. Mezclar y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Centrifugar 20 min a 4000 r.p.m.
3. Recoger el sobrenadante y determinar el HDL Colesterol.

Cálculos.

$$\frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Patrón}} \times \text{Concentración Patrón} = \text{Concentración HDLc muestra (mg/dL)}$$

Con Factor:

$$\text{Abs Muestra} \times 320 = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{HDLc en la muestra}$$

Anexo #5

Ácidos grasos libres

Reactivos

Cloroformo- Reactivo de cobre: Consiste en $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 40,0 g/litro; trietanolamina 99%, 120,0 ml/litro (135,0 g/litro). Se disuelve el nitrato cúprico en 500 ml de agua destilada, agregue la trietanolamina y diluir a 1 litro con agua destilada.

- Reactivo cuprizona. Este consiste en ácido oxálico-bis (cyclohexylidenehydrazide), 0.40 g/litro de isopropanol. Disolver la cuprizona en 10 ml de cloroformo y se diluye con isopropanol para 1 litro. esta solución es estable durante al menos tres meses a temperatura ambiente.

- Reactivo amoníaco. 100 ml de una solución al 58% de NH_4OH (concentrado) se diluye hasta 1 litro con agua destilada agua.

Procedimiento

- I. Añadir 50 mL de suero en un tubo de ensayo
- II. A un tubo semejante, se añaden 50 ml de estándar de ácido oleico.
- III. Para otro tubo de ensayo añadir 100 ml de agua, este será el blanco de reactivo.
- IV. Para todos los tubos añadir 150 ml de reactivo de cobre y 1 ml de cloroformo.
- V. Coloque los tubos verticalmente en un vortex y agite por 10 min.
- VI. Centrifugar los tubos 10 minutos a 1500 rpm.
- VII. Extraer las fases de cloroformo en otros tubos de ensaye cuidando el no extraer la fase acuosa de color azul.
- VIII. De cada tubo, pipetear 500 ml de extracto de cloroformo y colocar en un nuevo tubo, la evaporación debe mantenerse a un mínimo.
- IX. A cada tubo, añadir 450 ml de reactivo cuprizona, tapar y agitar suavemente.
- X. A cada tubo, añadir 50 mde solución de amoniaco, tapar y agite suavemente.
- XI. Lea la absorbancia a 620 nm (frente a un blanco a cero de absorbancia) 10 mm después de agitar con la solución de amoníaco. Si aparece un precipitado azul, agitar la cubeta energicamente para redispersarlo y leer la absorbancia.

Cálculos

El ácido graso libre (FFA) contenido se calcula:

$$\text{Concentración en mg/dl} = (\text{Abs muestra} / \text{Abs estándar}) \times 8.6 \text{ mg/dl}$$

Anexo #6

Elisas

La determinación de insulina se realizó mediante una prueba de Elisa también con un kit comercial

- a) **Fundamento:** En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el ensayo en la superficie del pozo en la microplaca durante la interacción de estreptavidina cubierta sobre el pozo y agregado exógenamente un anticuerpo de insulina monoclonal biotinilado. Una vez mezclado el anticuerpo monoclonal biotinilado, el anticuerpo de enzima etiquetada y un suero que contiene el antígeno nativo, resulta una reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia o impedimento estérico, para formar un complejo de sándwich soluble. Después de que se obtiene el equilibrio, la fracción del anticuerpo-atado es separado del antígeno libre por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática en la fracción del anticuerpo-limite es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno.

Utilizando diversas referencias del suero de los valores sabidos del antígeno, una curva de la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

Anexo #7

Técnica para deshidratación, embebido y corte de tejidos en parafina

- Una vez obtenidos los tejidos, colocar en solución con formalina al 4% en PBS 1X, hasta su inclusión en parafina.
- Colocar los tejidos en casetes para inclusión.

Proceso:

- I. PBS 1X, durante 45 minutos, para limpiar la formalina.
- II. Alcohol 70%, 1 hora
- III. Alcohol 80%, 1 hora
- IV. Alcohol 96% 1, 1 hora
- V. Alcohol 96% 2, 1 hora
- VI. Alcohol 100% 1, 1 hora
- VII. Alcohol 100% 2, 1 hora
- VIII. Alcohol-Xilol (1:1), 1 hora
- IX. Xilol 1, 1 hora
- X. Xilol 2, 1 hora
- XI. Xilol-Parafina (1:1), 1:30 horas
- XII. Parafina 1, 1 hora
- XIII. Parafina 2, 1 hora
- XIV. Parafina 3 (Inclusión)

Corte de tejidos:

Se obtuvieron 6 bloques de parafina de cada grupo de los cuales se cortaron 7 laminillas de cada bloque a un espesor de 3µm, colocados en laminillas previamente sialinizadas, se dejaron secar y se almacenaron para realizar las tinciones e inmunofluorescencias correspondientes.

Anexo #8

Técnica Hematoxilina & Eosina

Precalentar a 55°C antes de la rehidratación por 15 min

Rehidratación:

1. Xilol 1 (15 min)
2. Xilol 2 (10 min)
3. Xilol-Etanol (15 baños)
4. Etanol Absoluto 1 (15 baños)
5. Etanol Absoluto 2 (15 baños)
6. Etanol al 96% 1 (15 baños)
7. Etanol al 96% 2 (15 baños)
8. Agua destilada (10 baños)

Tinción:

1. Hematoxilina 8 min
2. H₂O (10 baños)
3. Alcohol Acido (1 baño)
4. Carbonato de Litio (3 baños)
5. H₂O (5 baños)
6. Eosina (30 segundos)
7. Agua Detilada (10 baños)

Deshidratación:

1. Alcohol al 96% 2 (15 baños)
2. Alcohol al 96% 1 (15 baños)
3. Etanol Absoluto 2 (15 baños)
4. Etanol Absoluto 1 (15 baños)
5. Xilol-Alcohol (15 baños)
6. Xilol 2 (5 min)
7. Xilol 1 (5 min)

Montaje:

Al término de la deshidratación se procede a colocar la resina y se deja secar toda la noche.

Anexo #9

Técnica de Inmunofluorescencia

Reactivos:

Tren:

1. Xilol 1 (10 min)
2. Xilol 2 (10 min)
3. Xilol-Etanol (15 baños)

4. Etanol Absoluto 1 (15 baños)
5. Etanol Absoluto 2 (15 baños)
6. Etanol al 96% 1 (15 baños)
7. Etanol al 96% 2 (15 baños)
8. PBS 1x (10 baños)

Solución de recuperación antigénica Diva Decloacker Biocare (1:10)

Albúmina libre de IgG al 2% en SSI Anticuerpos primario y secundario

Vectashield con DAPI Esmalte de uñas transparente

Procedimiento:

- I. Colocar las laminillas por 40 minutos en la estufa a 60°C.
- II. Desparafinar y deshidratar los tejidos.
- III. Poner las laminillas en la solución de recuperación de antígenos durante 40 min a 60°C
- IV. Dejar enfriar 20 minutos, Lavar tres veces con PBS 1X.
- V. Hacer zonas hidrófobas alrededor de cada tejido en la laminilla.
- VI. Bloquear con albúmina 2% durante 2 horas (100 µL por laminilla), Lavar 3 veces con PBS 1X
- VII. Colocar el anticuerpo primario en la dilución establecida por la casa comercial, o por prueba y error y dejar toda la noche. (100 µL por laminilla), Lavar 3 veces con PBS el anticuerpo.
- VIII. Colocar el anticuerpo secundario en la dilución establecida durante 2 horas (100 µL por laminilla), desde este paso todo el procedimiento se realiza en oscuridad. Lavar con PBS 1X, 3 veces
- IX. Dejar que las laminillas se sequen por completo.
- X. Colocar 5 µL por tejido de Vecta shield con DAPI.
- XI. Poner un cubreobjetos y sellar con esmalte.
- XII. Dejar que las laminillas se sequen y guardarlas en refrigeración.

Anexo #10

Cuantificación de proteínas totales

1. Curva de calibración:

Preparar sln BSA 100 mg/mL / 100 µg/µL (Hacer por triplicado)

- I. 10= 90 µL agua + 10 µL BSA (100 µg/mL)
- II. 5= 50 µL agua + 50 µL BSA (10 µg)¹
- III. 2= 80 µL agua + 20 µL BSA (10 µg)²
- IV. 1= 50 µL agua + 50 µL BSA (2 µg)³
- V. 0.5= 50 µL agua + 50 µL BSA (1 µg)⁴
- VI. Agregar en una celda:
2 µL muestra + 1 mL Reactivo Bradford.
- VII. Realizar Curva Calibración.
2. Medir Muestra:

- I. 2 μL muestra + 1 mL Reactivo Bradford
3. Calcular a través de la curva de calibración la concentración de la muestra.

Anexo #11

Supercomplejos

Procedimiento

- I. Preparar un gel de acrilamida de gradiente del 3-13% para condiciones nativas

Preparación muestra:

- I. Precalentar digitonina a 95°C.
- II. Tomar los μL que corresponda a la concentración 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas de BAT de cada grupo y colocar 4 μL de digitonina.
- III. Incubar 10 min en hielo.
- IV. Centrifugar 30 min a máxima velocidad / 4°C.
- V. Quitar el sobrenadante y ponerlo en un ependorf nuevo.
- VI. Añadir al sobrenadante 2 μL de buffer de BNGE.

Corrimiento gel:

- I. Tomar $\approx 15 \mu\text{L}$ del sobrenadante total y cargar en cada pocillo correspondiente del gel (Marcador de peso molecular (Higado), Grupos Experimentales y Control).
- II. Verificar que no existan fugas entre el búffer del cátodo y el ánodo
- III. Correr el gel 30 min 90 V y 1.30 hr 250 V, dejar que salga todo el colorante.

Actividad en gel:

Una vez terminado el corrimiento en condiciones nativas y apreciar que, si había bandas en el gel, se procedió a agregar en un recipiente los sustratos para evaluar la actividad en gel de los complejos, los cuales se incubaron en el siguiente orden y condiciones:

- CIV: Para 100 mL de sustrato añadir: 50 mg diaminobenzidina tetrahidroclorada (DAB), 100 mg cyt c, 90 ml de buffer de fosfato 50 mM ph 7.4, hacer 10 a 15 alícuotas y almacenar por varios meses a -20°C. Incubar 15 mL alrededor de 2 h.
- CI: Para 20 ml de sustrato añadir: 20 mL agua+ 2mM Tris-HCl, 0.1 mg/mL NADH, 2.5 mg/ml Cloruro de azul de nitrotetrazolio (NTB), preparar fresca cada vez, incubar alrededor de 1.5 h cuidando que no se sature el fondo.

Finalmente se colocaron los geles en un acetato que lo cubriera de ambos lados y se escaneo para su posterior análisis en el programa Image J.