



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**“EFECTO DEL CADMIO EN LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS A NIVEL HEPÁTICO
EN UN MODELO MURINO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Presenta:

**Biol. Exp. Jessica Nohemí Jiménez Fabián
Matrícula: 2223803121
ORCID: 0000-0002-3149-6155
Correo: sicaggs@gmail.com**

Comite tutorial:

**Directora: Dra. Verónica Souza Arroyo
Asesora: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz
Asesora: Dra. Karina Martínez Flores**

Jurado:

**Presidenta: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz
Secretaria: Dra. Karina Martínez Flores
Vocal: Dra. Leticia Bucio Ortiz
Vocal: Dra. Natalia Nuño Lámbarri**

Iztapalapa, Ciudad de México, 13 de noviembre del 2024

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La que suscribe Jessica Nohemí Jiménez Fabián, alumna del posgrado Maestría en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: “Efecto del cadmio en la acumulación de lípidos a nivel hepático en un modelo murino”,

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para lo obtención del grado de Maestra en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación. La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 25 de noviembre del 2024.

Atentamente



Jessica Nohemí Jiménez Fabián

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 16 de octubre de 2024

Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental
Presente

La que suscribe (Jessica Nohemí Jiménez Fabián) alumna con número de matrícula 2223803121, del posgrado Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación “Efecto del cadmio en la acumulación de lípidos a nivel hepático en un modelo murino” a desarrollar en Universidad Autónoma Metropolitana, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Jessica Nohemí Jiménez Fabián

El presente trabajo fue realizado en

Laboratorio de Fisiología Celular y Medicina Traslacional, en el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Laboratorio de Medicina Experimental del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH).

El programa de la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el nivel consolidado y cuenta con apoyo del mismo consejo, clave DAFCYT2003IMPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada 838956.

MIEMBROS DEL JURADO



PRESIDENTA

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I



VOCAL

Dra. Natalia Nuño Lambarri

Unidad de investigación traslacional
Médica Sur



VOCAL

Dra. Leticia Bucio Ortiz

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I



SECRETARIA

Dra. Karina Martínez Flores

Laboratorio de Líquido Sinovial
Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra

MIEMBROS DEL COMITÉ DE TUTORES



Directora de tesis

Dra. Verónica Souza Arroyo
Profesor Titular C, Tiempo Completo
Laboratorio de Medicina Experimental y Traslacional
Departamento de Ciencias de Salud
Universidad Autónoma Metropolitana



Asesora

Dra. Karina Martínez Flores
Investigador en Ciencias Médicas “C”
Laboratorio de Líquido Sinovial
Dirección de Investigación
Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra



Asesora

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz
Profesor Titular C, Tiempo Completo
Laboratorio de Medicina Experimental y Traslacional
Departamento de Ciencias de Salud
Universidad Autónoma Metropolitana

Dedicada:

A mis hermanas J. Fabián, Erika y Areli

A mi madre, Nohemí Fabián

A mi abuela, Benita Canales

A mi abuelo, Alberto Fabián

A mi papá-tío, Alejandro Fabián

porque sin ustedes, no estaría

donde ahora me encuentro.

A mi Molly, por ser mi compañera

en las noches de estudio.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Verónica Souza Arroyo, por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por siempre estar disponible para resolver dudas o simplemente por darme palabras de aliento y también por apoyarme cuando lo necesite, gracias por ser esa excelente guía y persona para mí, no hay palabras que puedan representar lo agradecida que estoy con usted.

A la Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz por ser una constante en mi educación, siempre presente con palabras de aliento y porras para que no me rindiera; siempre dispuesta a compartir sus ideas conmigo y escuchar mis ideas.

A la Dra. Karina Martínez Flores porque desde el día que la conocí se volvió un gran apoyo para mí, siempre dispuesta a colaborar y aportar para el proyecto y para mi educación.

Al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz por su amplia aportación para el proyecto, dando ideas, siendo participe de mi educación y formación como estudiante.

A la Dra. Leticia Bucio y la Dra. Roxana Miranda por sus aportaciones y sus cuestionamientos en seminarios, una excelente práctica semana tras semana.

Al laboratorio de Toxicología en el CINVESTAV, en específico a la Dra. Del Razo por su aportación para el proyecto y en especial a la Quim. Luz del Carmen Sánchez por su amabilidad, gentileza y disposición para responder dudas.

Al Dr. Arturo Simoni, por su inigualable apoyo y confianza, siempre dispuesto a resolver dudas y también por la amistad brindada, donde los consejos y risas no faltaron. Gracias por siempre tener palabras de aliento que me ayudaron a la toma de decisiones.

A mis compañeros de laboratorio, Luis, Mariana, Natt y Liss por esas pláticas, de origen académico, pero también personales, agradezco el trabajo en equipo y el apoyo recibido.

A Melissa porque hizo que mi paso por el laboratorio fuera más ligero, las interminables pláticas con ella siempre fueron agradables.

Un agradecimiento especial a Alejandro Escobedo y Genaro, porque sin importar la situación, siempre estuvieron dispuestos a apoyarme y enseñarme, siempre el pie del cañón conmigo. A nivel personal, me llevo dos grandes amigos con quien sé puedo confiar incondicionalmente y que siempre estarán ahí, aun cuando mi paso por el laboratorio haya terminado.

A mis amigos de la licenciatura, Karly por su incondicional apoyo, siempre ahí dispuesta a salir a chismear y darme palabras de consuelo. A Dani porque aun cuando no tenemos tiempo para vernos, siempre es un gusto entablar una conversación con ella. A Martín y Mich, por siempre escucharme y apoyarme, desde la licenciatura me integraron a su grupo de amigos, haciéndome sentir en confianza. A los cuatro les agradezco por la paciencia y la espera, aun cuando casi no podemos vernos, siempre me reciben con los brazos abiertos y con gusto.

Agradezco a mi madre Nohemí Fabián, porque sin su apoyo y esfuerzo, no habría logrado nada de esto, agradezco su fortaleza y su ejemplo a seguir, que me enseñaron a no rendirme aun cuando la situación se pone complicada, siempre con su amor y apoyo, celebrando cada uno de mis éxitos, pero también abrazándome cuando algo no sale bien.

Agradezco enormemente a mi abuela, Benita Canales porque siempre que me aventuré a un nuevo reto, ha estado allí, dándome su bendición y su apoyo; también agradezco todas sus enseñanzas y lecciones de vida, siempre con ese carisma y con ese amor que me permitieron formarme como profesionista, pero más importante, como persona.

A mi abuelo Alberto Fabián, siempre ahí conmigo al pie de cañón, acompañándome en cada paso, con palabras de aliento, con lecciones y con su compromiso de apoyarme en cada paso dado, formando no solo una profesionista, sino también un ser humano dispuesto a esforzarse por lograr sus objetivos.

A mis hermanas, Erika y Areli J. Fabián, siempre siendo una unidad, con pleitos y desacuerdos, pero siempre ahí, apoyándonos y echándonos porras, desde pequeñas y hasta lo que dure la eternidad, gracias por tanto hermanas. Erika, gracias por siempre guiarme e ir conmigo de la mano, desde la primaria hasta la universidad, siempre juntas, siendo tu quien abrió mi camino para crecer y siendo un ejemplo que seguir. Areli, gracias por ese apoyo que siempre me has brindado, recuerdo que había una época donde yo estudiaba en la mañana y tú por la noche, el foco de nuestro cuarto no se apagaba por la noche, sin embargo, pusimos un artefacto que nos tapaba de la luz por las noches para dejarnos descansar; siempre al pendiente una de la otra, desde pequeñas.

A mi cuñada, Damariz, por sus palabras de motivación y por el apoyo brindado desde que llegó a la familia, siempre con disposición a escucharme y brindarme consejos.

A la familia Fabián Moreno, en especial a mi papá-tío Alejandro Fabián, porque me dio una figura paterna y un excelente ejemplo a seguir, siempre fue mi motor para seguir esforzándome con la esperanza de algún día poder llegar a ser tan grande como él, con la capacidad de poder ayudar a la familia sin pedir nada a cambio. A mi tía Rosita y Axel, por ser parte de esta aventura.

A la familia Fabián Reyes, por permitirme hospedarme con ellos cuando era necesario; un especial agradecimiento mi tía Cinthya, porque desde pequeña, siempre estuvo allí, dispuesta a ayudarme con mis tareas, siempre con consejos y lecciones de vida. Agradezco a mi tío Beto, por su disposición de apoyarme y a Gabriela Fabián por abrirme las puertas de su cuarto y compartir algunos gustos que me hacían sentir cercana a ella. A mis primos Fer y Lalo, por abrirme las puertas de su casa.

A la familia Fabián Cerón, porque siempre a su manera recibí su apoyo; Regis, agradezco que siempre me has permitido ser una guía para ti y que me has escuchado, incluso desde muy pequeña. Tío Adrián, siempre ahí en casa, platicando conmigo e intercambiando ideas e igual parte fundamental de mi crecimiento, como un hermano mayor.

A la familia Jiménez Martínez, destacando a mis abuelos Lino y Gelos, porque hicieron de mi infancia algo precioso, mi abuelo Lino siempre motivándonos a crecer y superarnos, siendo un consentidor que, sin importar la situación, siempre intentó darnos lo mejor. A mi abuela Gelos, que siempre está ahí, dispuesta a escucharme sin juzgarme, siendo un apoyo incondicional, siendo un papel importante en mi educación y formación como persona.

A mis tías Brenda y Diana, que desde que soy pequeña, siempre han estado allí, extendiendo su mano para apoyarme, hicieron de mi infancia algo hermoso, siendo mis cómplices, pero también llamando mi atención cuando fue necesario.

Agradezco enormemente a la familia Herrera Santos, en especial a mis suegros Sandra y Amado por incluirme en su familia abriendo las puertas de su casa desde el día en que los conocí y por apoyarme siempre, haciendo que mi paso por la maestría fuera un poco más fácil cuando decidí dar un gran paso para mi crecimiento personal.

A mis cuñadas, Mariana y Adriana. A Mariana porque aun cuando no lo sabe, fue una fuente de apoyo y motivación para continuar, siempre dándome palabras de aliento que fueron suficientes para no rendirme. A Adry, porque desde que llegué a la familia, siempre estuvo ahí, dispuesta a integrarme, pero también por las pláticas científicas que llegamos a entablar.

Gracias infinitas a Alejandro Herrera, la persona que elegí como mi compañero de vida, desde que inició nuestro noviazgo, siempre ha sido una fuente de apoyo enorme, que, sin importar la hora o el día, siempre está ahí dándome su apoyo. Ha sido para mí, una fuente de motivación y porras incondicionales que me han dado fuerza para no rendirme. Agradezco por extender sus brazos en los días que sentía no poder más pero también por celebrar conmigo los éxitos obtenidos, destacando siempre lo orgulloso que está de mí.

Y, gracias a Molly, por ser mi compañera, me hacía compañía en las madrugadas de estudio aun cuando el sueño le vencía, cuando tocaba tomar clases en casa, siempre fue mi compañera de aula, su simple presencia era una fuente de calma.

Resumen

El cadmio (Cd) es un metal tóxico que se encuentra en la corteza terrestre, sin función biológica con características químicas similares a elementos esenciales para el cuerpo humano como el calcio (Ca) y el zinc (Zn). Este metal se encuentra por fuentes naturales como las emisiones volcánicas o como subproducto de la obtención de elementos como el Zn y el plomo (Pb), entre otros, así como por fuentes antropogénicas como en la manufactura de pilas níquel-cadmio al ser un buen conductor y sus características anticorrosivas. En la actualidad, el humano se encuentra expuesto al Cd principalmente por la contaminación ambiental, así como por su presencia en la cadena alimenticia por el agua contaminada que se usa para riego de plantas, así mismo se ha encontrado en los fertilizantes fosfatados, y que algunos vegetales son capaces de almacenarlo, entre ellos se encuentran las hojas de hortalizas como las acelgas y la lechuga, así como algunas semillas como el arroz. Una vez que el Cd es ingerido, es absorbido a nivel intestinal y distribuido por el torrente sanguíneo unido a la albumina para ser depositado principalmente a nivel hepático. Diversos estudios *in vitro* en líneas celulares o en hepatocitos primarios obtenidos de ratón, han encontrado que el Cd es capaz de inducir la expresión de la proteína pequeña de 6 kDa llamada metalotioneína (MT-II) como mecanismo de protección y por otra parte, también está involucrado en desencadenar la muerte celular programada (apoptosis), así mismo, han encontrado en estos modelos experimentales que el Cd es capaz de inducir esteatosis al favorecer la acumulación de lípidos en los hepatocitos por diversos mecanismos entre ellos afectando el flujo

de la autofagia y por lo tanto, frenar la degradación de lípidos, así como favoreciendo la síntesis de lípidos al incrementar el contenido de las enzimas lipogénicas. Es por lo que, el interés de este proyecto fue evaluar si el Cd favorece la acumulación de lípidos y dilucidar los mecanismos moleculares que es capaz de desencadenar a nivel hepático en un modelo murino. Se trabajó con ratones de 8 semanas de edad de la cepa CD-1, los cuales fueron expuestos a una concentración de 10 mg/L Cd por un mes (sub-crónico) y tres meses (crónico). Al grupo de un mes, se les midió el volumen de agua consumido, así como el consumo de alimento y en el caso del grupo de tres meses junto con el grupo de un mes, además se les llevó el seguimiento del peso de los ratones. Una vez transcurrido cada tiempo de exposición, una noche previa a la eutanasia los animales fueron puestos en cajas metabólicas para la obtención de orina. En esta orina se evaluó la presencia de albumina mediante pruebas que incluían electroforesis y tinción con Azul Coomassie. Además, se determinó el contenido total de proteínas utilizando la técnica de BCA. Posterior a la eutanasia de los ratones se obtuvo el suero para la determinación de funcionalidad hepática con las tiras reactivas Kenshin-2, así como fotos del sistema gastrointestinal y hepático, seguida de la recolección del hígado para la obtención del peso del órgano y determinar el cociente del peso del hígado con respecto al peso del ratón; posteriormente, del hígado se recolectó un remanente que fue colocado en PFA al 4% y en seguida fue embebido en parafina para realizar cortes histológicos de 8 μm y la posterior tinción con hematoxilina-Eosina (H&E) y realizar el análisis morfométrico en ambos tiempos. A las muestras de tres meses también se les evaluó la presencia de colágena con la tinción de Rojo Sirio. Para evaluar el contenido de Cd y de elementos como

manganeso (Mn), hierro (Fe), cobalto (Co), cobre (Cu), zinc (Zn), yodo (I) y selenio (Se) a una exposición crónica se empleó la técnica de Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (por sus siglas en inglés ICP-MS). Además, se determinó en las muestras de hígado de exposición sub-crónica y crónica el colesterol total por la técnica O-phthaldehyde (OPA), así como el contenido de triglicéridos (TG) con el kit Triglyceride Assay. Para evaluar el contenido de gotas lipídicas, muestras de tejido fresco fueron embebidas en OCT (Temperatura de corte óptima, por sus siglas en inglés) para realizar cortes histológicos y teñirlos con aceite rojo oleoso (ORO), observándolos en el microscopio de campo claro. También se determinó el contenido de gotas lípidos y de colesterol con la tinción BODIPY observándolos en el microscopio confocal. Se obtuvo y cuantificó proteína para la determinación de la activación de las rutas de señalización AKT/mTOR, así como la familia de las MAPKs (ERK, p38 y JNK) y, la expresión de proteínas involucradas en la síntesis de lípidos y colesterol como SREBP-1c, ACLY, FasN y HMGCoAR, enzimas antioxidantes como SOD-1, GPx-1, Catalasa, GPx-1/2 y GPx-4, proteínas como HSP-70 y el factor de transcripción STAT3, así como la expresión de la MT-II por Western Blot. En muestras de exposición sub-crónica, se cuantificó el grado de lipoperoxidación por la técnica de TBARs (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, por sus siglas en inglés). Se demostró que el Cd no afecta el consumo de alimento ni de agua de los animales, tampoco altera el peso corporal o el cociente peso del hígado con respecto al peso del ratón, a nivel macroscópico, los ratones de un mes mostraron inflamación intestinal, sin embargo, a los tres meses, esta inflamación no fue persistente y a nivel hepático no se observaron alteraciones morfológicas ni a una exposición sub-crónica o crónica.

El consumo de Cd por tres meses favorece su depósito en el hígado sin alterar el contenido de elementos como Mn, Fe, Co, Cu, Zn y Se; del Cd consumido durante los tres meses solo el 0.095% se cuantificó en el órgano, porcentaje que fue capaz de alterar los niveles del I, al encontrar una correlación fuerte positiva entre el Cd y el I. Además, se encontró que el Cd favorece a un consumo sub-crónica, la proliferación de los hepatocitos, en contraste al consumo crónico, además de la proliferación, favorece la muerte de los hepatocitos. Las enzimas de funcionalidad hepática no se ven alteradas con el consumo sub-crónico y crónico y solo el contenido de TG a un mes de consumo disminuye en suero. La exposición a Cd durante uno y tres meses aparentemente no altera la funcionalidad renal, al no mostrar un incremento en la proteinuria. Con respecto a la deposición de colágena, la exposición a Cd durante tres meses no favorece que esta se acumule en el tejido hepático. Aunado a ello, se encontró que el Cd no favorece el incremento del contenido de la MT-II en el hígado, probablemente por no alterar el contenido del Zn. El Cd no altera el estado REDOX en el hígado al no incrementar la lipoperoxidación y aparentemente al mantener los niveles de las enzimas antioxidantes estables. A estos tiempos de exposición, se encontró que el Cd no promueve la acumulación de colesterol o de triglicéridos a nivel hepático al no activar a la ruta lipogenica por excelencia AKT/mTOR, ni a su factor de transcripción blanco SREBP-1c y que este a su vez no promueve la expresión de genes blanco lipogenicos como ACLY y FasN. También se encontró que el Cd no favorece la activación del factor de transcripción STAT3 y, por lo tanto, no promueve el incremento en la expresión de HSP-70. Se determinó que el Cd favorece la activación de p38 a tres meses de exposición, quizás como posible inductor de muerte

celular, así mismo, se encontró que el Cd reduce la activación de JNK, sin alterar a ERK. Sin embargo, falta dilucidar el papel que toma p38 y JNK en un consumo crónico de Cd. Aunado a ello, se encontró que el Cd favorece el incremento del I en el hígado, sin embargo, se desconoce la participación que tiene el I ante la exposición a este metal tóxico.

Estos resultados sugieren que el Cd es un inductor de daño hepático que favorece la proliferación de hepatocitos en un tiempo corto de consumo y a tiempos más largos, además de la proliferación, favorece la muerte celular. La exposición a uno y tres meses representan un tiempo corto para la inducción de la maquinaria lipogénica y, por lo tanto, no se favorece el incremento de lípidos en el hígado.

Abstract

Cadmium (Cd) is a toxic metal that is found in the earth's crust, without a biological function, with characteristics similar to those of essential elements for the human body, such as calcium (Ca) and zinc (Zn). This metal is obtained from natural sources such as volcanic emissions or subproducts of elements obtained such as Zn and lead (Pb), among others, as well as anthropogenic sources such as the manufacture of nickel-cadmium batteries because it is a good conductive metal y. Its anti-corrosive characteristics. Currently, humans are exposed to Cd primarily to environmental pollution, just like its presence in the food chain for the contaminated water that is used for the irrigation of plants; it has been seen that phosphate fertilizers contain Cd and that some vegetables are capable of storing, these include vegetables leaves as chard and lettuce, as well as some seeds like rice. Once Cd is ingested, it is absorbed at the intestinal level and distributed in the blood, such as the Cd-albumin complex, which is deposited mainly in the liver. Several studies in vitro in cell lines or primary hepatocyte culture obtained from mice have found that Cd is capable of inducing expression of a small protein of 6 kDa named metallothionein (MT-II) such as protection mechanism and Cd is involved in programmed cell death (apoptosis), in addition, have found in this models that Cd is capable of inducing steatosis to promote the lipid accumulation in the hepatocytes for diverse mechanism among them, affecting of autophagy flux and therefore stopped the lipid degradation, just as promote the lipid synthesis to induces the content increment of lipogenic enzymes. That is why the interest of this project was evaluated if the Cd promotes hepatic lipid accumulation and elucidates the molecular

mechanisms capable of triggering at a hepatic level in a murine model. It worked with mice of 8 weeks of CD-1 strain exposed to Cd for one month (sub-chronic) and three months (chronic). For the one-month group, the measurement of water volume and food consumption was carried out, and in the case of the three-month group with the one-month group, the follow-up of body weight was carried out. After any time, one night before euthanasia, the animals are placed in metabolic cages for the urine to be obtained. In this urine, the albumin presence was evaluated through probes that included electrophoresis and Coomassie Blue stain. In addition, the total protein content in urine with BCA was determined. The animals were euthanized and obtained serum for the determination of hepatic functionality with the Kenshin-2 strips and photos at the systemic level; the liver was into a photo, and the obtained liver weight was to evaluate the quotient of liver weight with respect to the mouse weight. Later, one part of the liver was collected and put in PFA 4% and then was embedded in paraffin to realize histological sections of 8 μm and then hematoxylin and eosin (H&E) stain and make the morphometric analysis in both times, for the samples of three months also made the determination of collagen in tissue for Red Sirius stain. To evaluate the content of Cd and element how Cd and other elements such as manganese (Mn), iron (Fe), cobalt (Co), copper (Cu), zinc (Zn), selenium (Se), and iodine (I) in a chronic exposure was employed the Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) technique. Also, it was determined in liver samples of sub-chronic and chronic exposure the total cholesterol with O-phthalneyde (OPA) technique, as well as for the quantification of triglyceride content with the Triglyceride Assay Kit. Fresh tissue was embedded on Optimal Cutting Temperature (OCT) for histological sections and stained

with Oil Red O (ORO) to evaluate the lipid droplet content observed in the clear field microscope. In addition, the lipid droplet content and cholesterol were determined using a BODIPY stain in the confocal microscope. The protein was obtained and quantified for the determination of the activation of signaling pathways AKT/mTOR and MAPKs family (ERK, p38, and JNK) and the expression of proteins involved in the lipid and cholesterol synthesis such as SREBP-1c, ACLY, Fasn and HMGCoA, antioxidants enzymes such as SOD-1, GPx-1, Catalase, GPx-1/2 and GPx-4, HSP-70 protein and transcription factor STAT3 as well as to evaluate the MT-II expression by Western Blot. In obtained samples of sub-chronic exposure, the level of lipoperoxidation was quantified by the Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) technique. It was demonstrated that Cd did not affect the food and water consumption of animals, nor affect body weight or quotient of liver weight with respect to body weight; at the macroscopic level, the mice of one month showed an intestinal inflammation; however, at three months the inflammation it was not persistent and in hepatic level, did not show morphological alterations in a sub-chronic and chronic exposure. The Cd consumption for three months promotes its deposit in the liver without altering the content of elements: Mn, Fe, Co, Cu, Zn y Se; Cd consumed for around three months only the 0.095% was quantified in the liver, a percentage that is capable of alter the I level, to found and strong positive correlation between Cad and I. In addition, it was found that Cd promotes hepatocyte proliferation in sub-chronic exposure, in contrast to chronic consumption, which promotes hepatocyte cell death apart from proliferation. The functionality of hepatic enzymes did not alter with the sub-chronic and chronic consumption, and only triglycerides content at one month decrease in serum. Cd

exposure for around one and three months apparently did not alter the renal functionality not to show proteinuria increment. Regarding collagen deposition, the Cd exposure at three months did not promote collagen accumulation in hepatic tissue. In addition, it found that Cd did not promote MT-II increment content in liver, probably, to did not alter Zn content. Cd did not alter the liver's REDOX state to prevent lipoperoxidation increment and, apparently, maintain antioxidant enzymes at a stable level. At these exposure times, it was found that Cd did not promote the cholesterol and triglycerides hepatic accumulation to not activate the lipogenic route AKT/mTOR, or it targeted SREBP-1c and did not promote the expression of target genes lipogenicsuch as ACLY and FasN. It also found that Cd did not favor the activation of transcription factor STAT-3, so the HSP-70 accumulation was not promoted. It was determined that Cd promotes the p38 activation at three months of exposure, maybe like a possible inductor of death cells. Moreover, it was found that Cd reduces the JNKactivation without altering ERK. However, the role of p38 and JNK in chronic consumption of Cd remains to be elucidated. In addition to this, it found that Cd promotes the increment of I in the liver; however, the participation of I in the exposure of this toxic metal is unknown.

These results suggest that Cd is a hepatic damage inductor that promotes the hepatocyte's proliferation in a short time of consumption and in a long time, in addition to proliferation, promotes the hepatocyte's death cell. The one- and three-month exposure represents a short time for lipogenic machinery induction; therefore, it does not promote lipid increment in the liver.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Generalidades de hígado.....	1
1.2. Enfermedad hepática esteatotica asociada a disfunción metabólica	4
1.3. Regeneración hepática	7
1.4. El cadmio	8
1.5. Efecto del cadmio en la salud y su relación con el hígado graso	10
1.6. La ruta de señalización AKT/mTOR.....	14
1.7. La familia de las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs)	16
1.8. Yodo	19
2. Antecedentes	21
3. Justificación	22
4. Pregunta de investigación	23
5. Hipótesis	23
6. Objetivos	24
7. Material y métodos	25
7.1. Animales.....	25
7.2. Tratamiento a los ratones	25
7.3. Determinación de la funcionalidad hepática en suero	26
7.4. Determinación del contenido de Cd en tejido hepático por ICP-MS.....	26
7.5. Análisis histológico.....	27

7.6. Determinación de la acumulación de colágena por Rojo Sirio	27
7.7. Determinación de proteinuria	28
7.8. Determinación de proteína total en orina	28
7.9. Determinación del contenido de colesterol por O-phthaldehyde	29
7.10. Determinación del contenido de triglicéridos	29
7.11. Tinción de gotas lipídicas, aceite rojo oleoso (ORO)	30
7.12. Tinción de gotas lipídicas y colesterol por BODIPY	30
7.13. Lisis de proteínas y cuantificación de proteínas	31
7.14. Determinación de proteínas por Western Blot.....	31
7.15. Determinación del grado de lipoperoxidación en tejido.....	33
7.16. Análisis estadístico	34
8. Resultados	35
8.1. Efecto de la exposición sub-crónica y crónica de cadmio en el consumo alimenticio y a nivel morfológico.....	35
8.2. Acumulación de Cd en el hígado en la exposición crónica	38
8.3. Efecto de la exposición sub-crónica y crónica de Cd a nivel microscópico en tejido hepático	42
8.4. El consumo sub-crónico y crónico de Cd y su efecto en la funcionalidad hepática	44
8.5. El consumo sub-crónico y crónico y el efecto en la funcionalidad renal	46

8.6. El consumo sub-crónico de Cd y su efecto en la acumulación de colágena a nivel hepático.....	47
8.7. Efecto del consumo de Cd en la expresión de la metalotioneina-II	48
8.8. Efecto del Cd en la lipoperoxidación y el contenido de enzimas antioxidantes	49
8.9. Efecto de la exposición sub-crónica y crónica de Cd sobre la acumulación de lípidos en tejido hepático	51
8.10. Efecto del consumo sub-crónico y crónico de Cd en la ruta de señalización de AKT/mTOR y del factor de transcripción SREBP-1c.....	54
8.11. Efecto de la exposición sub-crónica y crónica a Cd en la expresión de STAT-3 y HSP-7057	
8.12. Efecto del consumo crónico de Cd en la activación de las MAPKs.....	59
8.13. Efecto del consumo de Cd en relación al Yodo a nivel hepático.....	61
9. Discusión	62
10. Conclusión	72
11. Referencias	74

1. Introducción

1.1. Generalidades de hígado

El hígado es el órgano interno más grande y lleva a cabo diversas funciones vitales (Gadd et al., 2020); es un órgano metabólicamente esencial, porque en él se realiza el metabolismo energético del cuerpo, ya que también influye a nivel de músculo esquelético y de tejido adiposo (Rui, 2014). Controla el metabolismo glucolítico y de la urea, la detoxificación de la sangre y los niveles de colesterol (Gordillo et al., 2015). De tal manera que tiene un papel importante en el metabolismo, detoxificación, regulación de la inflamación y biosíntesis de moléculas (Maeso-Díaz et al., 2018). Las funciones del hígado son realizadas por los hepatocitos, quienes filtran y procesan los nutrientes de la sangre, metabolitos, hormonas, drogas y otros compuestos para su almacenamiento y excreción (Dao Thi et al., 2020). El hígado está dividido en su unidad funcional denominada acino o lobulillo (Hijmans et al., 2014), cada lobulillo está compuesto de una vena central desde donde los cordones de hepatocitos irradian hacia las triadas hepáticas, la cual se compone de vena porta, arteria hepática y ducto biliar (Fig. 1A) (Gordillo et al., 2015). El flujo de la sangre dentro del lóbulo es direccional, la sangre rica en nutrientes, pero también en genotóxicos y fármacos provienen de la vena porta y la sangre rica en oxígeno proviene de la arteria hepática hacia la vena central donde son drenados fuera del hígado, por el contrario la bilis que se produce en los hepatocitos va desde la vena central hacia el canalículo biliar para ser depositada en la vesícula biliar (Jones et al., 2023), gracias a esto el acino puede ser subdividido en tres diferentes zonas; la zona uno o peri-portal que recibe sangre rica

en nutrientes de la vena porta y sangre rica en oxígeno proveniente de la arteria hepática, una zona intermedia y la zona peri-central o zona tres donde la sangre es drenada del hígado por la vena central (Hijmans et al., 2014) (Fig.1B). El tejido hepático está compuesto de diversos tipos celulares de diferente origen embrionario, incluyendo células epiteliales como los hepatocitos y colangiocitos, así como células no parenquimales como las células estelares, células de Kupffer y células hepáticas endoteliales, cada una de estas células con funciones únicas que en conjunto regulan la función hepática en múltiples niveles (Liu et al., 2017; Trefts et al., 2017).

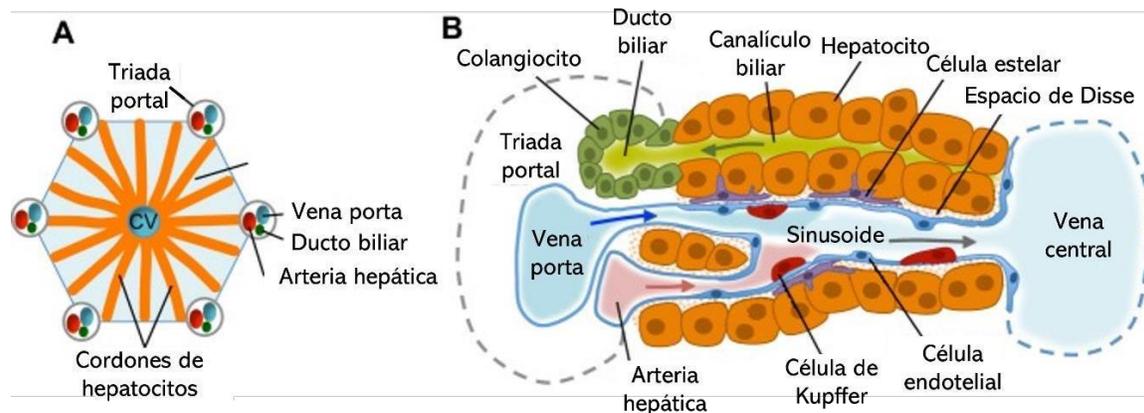


Fig. 1 Características generales del tejido hepático. A) Imagen representativa de la unidad funcional hepática denominada acino, que se compone por la diversas triadas portales compuestas de la vena portal, ducto biliar y la arteria hepática con cordones de hepatocitos que corren hacia la vena central (CV). B) Representación del flujo de la sangre, las flechas azules representan el flujo de la triada hepática hacia la vena central y la flecha verde representa el flujo de la bilis que va desde la vena central hacia el canalículo biliar. También se muestran los diversos tipos celulares que componen al tejido. Imagen tomada y modificada de (Gordillo et al., 2015).

Los hepatocitos representan el 80% de la masa hepática en el órgano adulto y llevan a cabo casi todas las funciones relacionadas con el metabolismo, tienen una polarización única con una membrana basal frente a las células endoteliales hepáticas, mientras uno o más polos apicales pueden formar varios canalículos biliares (Gissen et al., 2015; Messina et al., 2020). Los colangiocitos son células que limitan los ductos biliares intra y extra hepático, son células altamente especializadas en un complejo nicho anatómico donde participan en la producción y la homeostasis de la bilis (Banales et al., 2019). Las células hepáticas endoteliales están caracterizadas por su morfología única y su función especializada, tienen la habilidad de eliminar una variedad de macromoléculas desde la circulación, gracias a que forman placas fenestradas en el lumen sinusoidal, creando poros, que son críticos para el intercambio de proteínas y partículas entre la sangre y el hígado, mientras mantienen una función de barrera (Kus et al., 2019; Trefts et al., 2017). Las células de Kupffer juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del hígado (Deng et al., 2020), pueden producir citocinas y otros mediadores biológicos activos, como especies reactivas de oxígeno (ERO) para regular las funciones de las células vecinas (Cheng et al., 2019). Las células estelares hepáticas es un término de un tipo de células no parenquimatosas residentes, situadas en el espacio subendotelial de Disse, participan en la transición de daño crónico hepático a cirrosis, donde las células estelares quiescente se diferencian a células como miofibroblastos, lo cual resulta en proliferación y una excesiva generación de matriz extracelular (Liu et al., 2020).

Debido a estas características el hígado es un órgano dinámico y heterogéneo que está bajo un alto control fisiológico, sin embargo, un mal estilo de vida y la exposición a la contaminación ambiental pueden llevar al desarrollo de diversas enfermedades hepáticas, entre ellas la esteatosis hepática.

1.2. Enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica

La enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica (MASLD, por sus siglas en inglés) es una enfermedad progresiva, caracterizada por un exceso en el depósito de grasa en el hígado debido a diversos factores, como: el sobrepeso, obesidad, dislipidemia, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, principalmente (Castro et al., 2015). MASLD es un término que hace referencia a un espectro de enfermedades que va desde la acumulación de grasa dentro de los hepatocitos, es decir, esteatosis, que puede progresar a esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH, por sus siglas en inglés), que se caracteriza por daño hepatocelular, inflamación portal y lobular; si el estímulo de daño continúa, la enfermedad puede derivar a fibrosis con un excesivo depósito de matriz extracelular, avanzar a cirrosis y terminar en un carcinoma hepatocelular (Fig. 2) (HCC, por sus siglas en inglés) (Provera et al., 2024; Targher et al., 2024). La prevalencia del MASLD es de un 80% en pacientes con obesidad y un 20% en individuos sanos de la población occidental, por lo que se ha convertido en la principal causa de daño crónico hepático en los países occidentales (Pi et al., 2019).

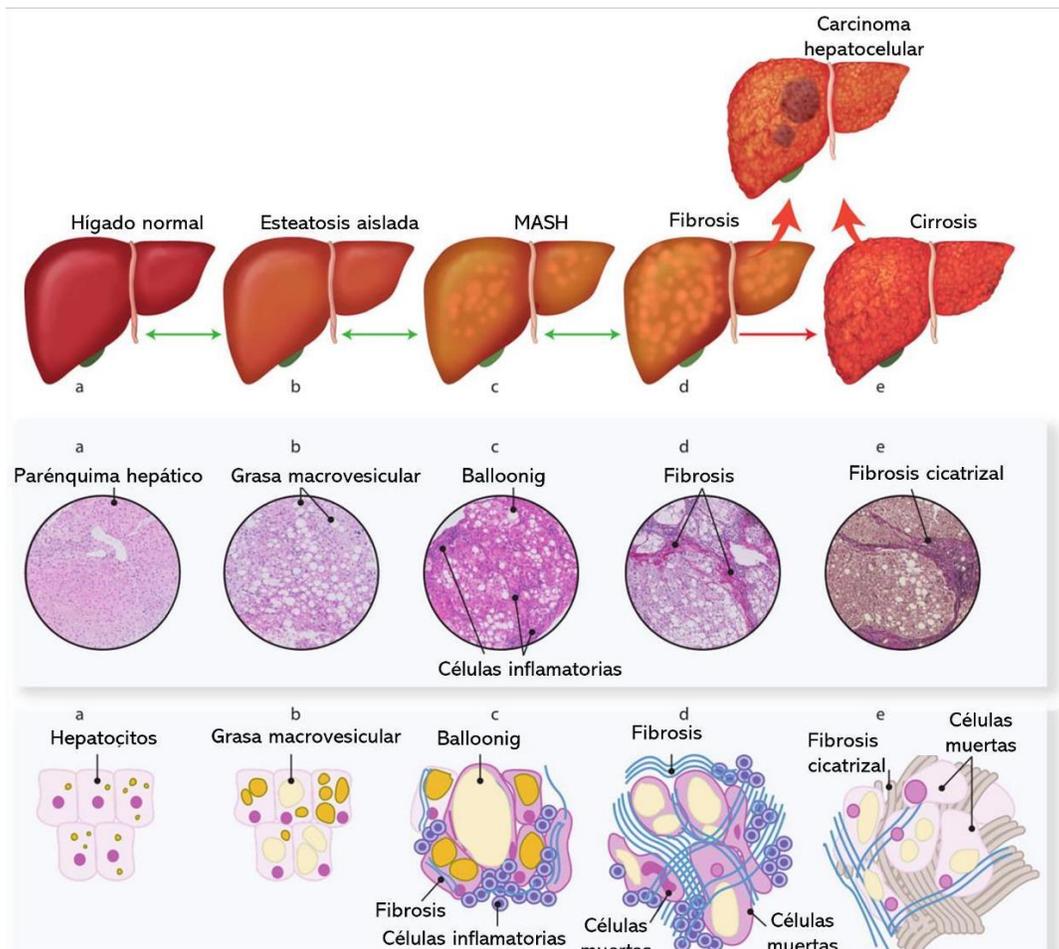


Fig. 2 Progresión de la enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica. Se muestra los cambios a nivel macroscópico, histológico y microscópico de las diferentes etapas del MASLD, en los que se muestra la acumulación de lípidos, inflamación y formación de matriz extracelular. Imagen tomada y modificada de (Ruissen et al., 2020).

La MASLD presenta un estadio temprano de esteatosis, que es la acumulación de grasa en un 5% o más en los hepatocitos, debido al incremento en la lipogénesis y a la disminución de la hidrólisis de ácidos grasos (Mittal et al., 2020). A pesar de que la patogénesis del MASLD no está totalmente caracterizada, se considera que la obesidad y la resistencia a la insulina son dos factores críticos que contribuyen al

incremento de la lipólisis. Cuando el tejido adiposo llega a su límite de almacenaje de lípidos, éstos son acumulados en el tejido hepático, debido a que la grasa visceral es liberada de los adipocitos, incrementando los ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo y favoreciendo su ingreso al hígado por la vena porta, posteriormente son transportados al hepatocito por medio de las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATPs, por sus siglas en inglés), lo que altera el metabolismo de los ácidos grasos (Chen et al., 2018; Hanlon et al., 2022; Park et al., 2014; Polyzos et al., 2017). La lipogénesis *de novo* también promueve la acumulación de lípidos hepáticos, además, el transporte de lípidos al exterior del hígado se afecta con la disminución en la secreción de lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo que promueve la acumulación de lípidos en el hígado (Asif et al., 2022). Por otra parte, se ha referido la participación de diversos factores de transcripción, como la proteína de unión al elemento regulador de esterol (SREBP, por sus siglas en inglés), la proteína de unión a elementos sensibles a carbohidratos (ChREBP, por sus siglas en inglés) y las enzimas acetil-Coa carboxilasa (ACC1) y ácido graso sintasa (FASN, por sus siglas en inglés) en el proceso de lipogénesis *de novo*. En relación con el desarrollo de MASLD, se ha propuesto que involucra la presencia de múltiples eventos como: el estrés oxidante (EO), inflamación por el incremento de moléculas proinflamatorias, dislipidemia, hipovitaminosis E y la desregulación de la microbiota (Angelico et al., 2021). La acumulación de grasa en el hígado está asociada con la pérdida de balance entre la deposición de lípidos y las rutas de degradación (Asif et al., 2022). La primera etapa en el desarrollo de la MASLD se caracteriza por una acumulación excesiva de gotas lipídicas en los hepatocitos (Gao et al., 2020). Las gotas lipídicas intracelulares

constituyen la mayor reserva de energía en el hígado; la desregulación de las gotas lipídicas hepáticas y el contenido de triglicéridos ocurre en diferentes enfermedades, incluyendo enfermedad del hígado graso y diabetes mellitus tipo 2 (Tsai et al., 2017).

Las gotas lipídicas son esferas dinámicas que rápidamente se pueden expandir y encoger debido a fluctuaciones en la velocidad de síntesis y degradación de triglicéridos (De la Rosa Rodriguez et al., 2021); son grandes almacenes de triglicéridos, lípidos y colesterol esterificado en las células. El metabolismo de las gotas lipídicas regula el estado metabólico del hígado (Gao et al., 2020; Schulze et al., 2020). A nivel celular los hepatocitos metabolizan las gotas lipídicas en el lisosoma mediante el proceso de autofagia (Schulze et al., 2020).

1.3. Regeneración hepática

El hígado desempeña funciones homeostáticas vitales como regular el metabolismo, la detoxificación de drogas y xenobióticos, así como resistir la respuesta inmunológica contra infecciones virales y bacterianas (Trefts et al., 2017). Debido a su localización anatómica, el hígado es continuamente expuesto a componentes de la dieta, químicos tóxicos y agentes patogénicos que potencialmente pueden promover el daño hepático y su falla, sin embargo, este órgano puede mantener su integridad debido a su extraordinaria capacidad regenerativa (Michalopoulos et al., 2020), mediada por las células progenitoras hepáticas, las cuales comprometen menos de 0.01% del parénquima hepático en el hígado adulto y de las que se sabe, tienen una alta capacidad regenerativa (Yagi et al., 2020) Sin embargo, diversos autores han

encontrado que hepatocitos etiquetados con una sonda fluorescente pueden favorecer la expansión clonal de hepatocitos, demostrando que la homeostasis hepática está relacionada con la proliferación de hepatocitos en todas las zonas hepáticas (Ang et al., 2019; Planas-Paz et al., 2016; Sun et al., 2020). Bajo condiciones homeostáticas, los hepatocitos se encuentran en un estado quiescente (G0) con poca proliferación, sin embargo, bajo la pérdida del parénquima, inicia la proliferación rápida de los hepatocitos para restaurar la función metabólica (Gadd et al., 2020), estos datos han sugerido que la homeostasis de la reserva de hepatocitos es remplazada por hepatocitos preexistentes más que por células progenitoras (Li et al., 2020). En modelos experimentales han comprobado que, en procesos iniciales de la regeneración hepática, los hepatocitos pueden acumular gotas de grasa, la cual tiende a desaparecer, esto posiblemente como una respuesta metabólica hepatocelular al daño, para generar fuentes de energía y material para la construcción de membranas (Lagomarsino, 2012).

1.4. El cadmio

Desde hace algunas décadas, seguido de la abundante accesibilidad de varios materiales químicos, la tasa de intoxicación con metales pesados se ha incrementado considerablemente, las personas pueden usar drogas o químicos de forma equivocada favoreciendo el envenenamiento intencional o accidentalmente (Paudyal, 2005). Los metales pesados, similar a otros químicos, provienen de fuentes naturales o industriales, entre los metales pesados se encuentra el Cd, número atómico 48, masa atómica 112, el cual es un metal tóxico que se encuentra en el ambiente procedente

de fuentes naturales, tales como las emisiones volcánicas y la erosión de las rocas, así como fuentes antropogénicas debidas al desarrollo industrial y el alto consumo de combustibles fósiles, lo cual genera un grave problema ambiental (Cao et al., 2021). Se ha determinado que el total de emisiones de Cd oscila en cantidades de 7000 toneladas por año (Godt et al., 2006). El Cd no tiene función biológica, pero puede acumularse en diversos organismos, lo que constituye una amenaza a largo plazo para la salud de los humanos y de animales. Es liberado al suelo, al agua y al aire durante la extracción y refinación de metales no ferrosos como el Zn, el Pb y el Cu, la manufactura y aplicación de abonos fosfatados, la combustión de combustibles fósiles, y la disposición e incineración de basura (Fig. 3) (ATSDR, 1999). Su producción comercial empezó al inicio del siglo XX al ser utilizado en la galvanoplastia (técnica electroquímica que consiste en depositar capas de metal sobre objetos para modificar sus propiedades), pero hoy en día se utiliza en las baterías cadmio-níquel, en pigmentos, revestimiento y como un estabilizador de otros plásticos (WHO, 2019). Cuando el Cd se quema en el aire, forma óxido de Cd (CdO), así mismo el Cd se disuelve con el ácido sulfúrico, clorhídrico y nítrico, formando sulfato de Cd (CdSO_4), cloruro de Cd (CdCl_2) y nitrato de Cd ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) respectivamente (Suhani et al., 2021). La exposición humana al Cd ocurre a través de la inhalación o ingesta. Solo un 10% del Cd inhalado es absorbido, dependiendo del tamaño de la partícula; cerca del 5 al 10% del Cd ingerido es absorbido a nivel intestinal y se ha visto que, en personas con deficiencia en Fe, Ca o Zn, se favorece su absorción intestinal (Bernhoft, 2013).

Generalmente, el Cd y sus compuestos son hidrofílicos en la naturaleza, esto permite que fácilmente entren en la cadena alimenticia. Alimentos obtenidos de cultivos como el trigo, arroz, papas y otros vegetales acumulan Cd gracias a su riego con agua contaminada por la industria y al uso de fertilizantes fosfatados (Khan et al., 2022).

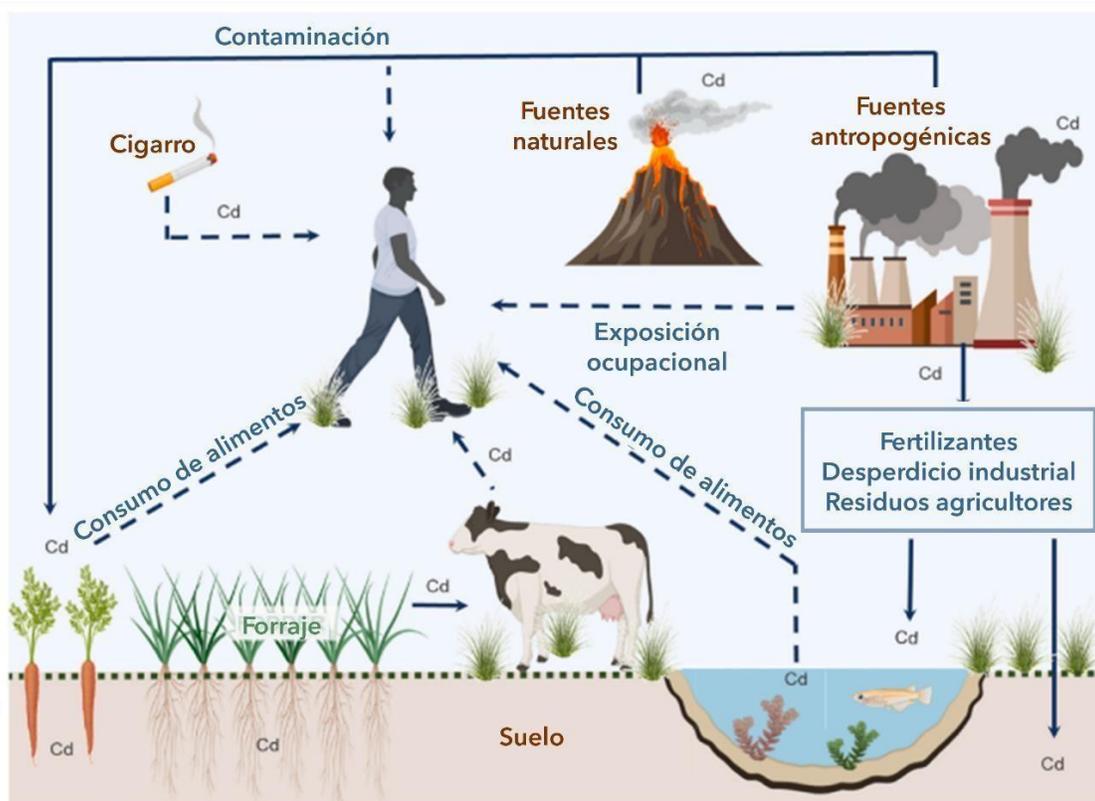


Fig. 3 Fuentes de exposición humana al Cd. Las fuentes antropogénicas y las fuentes naturales, son la forma en la que el Cd entra en contacto con el humano, favoreciendo la acumulación del Cd en la cadena alimenticia. Imagen tomada de (Hernández-Cruz et al., 2022)

1.5. Efecto del cadmio en la salud y su relación con el hígado graso

En el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) mediante el Programa Nacional Estratégico de Agentes Tóxicos y Procesos

Contaminantes (Pronaces ATPC) en un ciclo de Webinars (2023) donde participó la Dra. Ofelia Morton, quien ha evaluado el tiempo de vida de metales en una zona metalúrgica en San Luis Potosí; área donde se encontraron restos de metales en muestras de sangre de niños, resaltando el exceso de Cd encontrado en sangre. Recalcó que el impacto de la exposición de metales en México está subestimado. Su estudio resalta que dicha problemática debe ser atendida, dado que, en la actualidad solo se tienen algunas normas que regulan el contenido de Cd en suelos de zonas mineras, más no en la exposición del humano al Cd (Morton, 2023).

El Cd se absorbe en el intestino delgado, debido a la ingestión de crustáceos, moluscos, bivalvos, ostras, cangrejos, y plantas o agua contaminada (Genchi et al., 2020; He et al., 2020; Ohta et al., 2020). La exposición ocupacional a Cd en talleres de reciclaje de baterías y de soldaduras da lugar a la acumulación de Cd en pulmones (Cao et al., 2021). Los efectos a nivel sistémico del Cd se han visto en los riñones, hígado, sistema hematopoyético y el músculo esquelético. En los riñones, se ha reportado una disfunción tubular renal; en pulmones la inhalación de CdO puede causar neumonitis y edema pulmonar; y la exposición crónica o ambiental del metal, induce cambios en los pulmones causando enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Rahman et al., 2022; Reyes-Hinojosa et al., 2019). Recientemente datos no publicados por el grupo de Martínez-Flores et al, encontraron niveles significativos de Cd en sangre de pacientes fumadores con osteoartritis de 0.94 ng/ml en contraste a pacientes no fumadores con un valor de 0.086 ng/ml, afectando los niveles de catalasa

y glutatión s transferasa, sugiriendo que esto incrementa el deterioro en los pacientes expuestos a Cd (Martínez-Flores et al, 2024).

El Cd se bioacumula principalmente en el hígado y los riñones por la expresión de la metalotioneína II (MT-II), una proteína que quela a este metal (Martínez-Flores et al., 2013). El Cd puede difundir a través de la membrana plasmática mediante diversos transportadores, incluidos los canales iónicos (Souza-Arroyo et al., 2022; Vanlaeys et al., 2020; Zou et al., 2020). Se ha encontrado una correlación positiva entre la expresión de diversos transportadores y el aumento en la concentración de Cd en el intestino. Ohta et al. (2020), encontraron que los transportadores de metales esenciales como el transportador de zinc ZIP4, el transportador de hierro DMT1, el transportador de cobre ATP7A y el transportador de calcio TRPV6, aumentan su expresión conforme la concentración de Cd aumenta, lo que sugiere que estos transportadores están involucrados en la absorción del Cd principalmente a nivel de duodeno.

Una vez que el Cd es absorbido a nivel intestinal, se une con la albumina generando el complejo Cd-Alb, es así como se transporta por la vena mesentérica hasta la vena porta para ser depositado en el hígado, donde se deshace el complejo Cd-Alb y se forma el complejo Cd-MT (metalotioneína) o Cd-GSH (Glutathion), en el hígado se puede almacenar por 25 años, para posteriormente ser excretado vía la orina o heces, también se puede depositar en el cabello. Una parte es excretada por medio de las heces antes de ser absorbida (Fig. 4) (Hernández-Cruz et al., 2022).

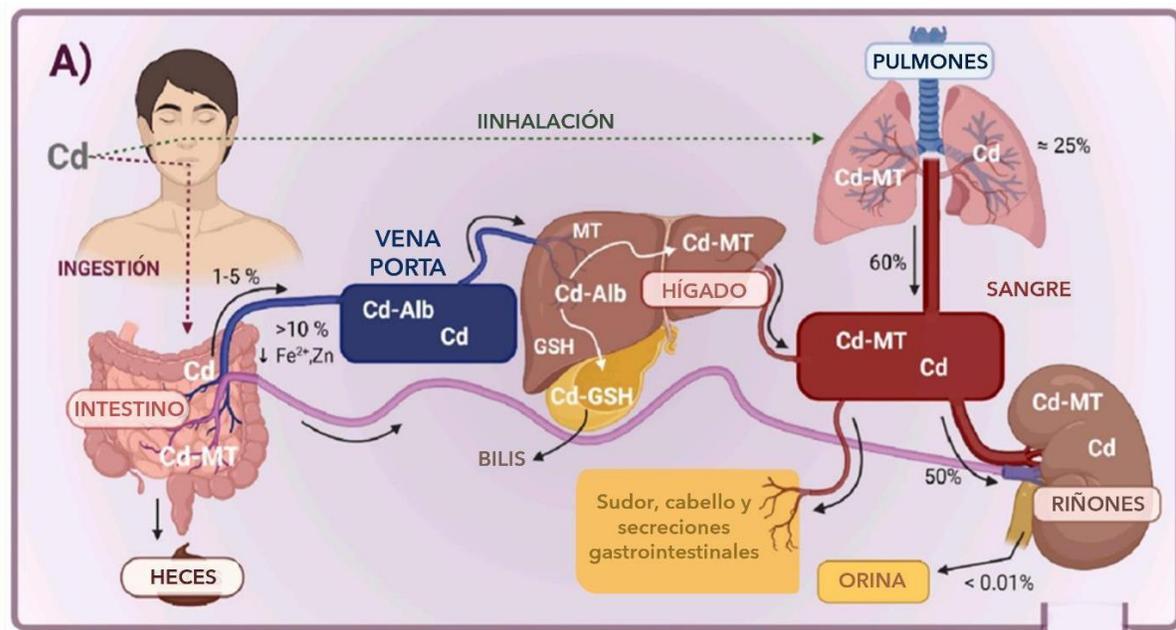


Fig. 4. Absorción y distribución del Cd posterior a su ingesta y/o su inhalación. El Cd puede ser absorbido por el organismo a través de la ingestión en un 10% y por la inhalación en un 25% aproximadamente y ser distribuido al hígado y riñones y solo un 0.01% es excretado por la orina. Imagen tomada y modificada de (Hernández-Cruz et al, 2022).

Se ha encontrado una asociación entre la exposición ambiental a bajas concentraciones de Cd y síndrome metabólico, diabetes, hipertensión, daño en la función renal, enfermedades hepáticas crónicas, cáncer pulmonar, enfermedades cardiovasculares, entre otras (Park et al., 2021). Los desórdenes metabólicos son el principal factor de riesgo para el desarrollo de MASLD, mientras que otros factores también podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad del hígado graso; se ha sugerido la asociación entre la exposición ambiental a Cd con necroinflamación, MASLD y MASH en hombres (Rosales-Cruz et al., 2018). Diversos estudios han demostrado que la acumulación de Cd en el hígado promueve la lipogénesis hepática, MASLD y MASH, por la sobrerregulación de SREBP1/2, la supresión de PPAR- α y la

inhibición de sirtuina-1 (SIRT1) (Alshehri et al., 2021). Aunado a esto se ha reportado que el Cd modula la acumulación de lípidos y promueve la fibrosis hepática en una exposición aguda en células HepG2 y SK-Hep1. En exposición crónica a Cd estas líneas celulares incrementan el contenido del marcador oncogénico Notch y que promueve la acumulación lipídica al desregular la autofagia mediada por AKT/mTOR (Niture et al., 2023).

En nuestro grupo de investigación se evidenció que el Cd incrementa el contenido de lípidos en los hepatocitos a través de una disminución en el contenido de LC-3-II en función del tiempo y la concentración, mientras que los niveles de p62 se mantienen, lo que sugiere que el Cd afecta el proceso de la autofagia llevando a la acumulación de lípidos. Como consecuencia, la inhibición de la macroautofagia disminuye el rompimiento lipolítico de triglicéridos y colesterol (Rosales-Cruz et al., 2018). En modelos animales, se ha evaluado el impacto de la exposición crónica a Cd en concentraciones bajas, encontraron que la exposición a 10 mg/L de Cd durante 20 semanas potencia el desarrollo de hígado graso como resultado de la desregulación en la síntesis de lípidos; la concentración de triglicéridos, diacilglicerol y colesterol se ven incrementadas en el tejido hepático (Go et al., 2015).

1.6. La ruta de señalización AKT/mTOR

La proteína cinasa B o AKT es el principal componente de la ruta de señalización de la insulina, juega un papel crucial en diversas funciones del cuerpo, como la regulación del metabolismo, homeostasis de energía, proliferación y muerte celular, especialmente en tejidos como hígado, músculo, riñón y cerebro (Wei et al., 2019). La

proteína AKT es una cinasa serina/treonina que comprende tres subtipos, AKT1, AKT2 y AKT3; AKT1, es expresada en la mayoría de los tejidos, AKT2 es expresada principalmente en los tejidos sensibles a insulina y AKT3 es expresada solamente en cerebro y testículos (Xu et al., 2021). La fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K por sus siglas en inglés) es el principal efector río abajo de receptores acoplados a proteínas G y receptores transmembranales con actividad de tirosina cinasa (RTKs por sus siglas en inglés), que transduce las señales de factores de crecimiento a través del uso de mensajeros intracelulares mediante la generación de fosfolípidos como el inositol trifosfato (IP3), los cuales estimulan la activación de AKT a través de la fosforilación a nivel de serina 473 y treonina 308; AKT sirve como el principal efector de PI3K al tener como blanco la activación mTORC1 (Xu et al., 2020). La lipogénesis puede ser activada por mTOR, una ruta de señalización conocida por controlar el crecimiento y metabolismo celular en respuesta a nutrientes, factores de crecimiento y el estatus energético (Wang et al., 2015). mTOR es una proteína cinasa serina/treonina, miembro de la familia de proteínas cinasa asociadas a PI3K que participa en censar las señales nutricionales y regular el crecimiento celular y proliferación (Xu et al., 2021). mTOR forma dos complejos multiproteicos funcionales. El complejo 1 de mTOR (mTORC1) media la biogénesis de ribosomas, traducción de proteínas, autofagia y lipogénesis, se compone de mTOR, Raptor, MLST8, PRAS40 y DEPTOR y sus blancos río abajo son S6K y 4EBP1, los cuales desempeñan papeles críticos en la síntesis de proteínas y respuesta nutricional. El complejo 2 de mTOR contribuye a la dinámica de la actina y se compone de mTOR, RICTOR, mLST8, PROTOR1/2, DEPTOR y mSIN1; mTORC2

interactúa con PDK1 para activar AKT vía fosforilación a nivel de serina 473 (Chadha et al., 2020; Peng et al., 2022).

Se ha demostrado que mTORC1 regula la actividad de SREBP1 y contribuye a la lipogénesis dependiente de AKT (Kumar et al., 2022); debido a que la activación de AKT induce la expresión de genes lipogénicos, incluidos ACLY y FASN, mediante la activación de SREBP1, mediada por mTORC1, esto al observar que la activación de AKT potencia la incorporación de glucosa, piruvato o acetato a lípidos, lo cual fue bloqueado por rapamicina, demostrando que AKT regula la lipogénesis *de novo* y que la actividad de mTORC1 es requerida para este efecto (Porstmann et al., 2008).

En diversos estudios *in vivo* se ha demostrado que el Cd puede favorecer la acumulación de lípidos mediado por AKT/mTOR. Niture et al, (2023) encontraron que, en líneas celulares de linajes hepáticos tratados con Cd, mostraban un incremento en la expresión de enzimas involucradas en la lipogénesis y aunado a ello, el flujo de la autofagia se veía interrumpido. En nuestro grupo de investigación encontraron que el Cd favorece la acumulación de lípidos en hepatocitos primarios obtenidos de una dieta alta en colesterol, al incrementar la activación de mTOR, lo que inhibe el flujo de la autofagia y afecta la degradación de los lípidos (Rosales-Cruz et al., 2018).

1.7. La familia de las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

Las cinasas activadas por mitógeno (MAPKs por sus siglas en inglés) son una superfamilia de proteínas, principalmente compuesta de cinasas que median cadenas de fosforilación en serina/treonina. Receptores membranales activados por mitógenos,

citocinas y agentes estresores que activan a MAPKKKKs, promoviendo la fosforilación de las MAPKKKs, posteriormente se fosforila MAPKKs y entonces se fosforilan la MAPKs (Anerillas et al., 2020), que regulan la expresión de genes involucrados en la mitosis, metabolismo, motilidad, sobrevivencia, apoptosis y diferenciación (Cargnello et al., 2011), es decir convierten una variedad de señales extracelulares en una amplia variedad de respuestas celulares (Kassouf et al., 2020). Diferentes proteínas pertenecen a la familia de las MAPKs, entre ellas se encuentra la cinasa regulada extracelularmente (ERK1/2, por sus siglas en inglés), cinasas NH₂terminal c-Jun (JNK, por sus siglas en inglés) y p38 (Osaki et al., 2013).

La cascada canónica de ERK comienza con la unión del ligando como factor de crecimiento epidermal (EGF por sus siglas en inglés) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés) al RTKs; los RTKs reclutan a la proteína adaptadora Grb2, quien se une a la proteína intercambiadora de nucleótidos, SOS en el citoplasma y posteriormente se relocaliza en la membrana plasmática, llevando a la activación de Ras quien recluta y activa a Raf, seguido de la activación de MEK1/2 para terminar por activar ERK1/2 en el citosol. En el hígado se ha encontrado que en ratones obesos inducidos genéticamente y con dieta, la expresión de ERK 1/2 incrementa y se sostiene, llevando a un desequilibrio en la homeostasis de la glucosa, disminuyendo el gasto energético e induciendo la resistencia a la insulina (Kassouf et al., 2020; Osaki et al., 2013).

La proteína p38 se considera una cinasa activada por estrés (SAPK, por sus siglas en inglés) debido a que frecuentemente diversos factores como estrés ambiental o

citocinas proinflamatorias favorecen su activación (Coulthard et al., 2009), las MKK3/6 son esenciales para la activación clásica de p38 mediante la fosforilación a nivel de treonina 180 y tirosina 182, aunque en condiciones extremas puede ser activada por MKK4. También se ha reportado que puede ser activada por TAK1 como mediador del TGF- β y otros ligandos inflamatorios incluidos como la IL-1 β , TNF- α y lipopolisacárido (LPS). TAK1 a su vez es activado por la unión directa de proteínas adaptadoras como TAB1 y TAB2. La activación mediada por MKK3/6 se considera la ruta clásica, mientras que la activación mediada por TAK1 es considerada la ruta no clásica o alterna (Burton et al., 2021; Moriguchi et al., 1996; Shim et al., 2005; Takaesu et al., 2003). Las actividades atribuidas a su activación mediada por fosforilación son frecuentemente específicas del tipo celular e incluye respuesta inflamatoria, diferenciación celular, arresto del ciclo celular, apoptosis, senescencia y regulación del “splicing” del RNA (Coulthard et al., 2009). Se ha propuesto que la traslocación nuclear de p38 podría ser relevante para la regulación del arresto del ciclo celular G₂/M y promover la reparación del ADN (Cuadrado et al., 2010). También se ha visto que la activación de p38 tiene un rol importante en la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-6, así como en la inducción de enzimas como cicloxigenasa-2 (COX-2). Por otro lado, se ha asociado a la activación de p38 con la apoptosis, esto al encontrar que inhibidores de caspasas bloquean la activación de p38 mediada por el ligando Fas, sugiriendo que p38 funciona como activador de caspasas río abajo (Zarubin et al., 2005).

JNK también es considerada una SAPK que se activa por medio de fosforilación en residuos treonina y tirosina, fuertemente activada en respuesta a varios tipos de estrés

celular como golpes de calor, radiación ionizante, estrés oxidante, agentes de daño al DNA, citocinas, irradiación con UV, inhibidores de síntesis de proteínas y DNA (Cargnello et al., 2011). JNK es fosforilada por MKK4 y MKK7, quienes a su vez pueden ser activadas por diversas MAPKKK, incluyendo MEKK1-4, MLK1-3 y TAK1; la activación de PI3K río abajo de la señalización de EGFR puede promover la activación de JNK y promover la activación de factores de transcripción como c-Jun, JunA, JunB, ATF2, Elk, p53 y c-Myc, así como incrementar el contenido proteína antiapoptótica Bcl-2 (Katz et al., 2007; Osaki et al., 2013).

1.8. Yodo

El yodo es un elemento traza, que es un componente esencial de las hormonas tiroideas, tiroxina (T4) y triiodotironina (T3), las cuales son críticas para el funcionamiento del organismo (Hatch-McChesney et al., 2022). Se obtiene principalmente de la dieta, particularmente de verduras cultivadas en suelos ricos en yodo. La glándula tiroidea tiene el papel central en el metabolismo de yodo (Nagataki et al., 1997).

El yodo es principalmente ingerido como yoduro o yodato, el cual es generalmente usado en la sal yodada, más del 90% del yodo ingerido es absorbido en el duodeno, el yodato es reducido a yoduro para ser absorbido; su captación es mediada por el transportador simporte sodio/yodo (NIS, por sus siglas en inglés), presente en la membrana apical de los enterocitos (Sorrenti et al., 2021). A parte de la absorción intestinal, la desyodación de la T4 y la T3 por desyodasas en tejidos periféricos

contribuyen al incremento de los niveles de yoduro presente en la sangre (Bianco et al., 2018). La concentración intracelular de las hormonas tiroideas es regulada por enzimas específicas denominadas desyodasas. Las desyodasas son capaces de remover un átomo de yodo del anillo externo o interno de la estructura interna (Bruinstroop et al., 2023). Existen tres enzimas desyodasas denominadas D1, D2 y D3, en el hígado principalmente se expresa la D1, en particular, esta enzima hepática contribuye a la producción de T3 periférica y es el principal sitio para esclarecer los niveles de rT3 (T3 reversa), la forma biológicamente inactiva de la T3. La T4 se convierte en T3, la forma activa que se une a los receptores nucleares y en rT3, una forma inactiva de la hormona tiroidea sin actividad metabólica del plasma (Peeters et al., 2017).

2. Antecedentes

En nuestro grupo de investigación se ha explorado el efecto del tratamiento agudo de Cd en hepatocitos con sobrecarga de colesterol (Rosales-Cruz et al., 2018). Evidenciando que a una concentración de 25 nM de CdCl₂ en hepatocitos provenientes de ratones alimentados con una dieta alta en colesterol (HC) y con colato de sodio (CS) al 0.5% (CS0.5), presentaron mayor viabilidad, con respecto a los hepatocitos provenientes de los ratones alimentados con la dieta equilibrada Chow más CS 0.5. En este estudio se encontró, que el Cd incrementó el contenido de lípidos y con ello su acumulación en los hepatocitos. De igual forma, encontraron que el contenido de colesterol se incrementa en los ratones de la dieta HC más CS 0.5 y esto se exagera con el tratamiento con Cd. Se ha asociado la autofagia como un regulador del metabolismo de lípidos al degradarlos y prevenir su acumulación en los hepatocitos, y se considera que la degradación de p62 junto con la transformación de LC3-I a LC3-II son marcadores del flujo de la autofagia. Se ha demostrado que en los hepatocitos hipercolesterolémicos tratados con Cd, disminuyen los niveles de LC3-II, mientras que los niveles de p62 se mantienen constantes, sugiriendo que el Cd afecta el flujo de la autofagia, llevando así a la acumulación de lípidos y también favorece la fosforilación de mTORC1, el cual inhibe la autofagia (Rosales-Cruz et al., 2018). Sin embargo, no se conoce con exactitud el mecanismo molecular por el cual el Cd por sí solo induce el incremento de lípidos en el hígado; por ello es importante evaluar la señalización por la cual el Cd estaría induciendo hígado graso para demostrar que la exposición a

metales tóxicos puede favorecer enfermedades que impactan en el sistema de salud y con ello proponer estrategias de manejo y prevención.

3. Justificación

En la actualidad, la exposición de la población en general al Cd se produce al consumir alimentos contaminados con este metal tóxico. La expansión de la industria de reciclado de baterías níquel-cadmio, es también una posible fuente de exposición. Los compuestos de Cd se encuentran a menudo en el ambiente adheridos en pequeñas partículas en el aire (ATSDR, 1999). Además, personas que viven cerca de sitios de desechos peligrosos o fábricas que liberan Cd al aire están potencialmente expuestas. El Cd entra al cuerpo por medio de los pulmones o el tracto gastrointestinal y es absorbido en el intestino delgado por medio de transportadores de metales esenciales como: el transportador divalente de metales (DMT1, por sus siglas en inglés) y posterior a la exposición el Cd sale del intestino y se une a la albumina sérica, siendo transportado al hígado por medio del sistema porta (Hernández-Cruz et al., 2022). De acuerdo con la Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades (ATSDR por sus siglas en inglés) (2012), la exposición ambiental al Cd ha sido asociada con riesgo a enfermedades crónicas (ATSDR, 2012), sin embargo, su relación con el desarrollo de NALFD ha sido poco estudiado, se ha reportado en un modelo *in vivo* que el Cd induce daño hepático y que esto se correlaciona con un incremento de triglicéridos y colesterol (Souza-Arroyo et al., 2022). Por otra parte, se ha encontrado que existe relación entre el incremento de los niveles de Cd en sangre y el desarrollo de NALFD, en ausencia de causas secundarias de acumulación lipídica como el

consumo de alcohol (Park et al., 2021). En adultos jóvenes de Estados Unidos también se encontró que existe una relación entre la exposición a Cd y la alta prevalencia del MASLD, esta asociación es independiente del sexo, raza, índice de masa corporal o tabaquismo en los individuos que fueron considerados para el estudio (Li et al., 2022). De tal manera que los estudios epidemiológicos y los antecedentes en nuestro grupo de investigación cobran importancia al evidenciar el desarrollo de esteatosis mediada por la exposición al Cd (Rosales-Cruz et al, 2018). Sin embargo, se desconoce el efecto del Cd en el metabolismo lipídico en hepatocitos sin antecedentes de daño, por ello se requieren investigaciones dirigidas al efecto tóxico de este metal en el metabolismo de lípidos.

4. Pregunta de investigación

¿La ruta de señalización AKT/mTOR y el factor SREBP-1c estarán activos en el desarrollo del hígado graso en ratones expuestos a Cd?

5. Hipótesis

La exposición a Cd causará un incremento en el contenido de lípidos en el tejido hepático mediado por enzimas lipogénicas a través de la activación de la ruta de señalización AKT/mTOR y el factor de transcripción SREBP-1c.

6. Objetivos

Objetivo general

Determinar la activación de la ruta de señalización AKT/mTOR y del factor de transcripción SREBP-1c en el proceso de la acumulación de lípidos en ratones expuestos a cadmio.

Objetivos específicos:

1. Determinar el efecto del cadmio en el contenido de gotas lipídicas a nivel hepático.
2. Estudiar el efecto del cadmio en contenido de triglicéridos, colesterol y enzimas lipogénicas.
3. Evaluar la activación de la ruta de señalización de AKT/mTOR y del factor de transcripción SREBP-1c en ratones expuestos a cadmio.

7. Material y métodos

7.1. Animales

Se emplearon ratones macho de la cepa CD-1 de 8 a 12 semanas de edad (UPEAL, UAM Xochimilco. CDMX, México). Los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos con control de temperatura y humedad en un ciclo de 12 horas (h) de luz/oscuridad. Se alimentaron a los ratones con una dieta estándar (Chow) y con acceso a agua *ad libitum*. El manejo de los animales se realizó de acuerdo la NOM-062-1999.

7.2. Tratamiento a los ratones

Los ratones CD-1 de 8 semanas de edad, fueron separados en dos grupos: no tratado (NT) a los cuales se les dio agua sin Cd y los expuestos a 10 mg/L de Cd (202908, Sigma-Aldrich) en el agua por uno y tres meses teniendo acceso a comida *ad libitum*. El agua se cambió cada tercer día, donde se midió el volumen de agua consumido, se pesó la cantidad de comida para obtener el consumo alimenticio solo durante el primer mes y se registró el peso de cada ratón tanto de un mes como tres meses. Para la semana 5 y 14 los animales se anestesiaron con 0.6 ml de Avertina (100 µL de Avertina en 4.5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés)), y se sacrificaron para la obtención de suero e hígado.

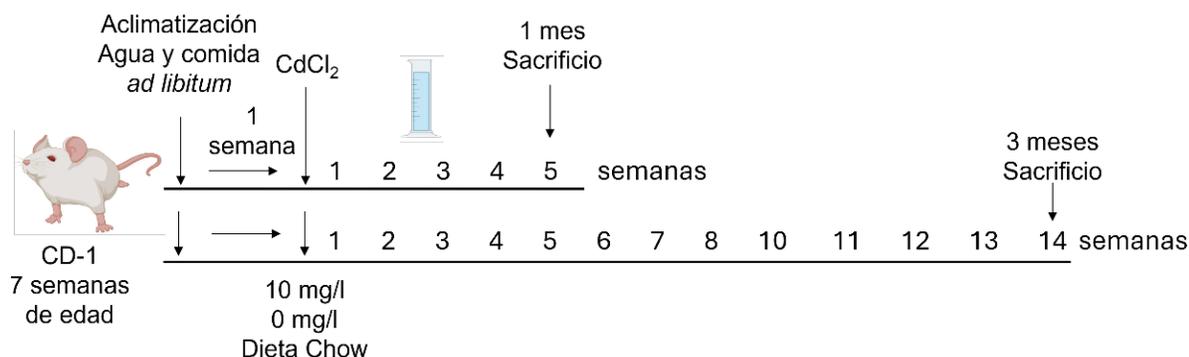


Fig. 5. Diseño experimental. Se emplearon 23 ratones de 8 semanas, divididos en dos grupos: lo que consumieron Cd durante uno y tres meses (Cd= 10 mg/l de CdCl₂) y sus respectivos no tratados (NT= 0 mg/l de CdCl₂). Durante la semana 5 y la semana 14 los ratones fueron sacrificados posterior a la anestesia con Avertina para la obtención del suero y del hígado.

7.3. Determinación de la funcionalidad hepática en suero

Se tomó aproximadamente 1 ml de sangre de cada ratón, el cual fue depositado en un tubo con 20 µl de Heparina (Pisa) y se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos, posteriormente se recuperó el suero. Se tomaron 100 µl de suero de cada muestra y se leyó en el Spotchem EZ SP-4430 con la tira reactiva Kenshin-2 (77188, arkray) para cada determinación bioquímica en suero.

7.4. Determinación del contenido de Cd en tejido hepático por ICP-MS

De los hígados obtenidos se tomó 0.03 g de tejido para la determinación del contenido de Cd. La determinación de los elementos en las muestras se llevó a cabo por Espectrometría de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) empleando el modelo NexION 300D marca Perkin Elmer, donde la muestra se nebuliza e ingresa

al plasma generado por el gas argón. Es así como los iones formados en el plasma son introducidos en el analizador de masas, donde se clasificaron de acuerdo a su relación masa/carga y son dirigidos al detector dual simultáneo, el cual genera una señal que es proporcional a la concentración del elemento. La cuantificación de los elementos se realizó utilizando una gráfica de calibración que incluye la evaluación de muestras duplicadas, así como muestras blanco y al menos 6 concentraciones diferentes. Estas muestras se basan en un estándar de calibración de la marca Perkin Elmer, que fue seleccionado a partir de estandarizaciones previas (Laboratorio de Investigación y servicio en toxicología, acreditado por la Entidad Mexicana de Acreditación INV-0007-013/19).

7.5. Análisis histológico

Una sección del hígado fue fijada con paraformaldehído (PFA) al 4% y posteriormente fue embebida en parafina para hacer los cortes histológicos (8 μm) y posteriormente realizar la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) de rutina. Posteriormente se realizó el análisis morfométrico como lo reporta Enriquez-Cortina *et al.*, 2013. 5 laminillas fueron seleccionadas aleatoriamente y se contaron 100 células en cada campo. Los datos se reportaron como un porcentaje, considerando los fenotipos celulares normal, regenerativa y muerte.

7.6. Determinación de la acumulación de colágena por Rojo Sirio

Una sección del hígado fue fijada con PFA al 4% y posteriormente fue embebida en parafina para hacer los cortes y posteriormente la tinción con Rojo Sirio de rutina y

hacer la evaluación del contenido de colágena como lo reporta Simoni-Nieves *et al.*, 2021. 3 laminillas fueron seleccionadas aleatoriamente y se evaluaron en el microscopio Carl Zeiss Microscopio Invertido Axiovert a10 con campo claro.

7.7. Determinación de proteinuria

Se recolectó la orina de 12 horas al colocar a cada ratón a una caja metabólica. Se usaron 5 μ l de orina a los que se le adicionaron 5 μ l de amortiguador de carga (LB, por sus siglas en inglés) 2x y se calentó a 95°C por 5 minutos; se cargó en un gel de poliacrilamida al 8% para dejar correr la electroforesis a 120 V por 1 h. Posterior a la electroforesis, se incubó el gel con Azul de Coomasie por 3 h en agitación con movimiento lento. Se retiró el Coomasie y se lavó 6 veces con amortiguador de destinción (125 ml de metanol, 25 ml de ácido acético glacial y 100 ml de agua) cada una de 10 min. Una vez terminados los lavados, se tomaron las fotos correspondientes.

7.8. Determinación de proteína total en orina

Se recolectó la orina de 12 horas al meter a cada ratón a una caja metabólica. Se tomó 2 μ l de cada muestra y se mezclaron en un volumen de 18 μ l de agua Mili Q, quedando en una dilución 1:10; posteriormente, se tomaron 5 μ l de cada muestra por duplicado en una dilución 1:5 con 20 μ l de agua y se incubaron por 30 min con 200 μ l del reactivo del ácido bicinonínico (BCA). Posteriormente las absorbancias se leyeron a 595 nm en un Multimode Detector (DTX880, Beckman Coulter) y se determinó la concentración de la proteína utilizando la curva estándar de albúmina sérica de bovina de 25 a 2000 μ g/ml.

7.9. Determinación del contenido de colesterol por O-phthaldehyde

Se tomó 0.04 g de tejido hepático, el cual se disgregó con 1 ml de PBS con un homogeneizador (23351, Kontes Glass), posteriormente se centrifugó la muestra para quitar el PBS y se adicionó 120 μ l de PBS. Se tomó 100 μ l de muestra en PBS y se adicionó 20 μ l de KOH al 33% y 200 μ l de etanol (EtOH) al 95%; incubando por 15 minutos (min) a 60°C en baño maría y posteriormente se adicionó 666 μ l de hexano y 200 μ l de agua MilliQ. Se tomó 333 μ l de hexano y se secó en el speedvac por 1 h. Se añadió 240 μ l de O-phthaldehyde (OPA) y 300 μ l de ácido sulfúrico. Se determinó su absorbancia a 550 nm y se obtuvo la concentración de colesterol de la muestra de acuerdo con la curva estándar.

7.10. Determinación del contenido de triglicéridos

Se tomó 0.01 g de tejido hepático y se les agregó 1 ml de Nonidet P 40 Substitute. Posteriormente se incubó la muestra a 90°C por 5 min y se enfrió a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó la muestra por 2 min y eliminó el material insoluble. En seguida se realizó una dilución de 10 veces la muestra con agua antes del ensayo. Se tomó de 2-50 μ l para cada duplicado y se llevó a un volumen de 50 μ l con el Triglyceride Assay Buffer, posteriormente se añadieron 2 μ l de lipasa a cada muestra y se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Se añadieron 50 μ l de la reacción maestra (Triglyceride Assay Buffer, Triglyceride Probe y Triglyceride Enzyme Mix) a cada muestra, se incubó por 30 min a temperatura ambiente protegiendo el plato

de la luz durante la incubación y se leyó la absorbancia a 570 nm. Los resultados obtenidos se normalizaron con respecto a la curva estándar.

7.11. Tinción de gotas lipídicas, aceite rojo oleoso (ORO)

Se delimitó cada corte de las muestras frescas con el PadPen (Advanced PAP Pen, Daido Sangyo) y se fijó con PFA al 4% por una hora. Posteriormente se lavó cada laminilla con PBS por 5 min. Se añadió una gota de ORO a cada corte y se dejó por 20 min, posterior a ello, se lavó con isopropanol al 60% por 10 min y se añadió una gota de hematoxilina por 10 seg., se lavó con agua por 10 min y se colocó una gota de medio de montaje y se terminó sellando con barniz. Las laminillas se dejaron secando por aproximadamente una semana y se observaron al microscopio Carl Zeiss Microscopio Invertido Axiovert.a10 con campo claro.

7.12. Tinción de gotas lipídicas y colesterol por BODIPY

Se delimitó cada corte de las muestras frescas con el PadPen (Advanced. PAP Pen, Daido Sangyo) y se dejó descongelando por 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se realizó un lavado con PBS estéril por 1 min. Se añadió la solución working BODIPY para triglicéridos (D3823, ThermoFisher) y colesterol (D3822, ThermoFisher) y se dejó reposar por 30 min en oscuridad. Por último, se lavó 2 veces de 5 min cada una y se añadió el DAPI para poner el cubreobjetos y se terminó sellando con barniz. Las laminillas se guardaron en frío y a oscuras para posteriormente analizarlas en el microscopio confocal Carl Zeiss LSM780.

7.13. Lisis de proteínas y cuantificación de proteínas

A partir de 0.03 g de tejido hepático, se disgregó con 1 ml de PBS en un homogeneizador, posteriormente se centrifugó la muestra para quitar el PBS y se le adicionaron 500 µl de Buffer de lisis: 10 ml de T-PER, 100 µl de DTT 1 M, 100 µl de PMSF 100 mM, 100 µl de NaF 0.1 M, 100 µl de Na₃VO₄ 0.1 M y 1 pastilla complete. Posteriormente, las muestras se sonicaron a una amplitud de 20% por 5 s por tres ocasiones. Finalmente, se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min a 4°C, recuperando y alicuotando los sobrenadantes almacenándolos a -70°C.

La proteína total se cuantificó con el estuche comercial de BCA, a partir de 5 µl de cada muestra por duplicado en una dilución 1:5 con 20 µl de agua y posteriormente se incubaron por 30 min con 200 µl del reactivo del BCA. Posteriormente las absorbancias se leyeron a 595 nm en un Multimode Detector (DTX880, Beckman Coulter) y se determinó la concentración de la proteína utilizando la curva estándar de albúmina sérica de bovina de 25 a 2000 µg/ml.

7.14. Determinación de proteínas por Western Blot

A partir de 60 µg de proteína total se homogenizó con amortiguador de muestra Laemmli Sample Buffer y posteriormente se desnaturalizaron a 95°C por 5 min y se corrieron en geles de poliacrilamida de 8 a 12% en una cámara de electroforesis con buffer de corrida 1X a 290 mA por 90 min. Enseguida, la proteína se transfirió a una membrana PVDF usando amortiguador de transferencia a 290 mA por 2 h a 4°C. La membrana se bloqueó con leche semidescremada al 5% en TBS-Tween durante 60

min a temperatura ambiente, por último, se lavó la membrana con PBS por 7 min cuatro veces, una vez finalizados los lavados, se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios de las proteínas de interés que se muestran en la tabla 1. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de acuerdo con el origen del anticuerpo primario. La inmunodetección se detectó usando el reactivo Immobilon Wester Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corporation, USA). Los blots fueron visualizados en un fotodocumentador CheemiDoc Imaging System. Finalmente, el análisis densitométrico se realizó con el software Image J versión 1.54.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Catálogo	Marca
HSP-70	Cabra	Sc-1060	Santa Cruz
p-p38	Conejo	9211	Cell signaling
p38	Conejo	9212	Cell signaling
p-JNK	Conejo	4971	Cell signaling
JNK	Conejo	9252	Cell signaling
p-ERK	Conejo	4376	Cell signaling
ERK	Conejo	9102	Cell signaling
SOD-1	Ratón	sc-1757	Santa Cruz
GPx-1	Conejo	Ab108427	Abcam
Catalasa	Ratón	sc-27803	Santa Cruz
GPx- 1/2	Ratón	sc-133160	Santa Cruz
GPx-4	Ratón	sc-166370	Santa Cruz
p-SREBP	Conejo	9874	Cell signaling
SREBP-1c	Conejo	sc-366	Santa Cruz

p-mTOR	Conejo	5536S	Cell signaling
mTOR	Conejo	2983S	Cell signaling
p-AKT	Conejo	9271	Cell signaling
AKT	Conejo	9272	Cell signaling
Fasn	Conejo	3198	Cell signaling
HMCoAR	Conejo	Ab174830	Abcam
ACLY	Conejo	Ab40793	Abcam
p-STAT3	Conejo	9134	Cell signaling
STAT3	Ratón	124H6	Cell signaling
Metalotioneina II	Ratón	ADI SPA 550 F	Enzo

Tabla 1. Nombre de los anticuerpos primarios utilizados con su respectivo anticuerpo secundario, el número de catalogo y su marca.

7.15. Determinación del grado de lipoperoxidación en tejido

A partir de 0.01 g de tejido hepático, se disgregó con 1 ml de PBS del cual se tomaron 100 µl para la determinación del contenido de proteína. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos y se tomaron 500 µl del sobrenadante, homogenizándolo con 2 ml de la solución TTH (TCA al 15%, TBA al 0.37% y HCl 0.24 N). Posteriormente, se incubaron a 100°C por 30 min y se dejaron enfriar, seguido de una centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos, obteniendo el sobrenadante, del cual se tomó 200 µl por triplicado, colocándolos en una placa de 96 pozos. La absorbancia se leyó a 532 nm en un Multimode Detector (DTX880, Beckman Coulter). Se normalizó con respecto a la proteína total obtenida en 100 µl.

7.16. Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado en eventos independientes. Los resultados se analizaron con el programa GraphPad Prisma versión 8, para determinar diferencias significativas con un análisis de t-test y ANOVA de dos vías. El nivel de significancia consideró de al menos $p < 0.05$

8. Resultados

8.1. Efecto de la exposición sub-crónica y crónica de cadmio en el consumo alimenticio y a nivel morfológico

En ratones expuestos a 10 mg/L de CdCl₂ (Fig. 5) vía oral en el agua durante uno y tres meses se evaluó el efecto de este metal en la ingesta de agua y alimento, sin embargo, no encontramos alterados estos parámetros (Fig. 6B, 6C). Con respecto al peso, los ratones expuestos a Cd no presentaron cambios en comparación a los ratones control en ambos tiempos (Fig. 6A, 6E). Al hacer el análisis macroscópico, solo encontramos inflamación intestinal en los ratones de 1 mes (Fig. 6D), sin embargo, esta inflamación no se presentó en los ratones de 3 meses (Fig. 6F). Con respecto al hígado, no encontramos alteraciones en dicho órgano en ninguno de los dos tiempos evaluados, indicando que el Cd no induce cambios macroscópicos a nivel hepático.

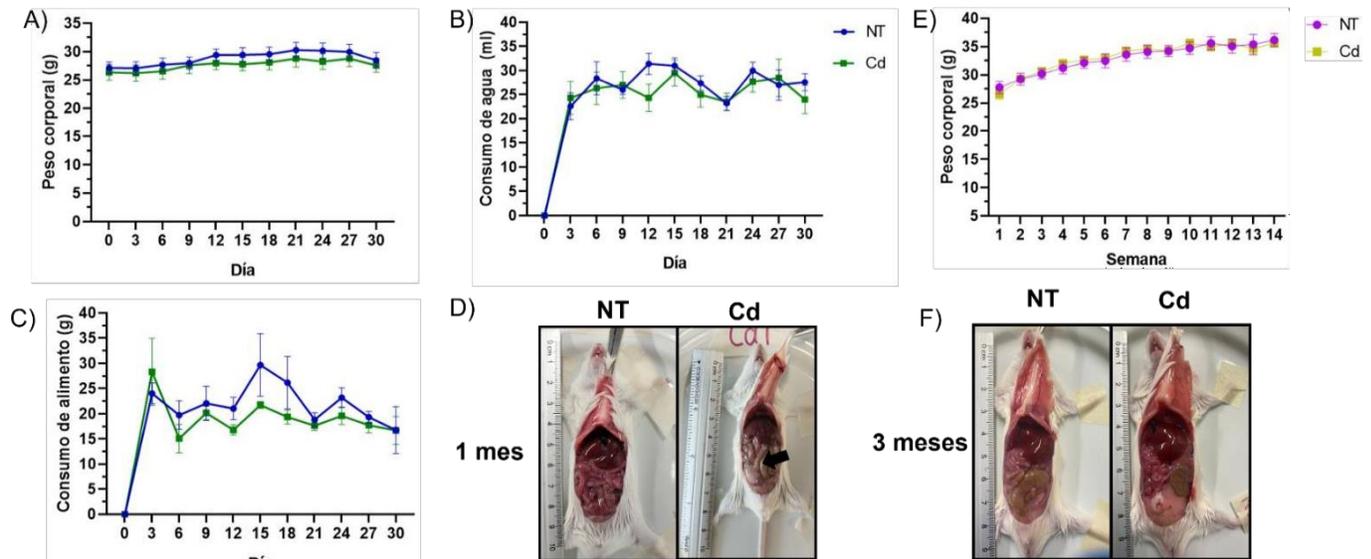


Fig. 6. Efecto de la exposición sub-crónica y crónica de Cd en ratones CD-1. A) Gráfico del cambio de peso de los ratones evaluado cada tercer día durante un mes. B) Gráfico del consumo de agua en ml determinado cada tercer día en el grupo de un mes. C) Evaluación del consumo de comida durante un mes, considerando cada tercer día. D) Imágenes representativas de ratones CD-1 de 8 semanas del grupo NT y del grupo expuestos a Cd durante un mes, observándose un patrón de inflamación intestinal en el grupo de Cd a diferencia del grupo NT. E) Gráfico del cambio de peso de los ratones evaluado una vez por semana durante tres meses. F) Imágenes representativas de ratones CD-1 de 8 semanas del grupo NT y del grupo expuestos a Cd durante tres meses. Cada punto representa la media de cada grupo por día.

Asimismo, se evaluó si el Cd podía inducir cambios en el hígado. A nivel hepático no encontramos diferencias morfológicas a nivel macroscópico en los hígados del grupo expuesto a Cd con respecto al grupo NT durante un mes o tres meses (Fig. 7A, 7D). En relación con el peso del hígado, no mostraron diferencias entre los grupos de un

mes y esto se repitió en los ratones de tres meses (Fig. 7B, 7E), ni en relación con el tamaño con respecto al peso del cuerpo del ratón entre los grupos Cd con respecto al NT de ambos tiempos (Fig. 7C, 7F).

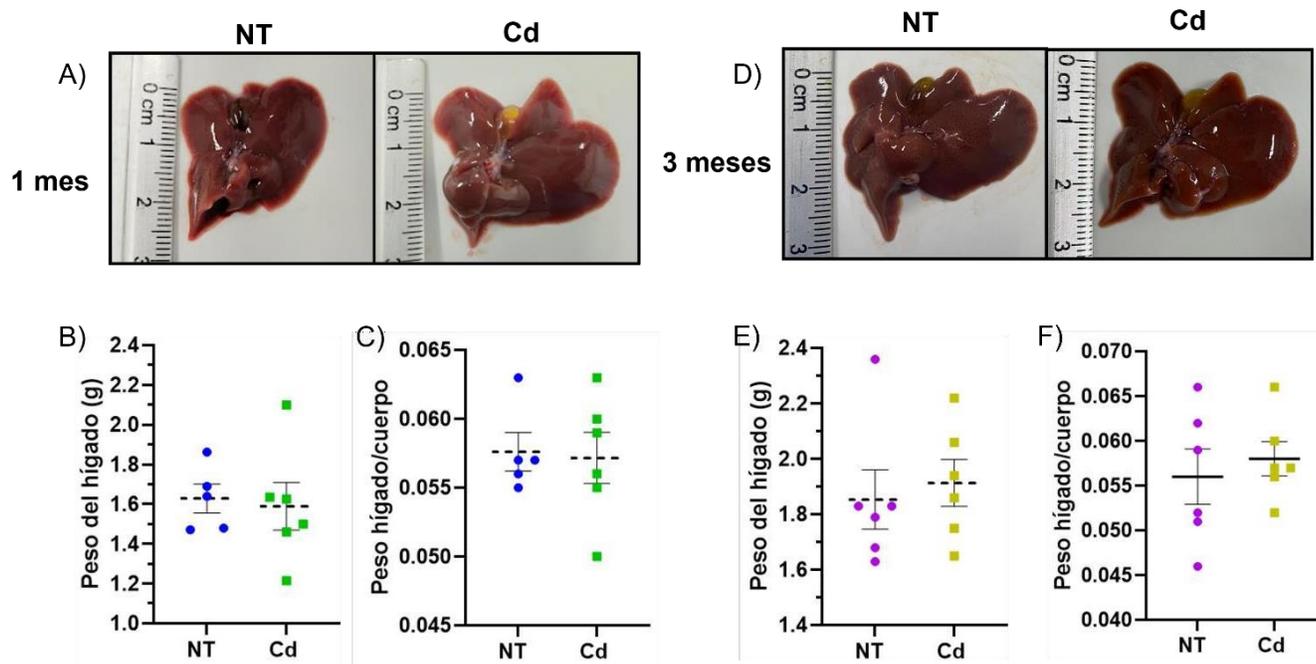


Fig. 7. Efecto de una exposición sub-crónica y crónica de Cd en el peso y tamaño hepático. A) Imágenes representativas de hígados de ratones expuestos a Cd (10 mg/L) durante 1 mes, B) Peso del hígado obtenido al pesar cada hígado individualmente de cada ratón. C) Cociente del peso del hígado obtenido de pesar cada hígado con respecto al peso del cuerpo al día del sacrificio de ratones tratados durante un mes. D) Imágenes representativas de hígados de ratones expuestos a Cd (10 mg/L) durante 3 meses. E) Peso del hígado obtenido de pesar cada hígado individualmente de cada ratón. F) Cociente del peso del hígado obtenido de pesar cada hígado con respecto al peso del cuerpo al día del sacrificio de ratones tratados durante tres meses. Cada punto representa a un ratón y un dato individual.

8.2. Acumulación de Cd en el hígado en la exposición crónica

Muestras de hígado obtenidas de ratones tratados con Cd (10 mg/L) durante 3 meses y su respectivos NT fueron procesadas por ICP-MS para determinar el contenido de Cd que se deposita en dicho órgano y el que circula en sangre. Así como evaluar el contenido de algunos elementos esenciales que se obtienen de la dieta. El contenido de Cd a nivel sistémico mostró una importante tendencia al incremento en los ratones del grupo Cd con respecto al NT (Tabla 3), con respecto a los demás elementos, estos no muestran cambios en su contenido en ambos grupos (Tabla 3). El contenido de Cd en el hígado muestra un incremento significativo en el grupo Cd por hasta cuatro mil veces más con respecto al NT (Tabla 3, Fig. 8A), evidenciando que el Cd se deposita y acumula a nivel hepático. El caso de los elementos esenciales, no mostraron cambios en su contenido en ambos grupos de estudio, salvo el Yodo (I), el cual se ve incrementado en el grupo Cd en comparación con el NT (Tabla 3).

Tomando en cuenta el promedio del consumo de agua de los ratones (Fig. 6B) y considerando el promedio donde el ratón estuvo en tratamiento por 91 días, se calculó que en promedio los ratones consumieron 9,100 µg de Cd. Posteriormente se calculó el peso de los ratones para sacar la relación de cuanto Cd había en el hígado total, en promedio el hígado de los ratones del grupo Cd pesó 1.91 g (Fig. 7E); tomando en cuenta los datos de ICP-MS, donde se determinó que en hígado se cuantificó 4.5 µg por 1 g (Tabla 3, Fig. 8A), se realizó el cálculo de cuanto Cd había en total, se obtuvo que en promedio los ratones retuvieron 8.6 µg de Cd (Fig. 9).

Con estos datos, se calculó el porcentaje del contenido de Cd en hígado y se obtuvo que 0.095% de Cd se cuantificó a nivel hepático.

Tabla 1. Concentración promedio en sangre (ng/ml)				
Muestra Elemento	NT	NT	Cd	Cd
Manganeso	11.36	21.31	16.07	9.67
Hierro	817,104	989,086	1,001,296	931,732
Cobalto	0.54	0.81	0.73	0.70
Cobre	1,738	1,756	1,566	1,455
Zinc	10,429	10,787	9,672	9,959
Selenio	1,587	2,368	2,482	2,384
Cadmio	0	0	6.45	3.51
Yodo	5.78	9.39	13.44	11.60

Tabla 2. El consumo de cadmio y su impacto en la homeostasis de otros elementos en sangre. Valores obtenidos de la cuantificación en sangre de los respectivos elementos en los ratones tratados (Cd, 10 mg/L) y los no tratados (NT) por tres meses. Los resultados fueron obtenidos por medio de la cuantificación por ICP-MS (Laboratorio de Investigación y servicio en toxicología, acreditado por la Entidad Mexicana de Acreditación INV-0007-013/19).

Tabla 3. Concentración promedio en hígado (ng/g)								
Muestra Elemento	NT	NT	NT	NT	Cd	Cd	Cd	Cd
Manganeso	3,130	3,342	2,789	2,880	2,615	3,167	2,969	3,392
Hierro	860,710	367,284	563,483	397,511	540,240	796,601	607,921	354,557
Cobalto	43.58	37.51	34.91	31.75	52.43	52.83	55.9	33.44
Cobre	4,263	3,845	3,820	3,750	3,979	4,053	3,914	3,924
Zinc	39,530	34,933	33,003	33,301	37,827	38,130	36,510	36,364
Selenio	5,242	4,364	5,608	5,058	6,335	5,081	4,739	4,544
Cadmio	0	0	0	0	3,802	3,103	6,007	5,208
Yodo	3.62	17.82	19.88	17.83	20.97	48.5	43.09	36.31

Tabla 3. El consumo de cadmio y su impacto en la homeostasis de otros elementos en el hígado. Valores obtenidos de la cuantificación en hígado de los respectivos elementos en los ratones tratados (Cd, 10 mg/L) y los no tratados con Cd (NT) por tres meses. Los resultados

fueron obtenidos por medio de la cuantificación por ICP-MS (Laboratorio de Investigación y servicio en toxicología, acreditado por la Entidad Mexicana de Acreditación INV-0007-013/19).

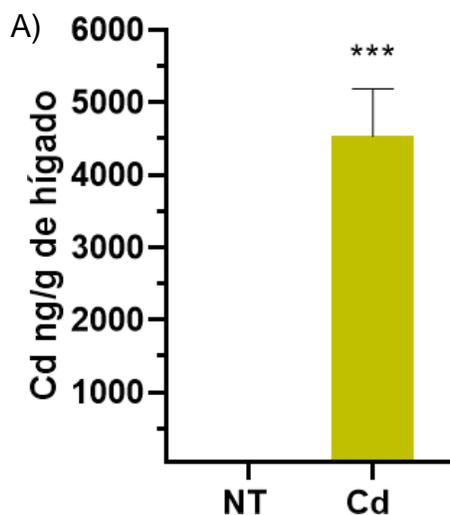


Fig. 8. El consumo crónico de Cd favorece su acumulación en el tejido hepático.

A) Gráfico representativo de la cuantificación de Cd en el tejido hepático obtenido de la Tabla 3. Los resultados fueron obtenidos por medio de la cuantificación por ICP-MS (Laboratorio de Investigación y servicio en toxicología, acreditado por la Entidad Mexicana de Acreditación INV-0007-013/19). T-test ($p < 0.0005^{***}$).

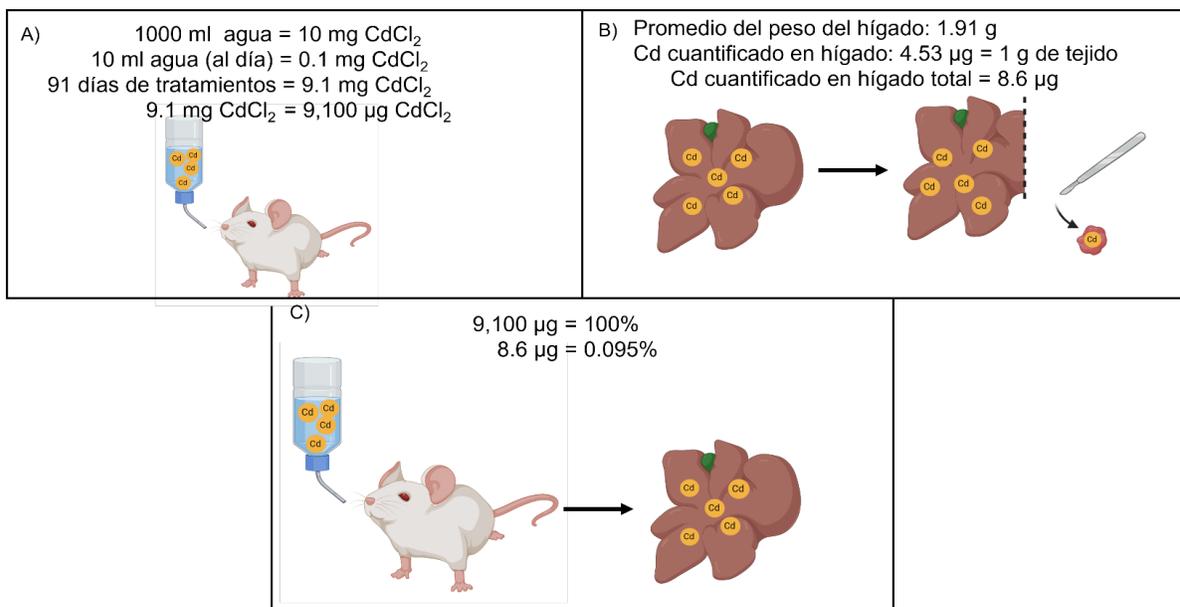


Fig. 9. Porcentaje de Cd que se cuantificó a nivel hepático posterior a la exposición crónica. A) Cálculo del consumo de Cd, donde se consideró que cada ratón tomó 10 ml de agua por día y se hizo el cálculo de cuanto Cd se consumió por los tres meses de tratamiento. B) Cálculo de la cuantificación del contenido de Cd en el hígado total, partiendo de los datos obtenidos por ICP-MS. C) Porcentaje del Cd cuantificado en hígado con respecto al Cd que los ratones consumieron por los tres meses.

8.3. Efecto de la exposición sub-crónica y crónica de Cd a nivel microscópico en tejido hepático

A nivel histológico empleando la tinción de H&E encontramos que a un mes de exposición la cantidad de hepatocitos normales disminuía, a su vez se presentó un incremento en la cantidad de hepatocitos en proliferación, con respecto al ratón NT (Fig. 10A). Sin embargo, no encontramos cambios en la cantidad de núcleos picnóticos, un indicador células muertas (Fig. 10B), es decir el Cd a este tiempo induce la proliferación celular a nivel hepático.

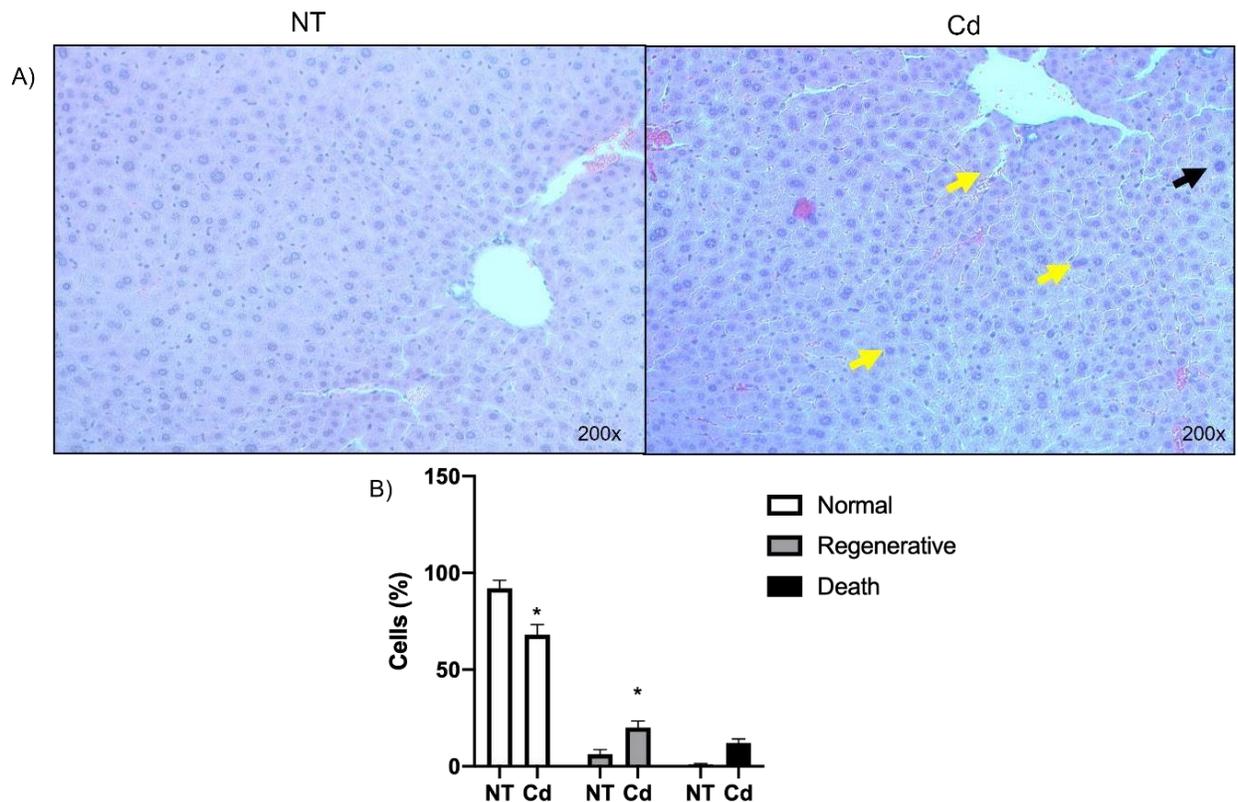


Fig. 10. La exposición a Cd durante un mes promueve la proliferación de los hepatocitos.

A) Imágenes representativas de la H&E obtenidas de ratones tratados por un mes con Cd; flechas amarillas: células regenerativas, flechas negras: células muertas o apoptosis. B)

Cuantificación de los diferentes fenotipos encontrados durante el análisis morfométrico. ANOVA de una vía ($p < 0.05^*$).

A 3 meses los hallazgos histológicos fueron similares a lo reportado al mes de administración, sin embargo, en este tiempo ya se presenta un incremento considerable de células que están en proceso de muerte (Fig. 11B).

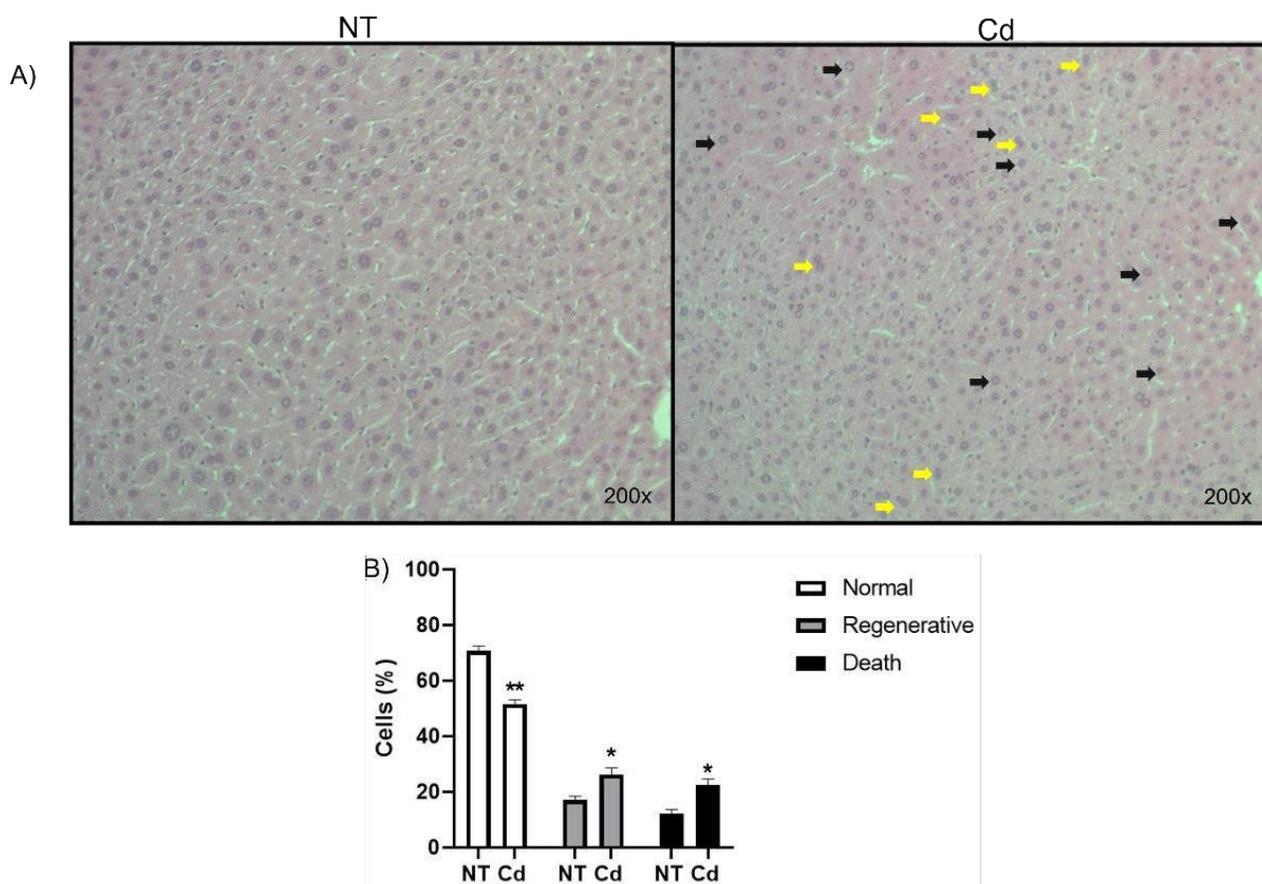


Fig. 11. La exposición a Cd durante tres meses promueve la muerte y proliferación de los hepatocitos. A) Imágenes representativas de la H&E obtenidas de ratones tratados por tres meses con Cd; flechas amarillas: células regenerativas, flechas negras: células muertas o apoptosis. B) Cuantificación de los diferentes fenotipos encontrados durante el análisis morfométrico. ANOVA de una vía ($p < 0.05^*$), ($p < 0.0001^{**}$).

8.4. El consumo sub-crónico y crónico de Cd y su efecto en la funcionalidad hepática

Para evaluar el efecto del Cd en la funcionalidad hepática, se determinó el contenido de enzimas relacionadas con el daño hepático en suero. Sin embargo, no se encontró diferencias del contenido de AST (Aspartato amino transaminasa) y ALT (Alanina amino transaminasa), lo que indica que el consumo sub-crónico de Cd no produce daño a nivel hepático (Fig. 12A, 12B) Asimismo, se evaluó el contenido de colesterol y de HDL-c (Lipoproteína de alta densidad, por sus siglas en inglés) en suero, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el contenido en suero (Fig. 12C, 12D). Por otra parte, el contenido de triglicéridos (TG) en suero fue menor en el grupo los ratones expuestos a Cd con respecto a los NT (Fig. 12E).

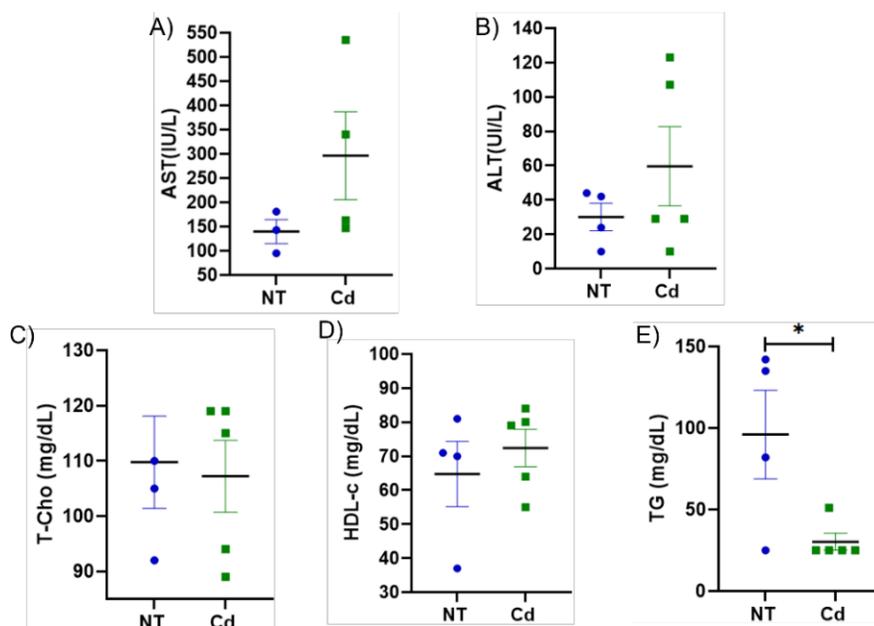


Fig. 12. Efecto del consumo sub-crónico de Cd en la funcionalidad hepática. A-B) Contenido de AST (Aspartato amino transaminasa) y ALT (Alanina amino transaminasa)

expresados como U/L. C-E) Contenido de colesterol, HDL-c y triglicéridos en suero de ratones expuestos a Cd (10 mg/L) durante un mes; en contraste a NT). *D.S. $p < 0.05$

Evaluamos si a un consumo crónico de Cd afecta la funcionalidad hepática, sin embargo, no encontramos incrementadas las enzimas de daño hepático en suero (Fig. 13A, 13B); tampoco se encontró alterado el contenido de colesterol total, de HDL-c en suero (Fig. 13C, 13D), sin embargo, a este tiempo de exposición a Cd, no encontramos alterado el contenido de TG en suero (Fig. 13E), lo que sugiere es que la exposición crónica de Cd no altera la funcionalidad hepática.

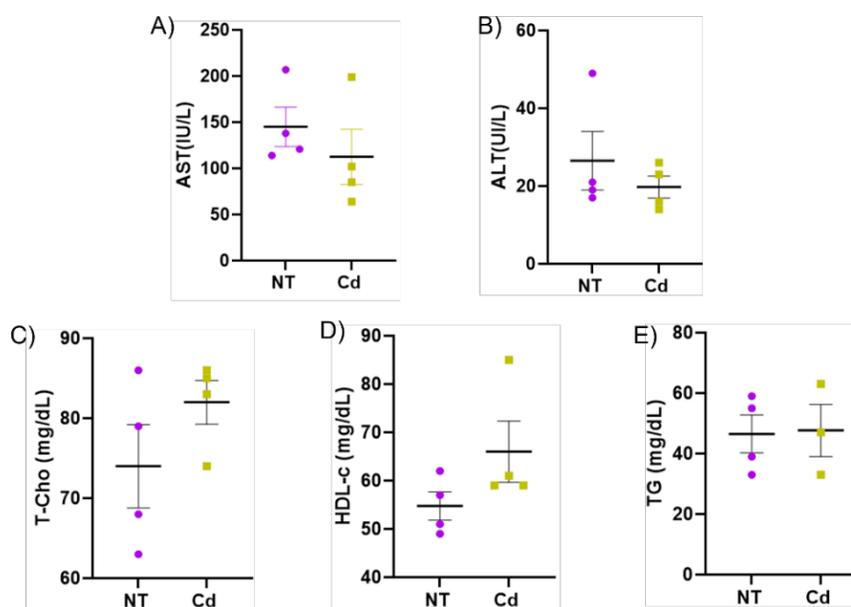


Fig. 13. Efecto del consumo crónico de Cd en la funcionalidad hepática. A-B) Contenido de AST (Aspartato amino transaminasa) y ALT (Alanina amino transaminasa) expresados como U/L. C-E) Contenido de colesterol, HDL-c y triglicéridos en suero de ratones expuestos a Cd (10 mg/L) durante tres meses; en contraste a NT).

8.5. El consumo sub-crónico y crónico y el efecto en la funcionalidad renal

Para evaluar si el consumo sub-crónico y crónico de Cd afecta la funcionalidad renal, se determinó la presencia de albumina en orina en muestras de un mes (Fig. 14A) y tres meses (Fig. 14B). Encontrando nula presencia de albúmina, sugiriendo que a un consumo sub-crónico y crónico a esos tiempos no afecta el proceso de filtración y reabsorción. Esto se corroboró por la cuantificación con BCA, al cuantificar el contenido de proteína total en orina a tres meses, encontrando que la funcionalidad renal no se ve afectada por el tratamiento con Cd (Fig. 14C).

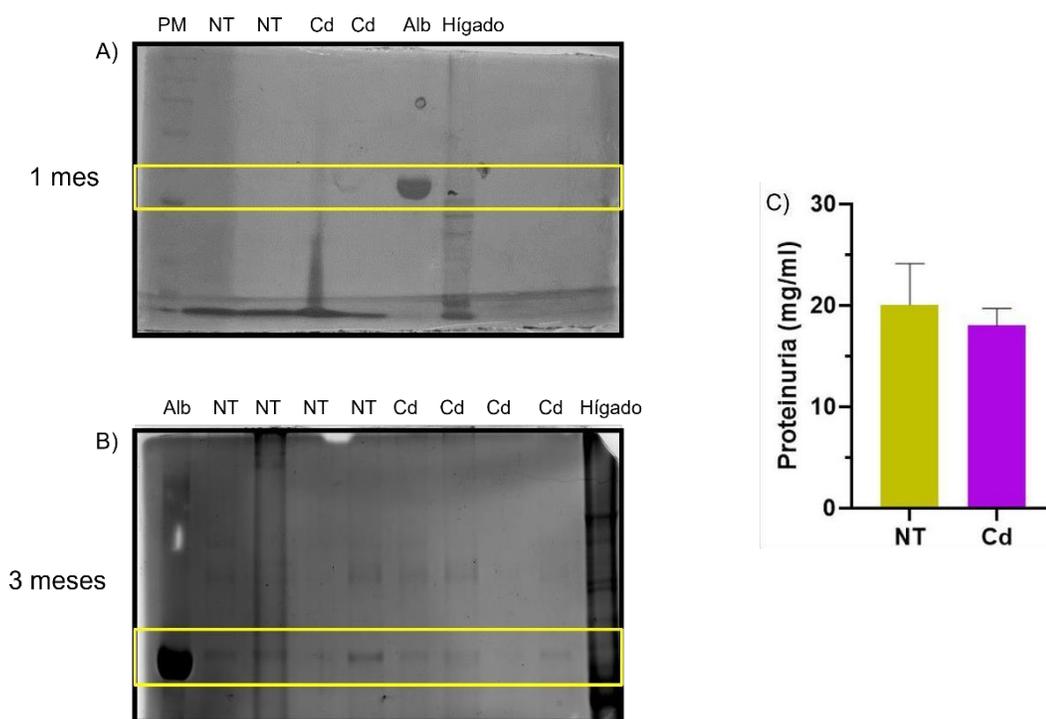


Fig. 14. La exposición sub-crónica y crónica a Cd y su efecto en la funcionalidad renal.

A) Imagen representativa del Azul de Coomassie de muestras de orina de 4 ratones. B) Imagen representativa del Azul de Coomassie de muestras de orina de 6 ratones. Alb: albumina, proteína de referencia, Hígado: Control negativo. C) Proteína total cuantificado por BCA en muestras de orina obtenidas de los ratones tratados por tres meses.

8.6. El consumo sub-crónico de Cd y su efecto en la acumulación de colágena a nivel hepático

A tres meses de exposición evaluamos la capacidad del Cd en incrementar el contenido de colágena depositada a nivel hepático, sin embargo, no observamos que el Cd favoreciera este efecto con respecto al grupo NT (Fig. 15A). A un mes no se llevó a cabo dicha evaluación dado que el incremento de la deposición de colágena es un marcador de daño crónico o de un daño exacerbado.

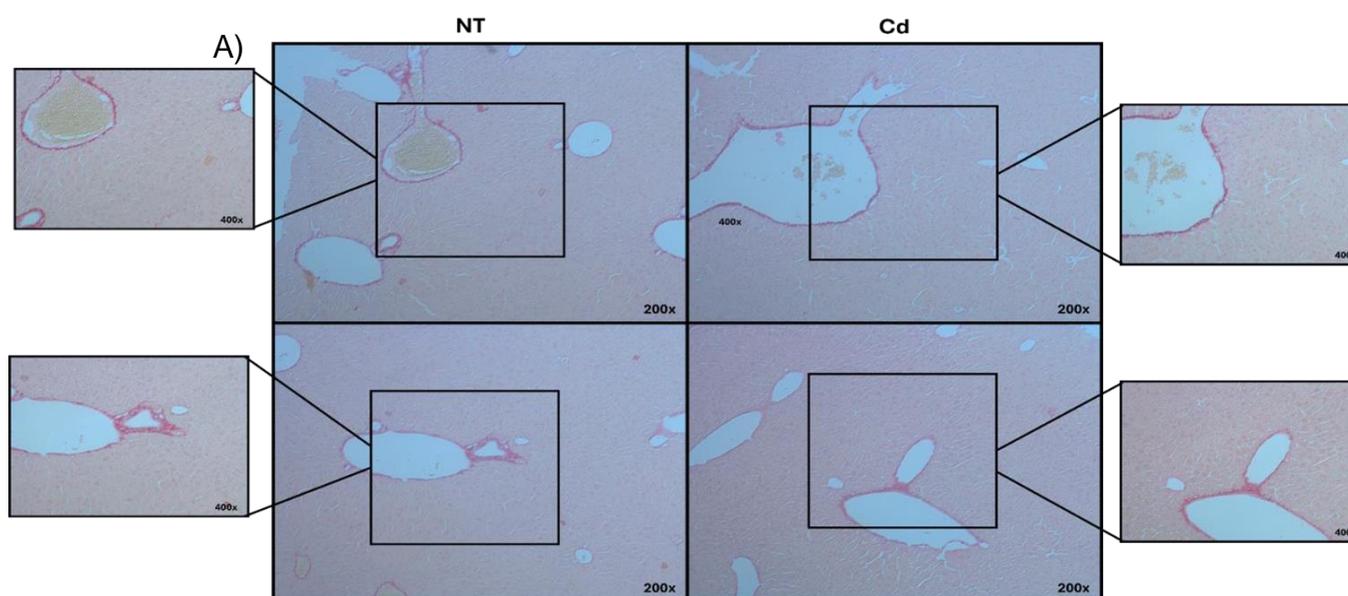


Fig. 15. Efecto de la exposición crónica de Cd en la acumulación de colágena en el hígado. A) Imágenes representativas de la acumulación de colágena en el tejido hepático, evaluado con Rojo Sirio.

8.7. Efecto del consumo de Cd en la expresión de la metalotioneina-II

Determinamos si el Cd favorece la expresión de la MT-II en el tejido hepático posterior a su consumo por uno y tres meses de exposición, como proteína de protección contra la toxicidad del Cd, sin embargo, no encontramos que el Cd promueva un incremento en su expresión al mes (Fig. 16A, 16B) ni a tres meses (Fig. 16C, 16D)

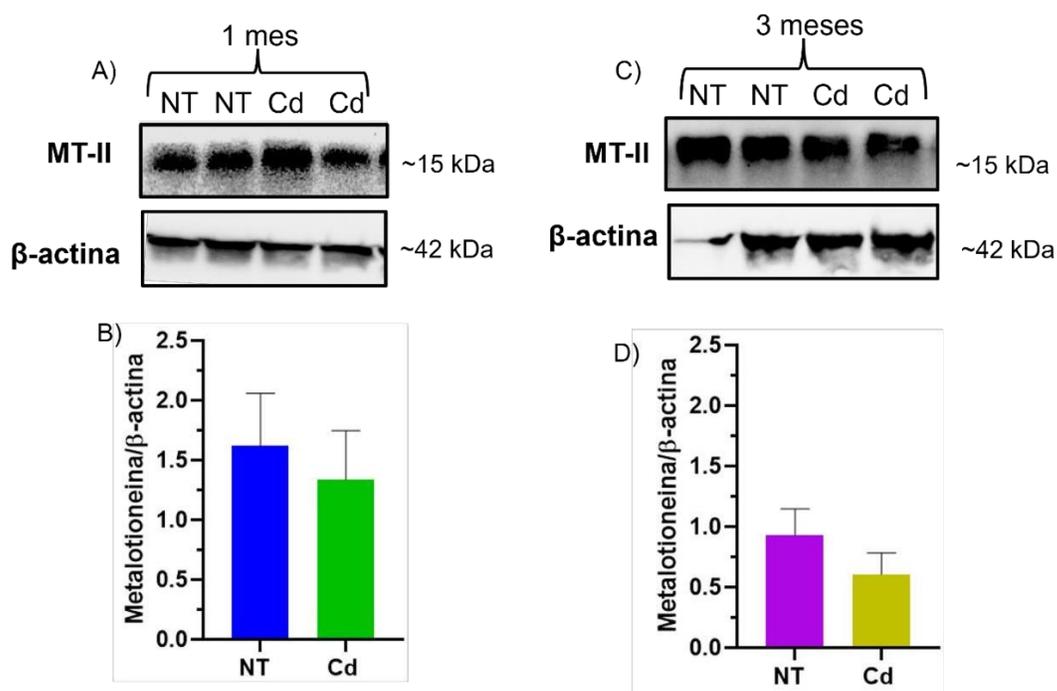


Fig. 16. El consumo sub-crónico y crónico de Cd en la expresión de la MT-II en el tejido hepático. A) Imagen representativa del Western Blot de la metalotioneina II (MT-II) de muestras obtenidas de ratones expuestos a Cd durante un mes. B) Gráfica del análisis densitométrico de la MT-II posterior a un mes de exposición, $n=6$. C) Imagen representativa del Western Blot de la MT-II de muestras obtenidas de ratones expuestos a Cd durante tres meses. D) Gráfica del análisis densitométrico de la MT-II posterior a tres meses de exposición, $n=6$.

8.8. Efecto del Cd en la lipoperoxidación y el contenido de enzimas antioxidantes

Evaluamos el efecto del Cd como promotor de la oxidación de lípidos, sin embargo, no se encontró diferencias en las pruebas de TBARS, lo que indica que el Cd a un mes no incrementa la lipoperoxidación en tejido hepático (Fig. 17A).

También se evaluó el contenido de enzimas antioxidantes, debido a que el Cd promueve el incremento de estrés oxidante, sin embargo, no se encontró diferencia en el contenido de enzimas antioxidantes (Fig. 17B, 17C, 17D, 17E). Lo que podría indicar que el consumo de Cd no promueve el desbalance del estado REDOX con 30 días de consumo.

De la familia de las glutatión peroxidasas se evaluó si el Cd favorece la expresión de la GPx-1/2 y GPx-4 con respecto a los dos tiempos de exposición, sin embargo, no encontramos que el Cd promoviera cambios en la expresión de la GPx-1/2 (Fig. 17F, 17G) o de GPx-4 (Fig. 17G) a un mes. Con respecto a tres meses, tampoco encontramos cambios en la expresión de estas proteínas (Fig. 17F, 17H).

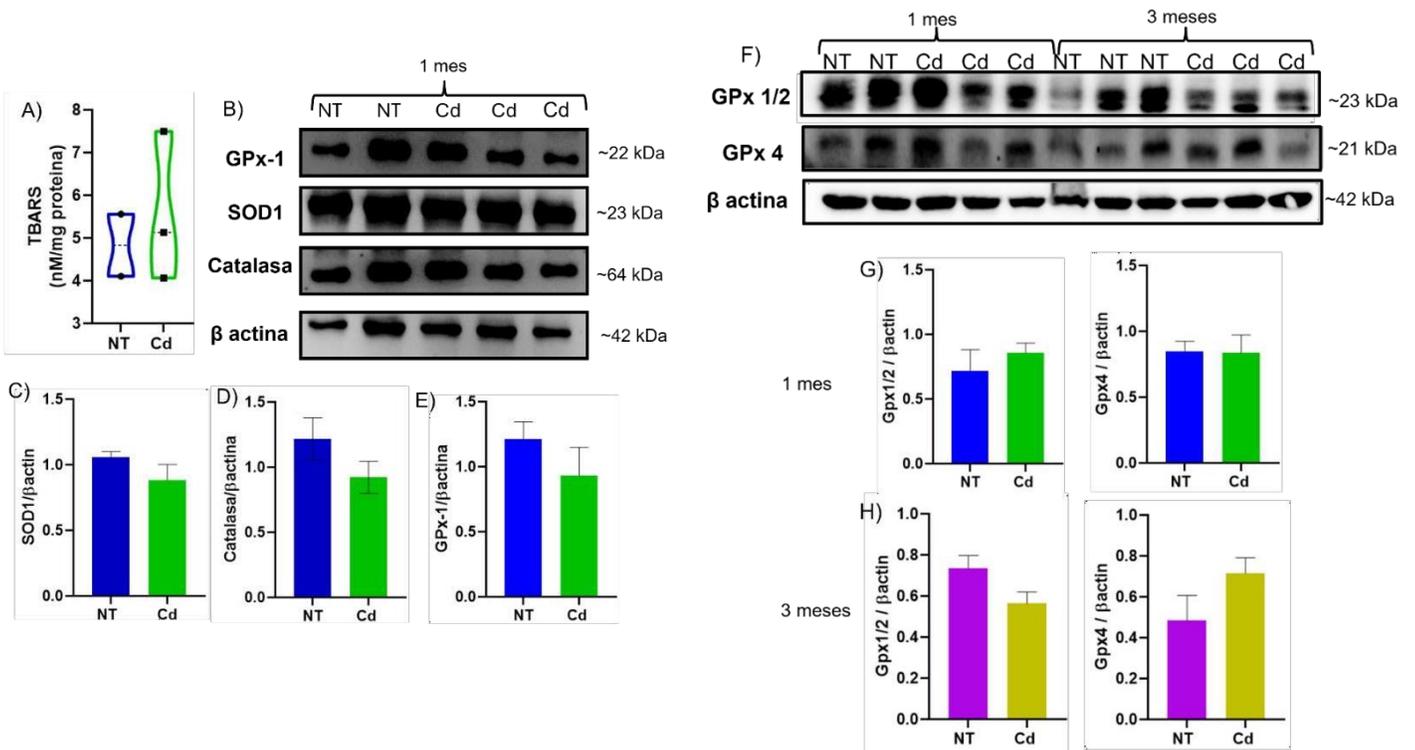


Fig. 17. Exposición a Cd por 1 y 3 meses en relación con la lipoperoxidación y enzimas antioxidantes. A) Los niveles de lípidos oxidados no mostraron cambios significativos entre el grupo Cd en contraste con el grupo NT, determinado como los niveles de TBARS. Cada punto representa un dato individual a un mes de exposición con Cd. B) Imagen representativa del Western Blot de las enzimas antioxidantes posterior a la exposición sub-crónica. C, D, E) Gráficas del análisis densitométrico de la expresión C) SOD1, D) Catalasa E) GPx-1, considerando la β actina como control de carga para la normalización de datos en una exposición sub-crónica. F) Imagen representativa del Western Blot de la GPx-1/2 y GPx-4. G) Gráfica del análisis densitométrico de la GPX-1/2 y la GPx-4 a un mes de exposición a Cd. H) Gráfica del análisis densitométrico de la GPx-1/2 y la GPx-4 a tres meses de exposición con Cd. Las barras representan la media +/- error estándar (ES).

8.9. Efecto de la exposición sub-crónica y crónica de Cd sobre la acumulación de lípidos en tejido hepático

En relación a la acumulación lipídica a nivel hepático, a un mes de exposición no presentó un incremento en el contenido de lípidos hepático (Fig. 18A, 18B), a pesar de que a nivel sistémico está disminuida (Fig. 12E).

Posteriormente, al realizar el análisis cualitativo con la tinción del ORO en tejido hepático para evaluar si el Cd podría estar aumentando el contenido de gotas lipídicas con tres meses de exposición, sin embargo ambas muestras se aprecian similares en relación con el contenido de gotas lipídicas (Fig. 18C), quisimos corroborar los resultados obtenidos con la tinción del ORO y por ello realizamos otra tinción lipofílica, lo que nos corroborará que el Cd no está promoviendo la acumulación de lípidos en el tejido hepático (Fig. 19A, 19B, 19C). Se evaluó el contenido de TG y colesterol bioquímicamente, encontrando que el Cd a tres meses de exposición no promueve su acumulación a nivel hepático (Fig. 18E, 18F).

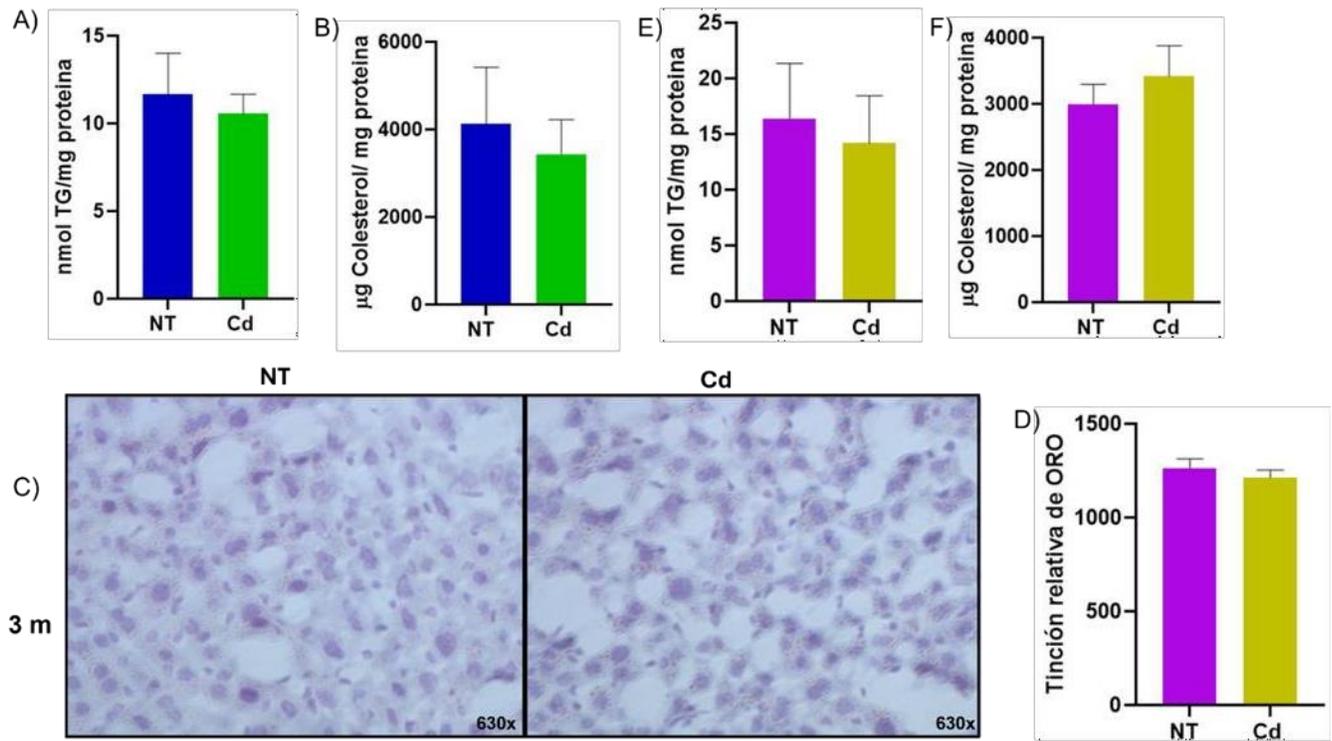


Fig. 18. El Cd no produce cambios en el contenido de triglicéridos y colesterol en el hígado después de una exposición sub-crónica y crónica. A) Contenido de TG evaluados en el tejido hepático, posterior a la exposición por un mes B) Contenido de colesterol evaluado en hígado de ratones expuestos a Cd (10 mg/L) durante un mes. C) Imágenes representativas de la tinción ORO en tejido hepático de ratones expuestos a Cd durante tres meses. D) Densitometría de las imágenes obtenidas del ORO, donde se grafica la tinción de ORO con respecto al área tomada para la semi-cuantificación. E) Contenido de TG evaluados en el tejido hepático expuesto a Cd por tres meses. F) Contenido de colesterol evaluado en hígado de ratones expuestos a Cd durante tres meses.

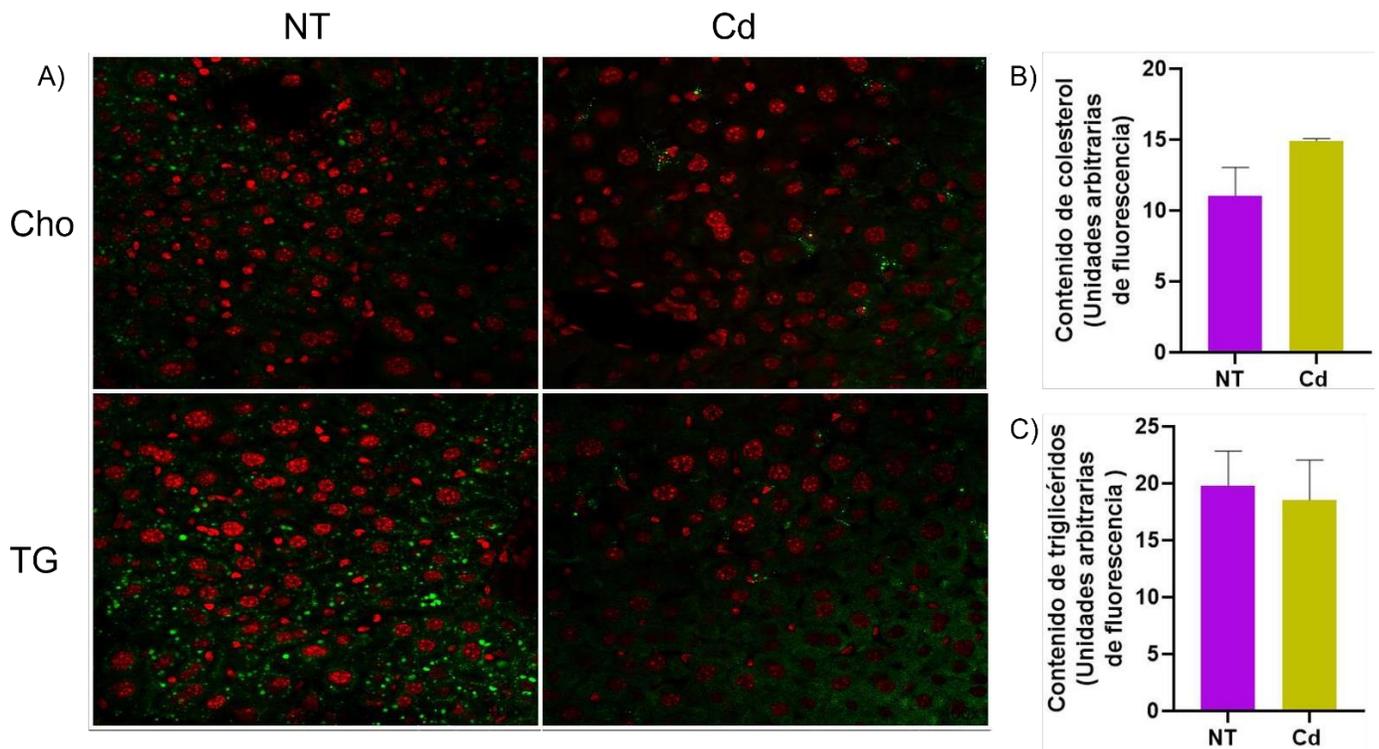


Fig. 19. Evaluación de la acumulación de lípidos por efecto del Cd. A) Imágenes representativas de la tinción fluorescente BODIPY en tejido fresco de hígado obtenido de ratones expuestos durante 3 meses con Cd (10 mg/l). B) Gráfico de la densitometría del contenido de colesterol obtenida de las fluorescencias donde se grafica la fluorescencia obtenida con respecto del área evaluada. C) Gráfico de la densitometría del contenido de triglicéridos obtenida con respecto del área evaluada.

8.10. Efecto del consumo sub-crónico y crónico de Cd en la ruta de señalización de AKT/mTOR y del factor de transcripción SREBP-1c

A nivel molecular evaluamos la vía canónica de la lipogénesis, AKT/mTOR por medio de sus fosforilaciones, sin embargo, a uno y tres meses de exposición no se presenta un cambio significativo que indique que el Cd favorezca la activación de p-AKT (Ser 473) (Fig. 20A, 20B, 20C) o mTOR (Fig. 20D, 20E, 20F). Aunado a esto evaluamos a una molécula blanco de la ruta, el factor de transcripción SREBP-1c, el cual no presentó diferencias en su forma funcional (Fig. 21A, 21B, 21D) o en su forma fosforilada (Fig. 21A, 21C, 21E). Por lo tanto, la exposición a Cd durante uno y tres meses no promueve la activación de la ruta lipogénica.

Decidimos corroborar que la ruta lipogénica no se estaba activando, evaluando el contenido de las enzimas limitantes e inducibles de la ruta de síntesis de colesterol como HMGC_oAR (Hidroxi-metil gluratil CoA Reductasa por sus siglas en inglés) y de la síntesis de lípidos como Fasn (Ácido graso sintasa, por sus siglas en inglés) a uno y tres meses de exposición a Cd, sin embargo, corroboramos que el Cd no favorece la acumulación de la HMGC_oAR (Fig. 21F, 21H, 21K), o de Fasn (Fig. 21F, 21I, 21L).

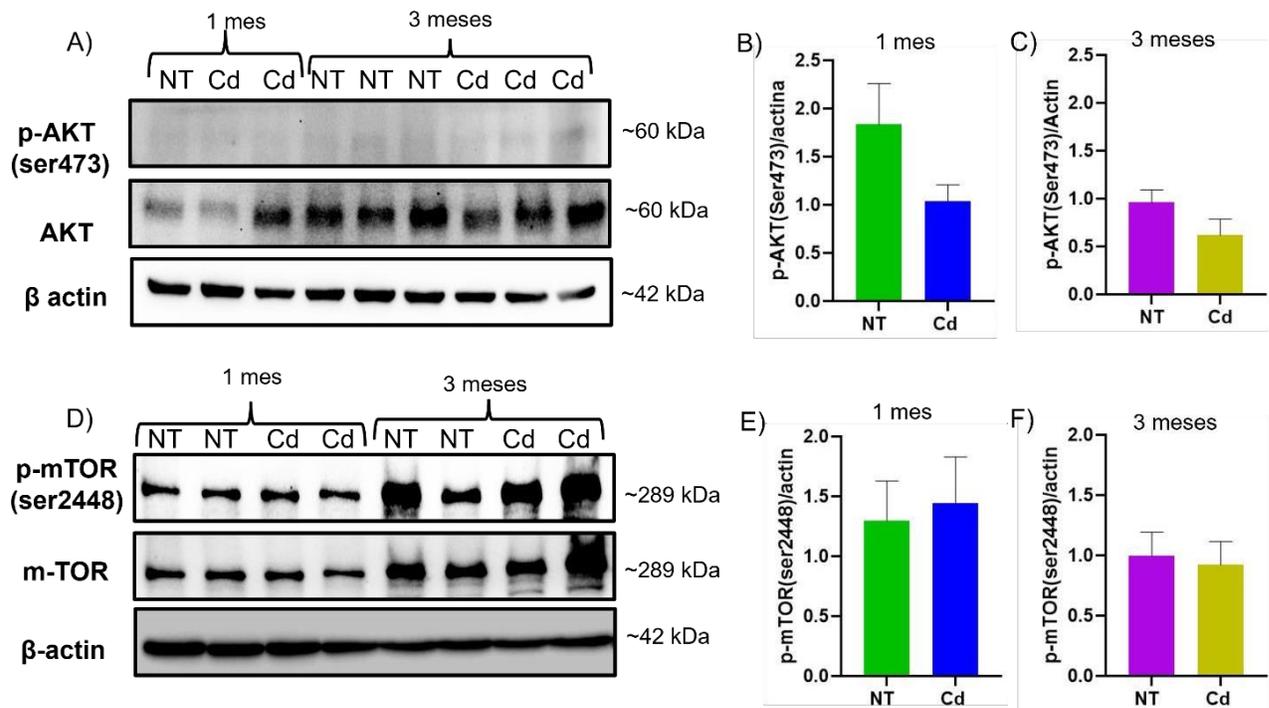


Fig. 20. El Cd y su efecto en la activación de la ruta de señalización AKT/mTOR o del factor de transcripción SREBP-1c. A) Western Blot representativo del contenido de p-AKT y AKT total en muestras obtenidas de la exposición sub-crónica (1 mes) y crónica (3 meses). B, C) Gráfica del análisis densitométrico de p-AKT sobre el contenido de AKT con respecto a la evaluación de la actina en muestras de la exposición B) sub-crónica y C) crónica. D) Western Blot representativo del contenido de p-mTOR y mTOR total en muestras obtenidas de la exposición sub-crónica y crónica. E, F) Gráfica del análisis densitométrico de p-mTOR sobre el contenido de mTOR con respecto al contenido de la actina en muestras obtenidas de la exposición E) sub-crónica y F) crónica. Las barras representan la media +/- error estándar (ES).

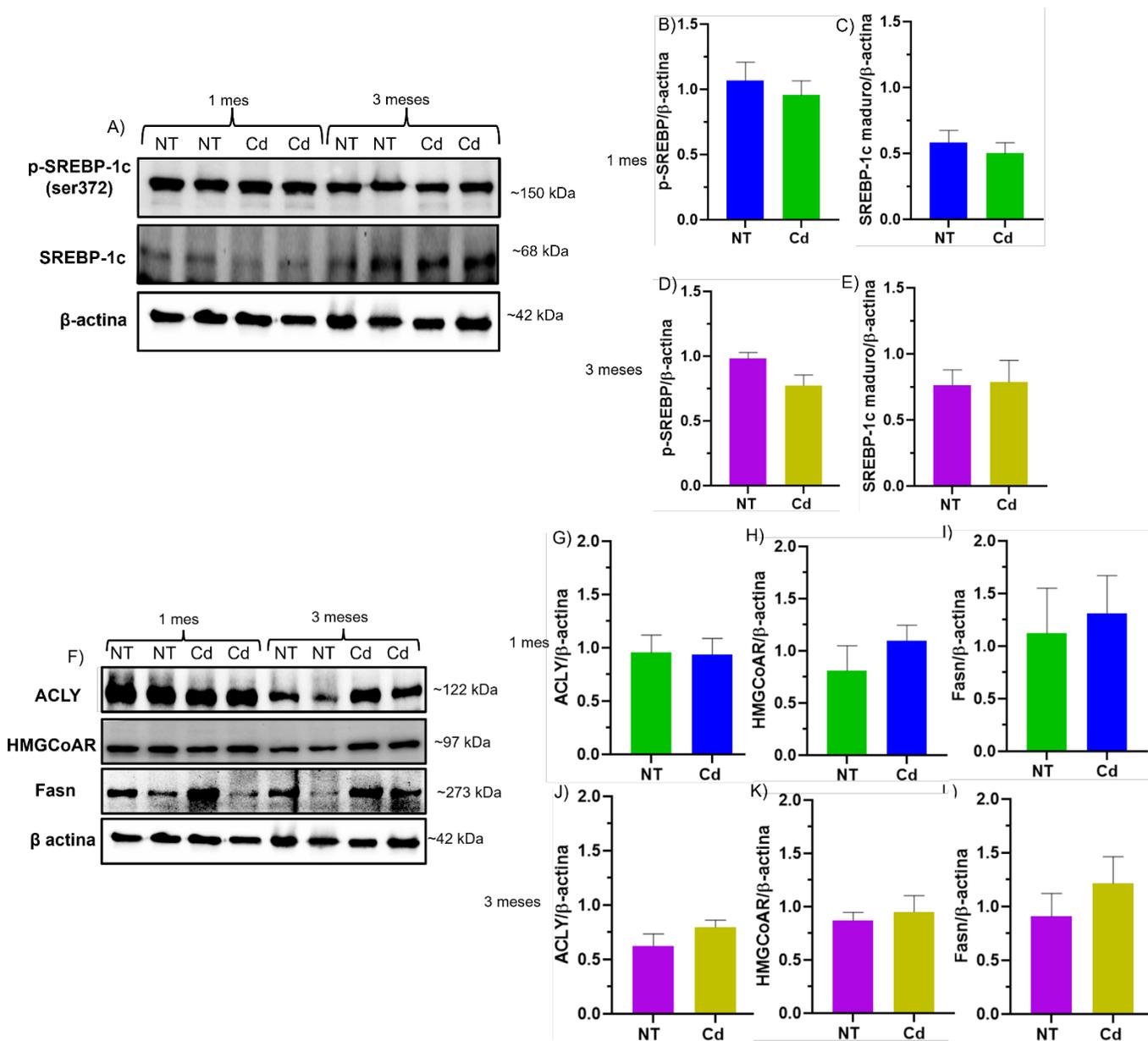


Fig. 21. El consumo de Cd sub-crónico y crónico en relación a la expresión de la maquinaria lipogénica. A) Western Blot representativo del contenido de p-SREBP-1c y SREBP-1c total en muestras obtenidas de la exposición sub-crónica y crónica. B, C) Gráfica del análisis densitométrico de p-SREBP-1c y SREBP-1c maduro con respecto a la actina en muestras de exposición sub-crónica. D, E) Gráfica del análisis densitométrico de p-SREBP-1c y SREBP-1c maduro en muestras de exposición crónica. F) Western Blot representativo del

contenido de las enzimas limitantes de la síntesis de colesterol y triglicéridos. G, H, I) Grafica del análisis densitométrico de sobre el contenido de ACLY, HMGCoAR y Fasn con respecto a la actina en muestras obtenidas de la exposición sub-crónica. J, K, L) Grafica del análisis densitométrico sobre el contenido de ACLY, HMGCoAR y Fasn en muestras obtenidas de la exposición crónica. Las barras representan la media +/- error estándar (ES).

8.11. Efecto de la exposición sub-crónica y crónica a Cd en la expresión de STAT-3 y HSP-70

Para evaluar una respuesta de protección a nivel hepático ante la exposición a Cd, determinamos la expresión de la proteína de choque térmico HSP-70, sin embargo, no encontramos los niveles de HSP-70 incrementados en los ratones tratados con Cd a uno (Fig. 22A, 22B) y tres meses (Fig. 22A, 22C). Lo que indica que esta proteína no está involucrada en el mecanismo de protección hepática a la exposición de Cd en estos tiempos de exposición. Aunado a ello, evaluamos la activación de STAT-3 como uno de los factores de transcripción que promueve la acumulación de HSP-70, sin embargo, no encontramos que el tratamiento con Cd favorezca su activación a uno (Fig. 22D, 22E) y tres (Fig. 22D, 22F) meses.

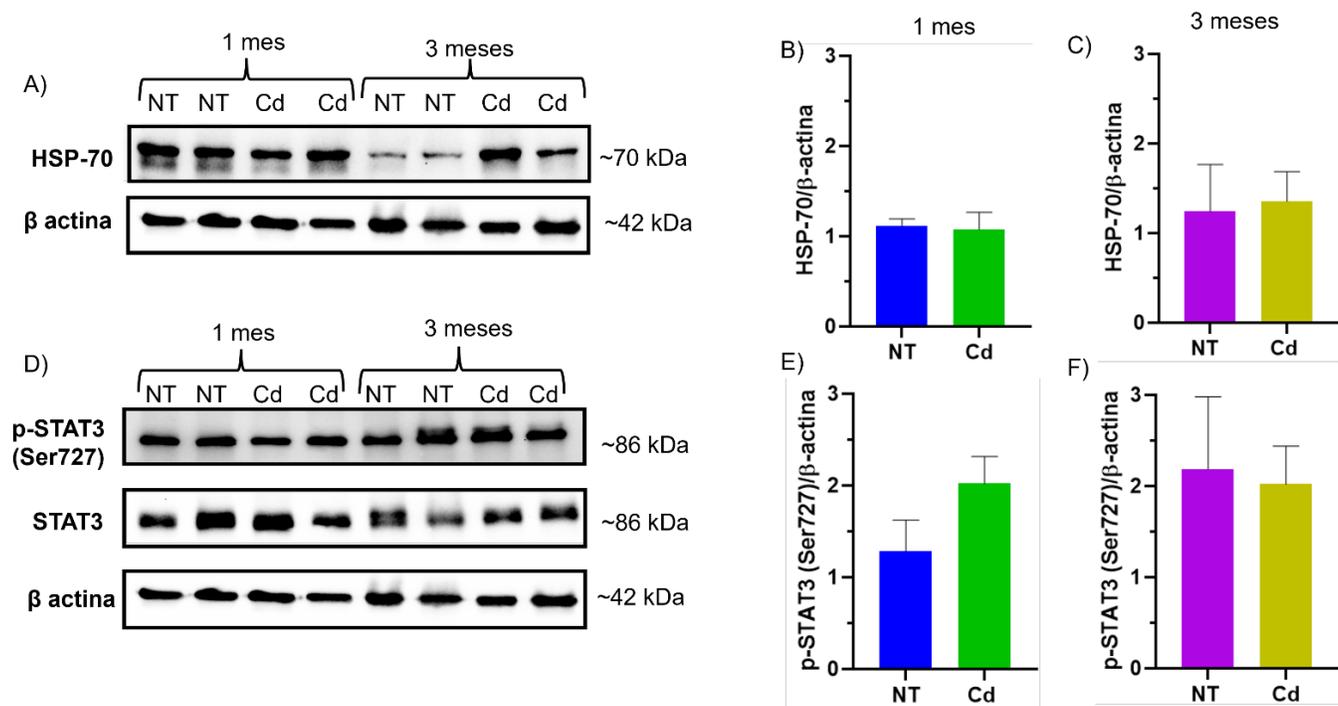


Fig. 22. Efecto del consumo de Cd durante uno y tres meses en la expresión de HSP-70.

A) Western Blot representativo del contenido de HSP-70 en el hígado de ratones tratados con Cd a uno y tres meses junto con su respectivo NT. B-C) Gráficas del análisis densitométrico de HSP-70 obtenidas de muestras de: B) Un mes. C) Tres meses. D) Western Blot representativo del contenido de p-STAT3 (Ser727), STAT-3 total y la actina, en ratones tratados por uno y tres meses con Cd con sus respectivos NT. E-F) Gráfica del análisis densitométrico de p-STAT3 (Ser727) con respecto a STAT-3 total y normalizado con respecto al contenido de la actina, de muestras obtenidas de: E) Un mes. F) Tres meses.

8.12. Efecto del consumo crónico de Cd en la activación de las MAPKs

Los datos obtenidos en el análisis morfométrico encontramos un incremento de las células en proliferación y las células muertas, por ello se evaluó proteínas de la familia MAPKs, esto por su papel dual en procesos de daño/reparación en el hígado. Encontramos que en los ratones de un mes no hay cambio en el contenido de p38, JNK y ERK activa (Fig. 23A, 23B, 23D, 23E, 23G, 23H). Sin embargo, en las muestras de tres meses, el contenido de p-p38, es decir su forma activa si se incrementó en los ratones tratados con Cd con respecto al control (Fig. 23A, 23C), contrario a ello, los niveles de JNK activa o p-JNK, se ven disminuidos con la exposición a Cd durante tres meses (Fig. 23D, 23F). Lo que podría estar indicando que los mecanismos de daño/reparación en el hígado posterior a la exposición por Cd durante tres meses, podría estar mediado por la activación de p38 y la represión de JNK.

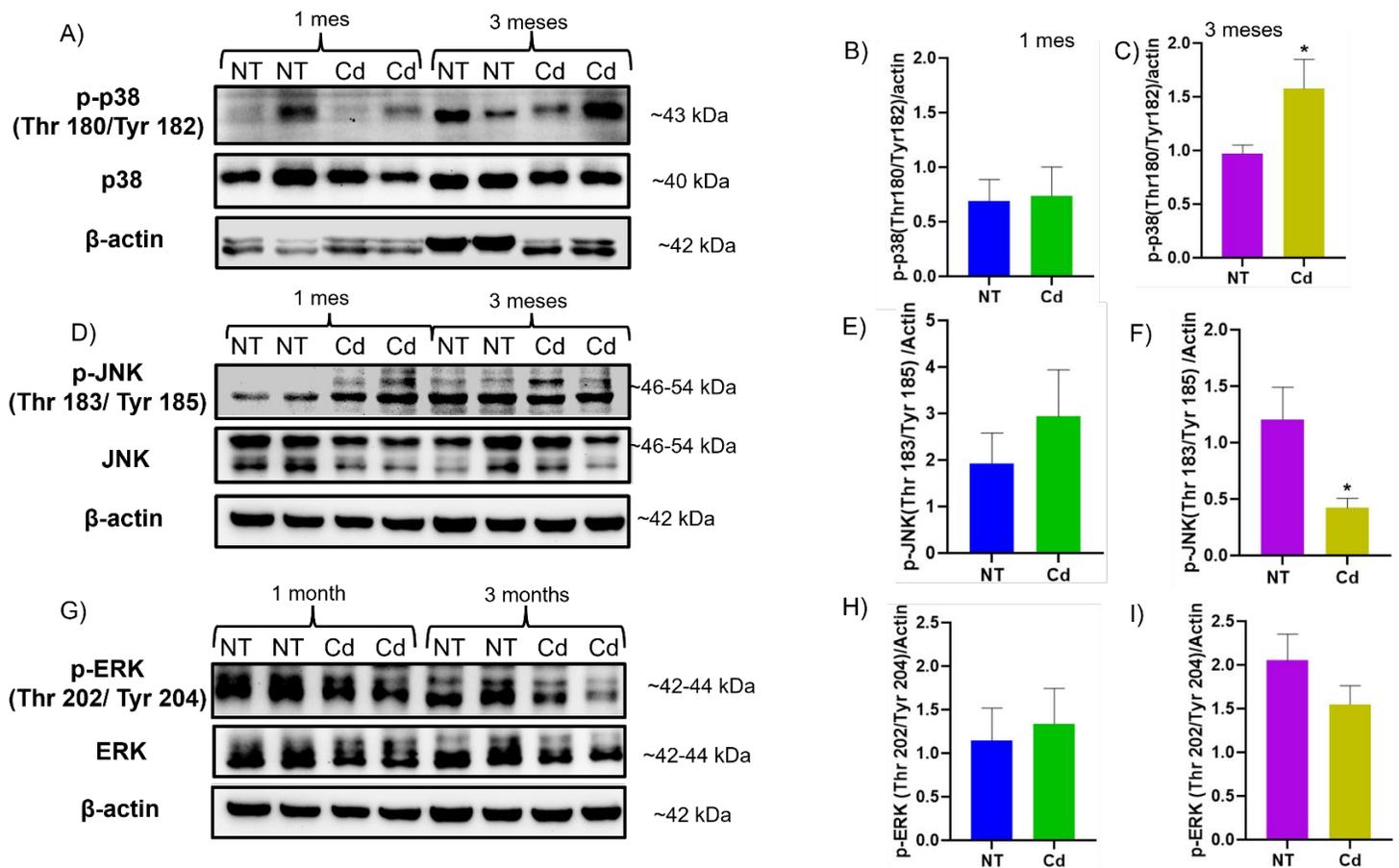


Fig. 23. Impacto del consumo crónico de Cd en la activación de p38. A) Western Blot representativo del contenido de p38 fosforilado a un y tres meses de exposición. B, C) Gráficas del análisis densitométrico de p38 fosforilado a: B) Un mes, C) Tres meses de exposición a Cd con su respectivo NT. D) Western Blot representativo del contenido de JNK fosforilado a un y tres meses de exposición. E, F) Gráficas del análisis densitométrico de JNK fosforilado a: E) Un mes, F) Tres meses de exposición a Cd con su respectivo NT. G) Western Blot representativo del contenido de ERK fosforilado. H, I) Gráficas del análisis densitométrico de ERK fosforilado a: H) Un mes, I) Tres meses de exposición a Cd con su respectivo NT. T-student ($p < 0.05^*$).

8.13. Efecto del consumo de Cd en relación al Yodo a nivel hepático

A partir de la determinación por ICP-MS, el grupo tratado con Cd mostró un incremento significativo en el contenido de Yodo (Fig. 24B). Para determinar la relación que existen entre el Yodo y Cd se realizó una correlación de Pearson, encontrando una correlación significativa fuerte positiva (Fig. 24C).

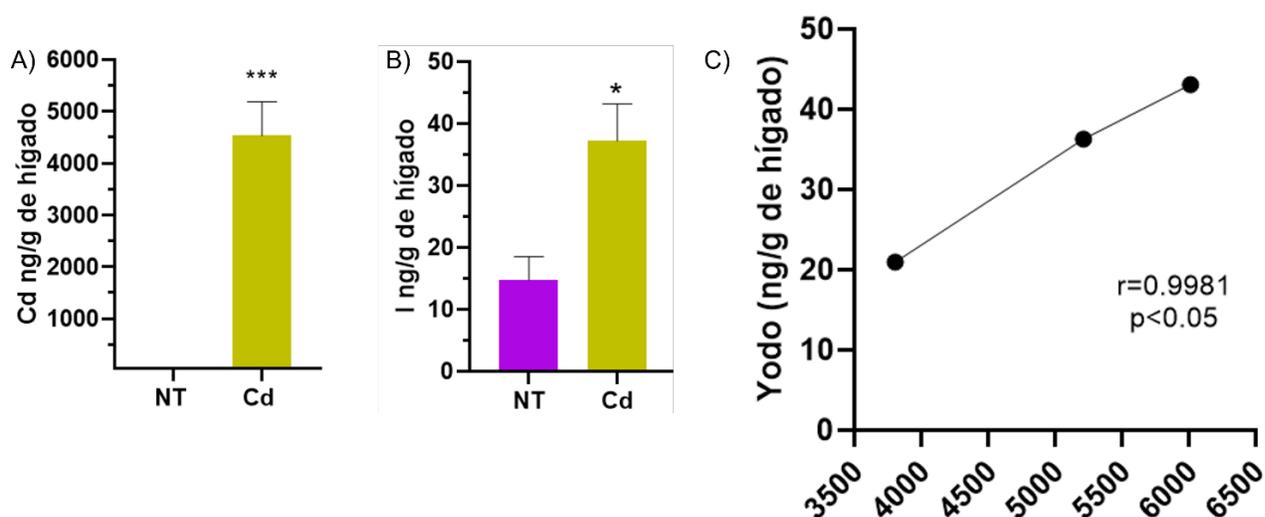


Fig. 24. El consumo crónico de Cd en relación a la acumulación de Yodo en el tejido hepático. A) Gráfico representativo de la cuantificación de Cd en el tejido hepático obtenido de la Fig. 4. Tabla 2. B) Gráfico representativo de la cuantificación de Yodo en el tejido hepático obtenido de la Fig. 4. Tabla 2. C) Correlación de Pearson entre la cuantificación de Yodo y la cuantificación de Cd. Los resultados fueron obtenidos por medio de la cuantificación por ICP-MS en el laboratorio de Toxicología en el CIVESTAV. T-test ($p<0.0005^{***}$) ($p<0.05^*$).

9. Discusión

El Cd es un contaminante común encontrado en la mayoría de los alimentos humanos, su bioconcentración ocurre desde los suelos hasta los productos alimenticios, lo que hace a la dieta la principal fuente de exposición a Cd entre las personas no expuestas ocupacionalmente o fumadoras (Chunhabundit, 2016); en animales, el Cd se concentra en los órganos internos como el hígado más que en el músculo y en la grasa (ATSDR, 2012). En nuestro estudio, corroboramos esto al evaluar el contenido de Cd en el hígado mediante ICP-MS después de una exposición crónica. Encontramos que los animales que consumieron agua contaminada con Cd (10 mg/L) mostraron altas concentraciones de acumulación de Cd en comparación con el grupo NT (Fig. 8A)

Los datos muestran que un consumo sub-crónico y crónico de Cd, no incrementa el peso de los ratones (Fig. 6A, 6E) o su ingesta de comida (Fig. 6C) y agua (Fig. 6B), tampoco se incrementó el peso del hígado obtenido a partir de un cociente peso hígado con respecto al peso del ratón (Fig. 7C, 7F) y eso se ve reflejado en el hígado del animal, donde no se encontró alteraciones en el órgano de los ratones tratados con Cd con respecto a los NT a un mes (Fig. 7A) y tres meses (Fig. 7D) de exposición aun cuando el Cd si se depositó a nivel hepático (Fig. 8A). Diversos autores han reportado el porcentaje de absorción de Cd vía el tracto gastrointestinal y se ha encontrado que solo el 6% del Cd ingerido es absorbido y que puede incrementar al 9% en personas que tienen deficiencia de hierro; sin embargo, también se ha establecido que el Cd es más fácilmente absorbido por medio del agua contaminada más que por los alimentos, es decir en agua se absorbe alrededor del 5% contra 2.5% que se absorbe por medio

de los alimentos, el resto del Cd que se ingiere es excretado vía heces (ATSDR, 2023; Godt et al., 2006). Con los datos obtenidos del consumo de agua y lo que se determinó con ICP-MS, calculamos cuanto se depositó a nivel hepático posterior a los tres meses de exposición (Fig. 9A), si consideramos que en promedio los animales consumieron 9,100 μg de Cd y que, de esto, solo el 5% fue absorbido a nivel intestinal para ser distribuido a nivel sistémico, solo un 0.095% del Cd consumido fue depositado a nivel hepático (Fig. 9C), sin embargo, aun cuando parece muy poca la cantidad de Cd depositado en el hígado, podemos notar que el tejido hepático se está viendo alterado de forma sutil.

El hígado es un órgano que, por su localización anatómica, está constantemente expuesto a químicos tóxicos, componentes de la dieta, etc., que potencialmente podrían inducir daño hepático, sin embargo, el hígado puede mantener su integridad debido a su capacidad regenerativa, en parte por la fuente celular de este prometedor reservorio hepático con alta plasticidad (Ruz-Maldonado et al., 2024); esto se corroboró con el análisis morfométrico hecho en la H&E (Fig. 10A, 11A), donde se encontró que a un mes el Cd promovió la proliferación de hepatocitos (Fig. 10B) y a tres meses de exposición, se incrementó la muerte celular, que se podría compensar con la proliferación de las células (Fig. 11B), es decir, el hígado está promoviendo la proliferación de sus células sanas para remplazar a las células dañadas que están entrando en un proceso de muerte.

Con los datos obtenidos en el análisis morfométrico, se evaluó los marcadores de daño hepático, esto con el fin de analizar si el daño que se encontró en tejido de hígado era

lo suficientemente grande como para reflejarse en las pruebas bioquímicas en suero, sin embargo, las enzimas AST y ALT no se incrementaron en suero posterior a la exposición a Cd por uno (Fig. 12A, 12B) y tres meses (Fig. 13A, 13B), lo que tentativamente indicó que el daño a nivel hepático no es tan grande. Estudios en ratones C57BL/6J expuestos a Cd 10 mg/L vía oral por 10 y 20 semanas, encontraron que los niveles de triglicéridos y colesterol incrementaron tanto en suero como en hígado (Go et al., 2015; Zhang et al., 2015), sin embargo, no se encontró alterado el contenido de colesterol y HDL en suero, lo que indica que la regulación del colesterol no se alteró tanto en ratones expuestos por un mes (Fig. 12C, 12D) como los expuestos por tres meses (Fig. 13C, 13D). En los ratones de un mes encontramos que el contenido de TG disminuyó en suero, con respecto al NT (Fig. 12E), sin embargo, a tres meses, los niveles de TG no se alteraron en los ratones tratados con Cd con respecto al NT (Fig. 13E). Aunado a ello, también se analizó si el Cd altera los niveles de TG y colesterol en el hígado, sin embargo, no se encontró alterado su contenido en muestras de un mes (Fig. 18A, 18B) o tres meses (Fig. 18E, 18F). Se corroboró con la tinción BODIPY, una técnica lipofílica más sensible, que efectivamente no se estaba favoreciendo la acumulación de colesterol (Fig. 19A, 19B) o de gotas lipídicas (19A, 19B), esto probablemente porque el tiempo de exposición es muy corto y la célula aún no requiere de producir más lípidos.

La fibrosis hepática es un resultado patológico del daño hepático crónico remarcado por la excesiva acumulación de proteínas de la matriz extracelular como la colágena (Dhar et al., 2020). Nuestro grupo de investigación demostró que la exposición a Cd

en la células CFSC-25 por 3, 5 y 10 horas promueve la expresión de colágena, indicando que el Cd puede promover la síntesis de colágena (Del Carmen et al., 2002); por ello nosotros decidimos evaluar si el Cd en la exposición crónica promueve la acumulación de colágena, sin embargo, encontramos que este tiempo de exposición no promueve la acumulación de esta proteína en el tejido hepático (Fig. 15A), muy probablemente por la concentración, que al ser tan baja el daño es muy sutil y/o que se necesita más tiempo de exposición para que el daño sea más notorio y se requiera de la activación de las células estelares para la producción de colágena.

La metalotioneína (MT-II) es una proteína de bajo peso molecular, rica en cisteínas con la capacidad de unir metales pesados a su estructura gracias a los grupos tioles de los residuos de cisteína, es importante en la homeostasis del zinc (Zn) y en la detoxificación de metales tóxicos (Wyrich et al., 2023). Ha sido reportado ampliamente en nuestro grupo y en otras investigaciones que el Cd es un inductor de la MT-II (Escobar et al., 2009; Martínez Flores et al., 2013; Rosales-Cruz et al., 2018; Souza et al., 2004, 2009; Souza-Arroyo et al., 2022), esto por su capacidad de desplazar al zinc (Zn) de dicha proteína, provocando que los niveles del Zn se incrementen intracelularmente, promoviendo la activación de la proteína MTF-1, la cual se une a sus genes blanco para inducir su expresión, entre sus genes blanco se encuentra la metalotioneína (Dong et al., 2015), sin embargo y sorpresivamente, no se encontró que el Cd favorezca la acumulación de la MT-II en este modelo (Fig. 16A, 16B), quizás porque la cantidad de Cd que le llega al hígado no promueve el incremento de los niveles de Zn en el hígado (Fig. 8B), lo que explicaría porque no se induce a la MT-II,

en este modelo. Otra posible explicación es que dentro de la célula el Cd también se puede unir al glutatión (GSH), el cual contiene una cisteína en su estructura por lo tanto se requieren dos moléculas de GSH para neutralizar una molécula de Cd, de hecho, se ha propuesto al GSH como la primera línea de defensa contra la toxicidad del Cd, generando el complejo Cd(GSH)₂ (Delalande et al., 2010). Singhal y colaboradores (1987), encontraron que ratones tratados con sulfoximina de butionina, un potente inhibidor de la gama-glutamyl-cisteína sintasa, fueron sensibilizados a la toxicidad del Cd, favoreciendo el incremento de la metalotioneína (Singhal et al., 1987). Por otro lado, se sabe que el hígado y el riñón son cooperativos y compensatorios para algunas regulaciones biológicas en el cuerpo (Watanabe, 2016); años atrás se encontró que la redistribución del Cd del hígado hacía el riñón, se hace mediante el complejo Cd-MT, el cual es tomado por los túbulos renales mediante la filtración y reabsorción glomerular (Nordberg et al., 1975). Esto abre la pregunta de si a estos tiempos de exposición de uno y tres meses y a esta concentración de Cd (10 mg/L), es el GSH quien toma un papel protector en lugar de la MT-I o si el hígado está sacando el complejo Cd-MT del hígado hacía el riñón, es decir que, si se incrementan los niveles de MT hepáticos, pero al ser excretados hacía el riñón, estos no aumenten en el tejido hepático, pero si en el riñón. Sería interesante evaluar los niveles de GSH con respecto al GSSG (glutatión oxidado) y evaluar el contenido de MT por Western Blot en riñón para evaluar su contenido y dilucidar el papel de la MT a nivel hepático.

El túbulo proximal es el mayor sitio de deposición, acumulación y daño por Cd en el riñón, debido al desarrollo de hipertrofia de las células epiteliales del túbulo proximal

con aparición de proteinuria (Yan et al., 2021), cuando la concentración de Cd en la corteza renal se incrementa y alcanza una concentración crítica, aparece la disfunción renal (Nordberg et al., 2022), sin embargo, en nuestro modelo no se encontró que a un mes (Fig. 14A) y tres meses (Fig. 14B, 14C) el Cd afecte la funcionalidad renal, quizás por ser una concentración muy pequeña y porque los tiempos de exposición son muy cortos.

Por otra parte, se evaluó parámetros del estado REDOX, ya que ha sido evidenciado que el Cd incrementa los niveles de malondialdehído (MDA) y se modifica el contenido de las enzimas antioxidantes en modelos de ratones del Instituto de Investigación del Cáncer (ICR) machos de 6 semanas tratados con 0.5 mg/kg o 2 mg/kg durante 36 días (Jin et al., 2016). Sin embargo, en nuestro modelo de exposición a un mes no se encontró ningún incremento en la peroxidación de lípidos (Fig.17A), ni se modificó el contenido de las enzimas antioxidantes como SOD1 (Fig. 17C), GPx (Fig. 17E) y Catalasa (Fig. 17D). A uno y tres meses de exposición tampoco se encuentra alterado el contenido de las enzimas pertenecientes a la familia de la Glutatión Peroxidasa como GPx-1/2 o la GPx-4 (Fig. 17F, 17G, 17H).

En las líneas celulares HepRG, HepG2 y SK-Hep-1 tratadas con bajas concentraciones de Cd (5 y 10 nM) se encontró que el Cd favorece la activación de la ruta de señalización AKT/mTOR (Niture et al., 2023), pero el análisis de un mes y tres meses de exposición a 10 mg/L de Cd en ratones CD-1 no muestra incremento en la activación de esta ruta de señalización (Fig. 20A, 20B, 20C, 20D, 20E, 20F). Diversos estudios han reportado que SREBP-1c es un blanco de la activación de mTOR

mediado por AKT, en células epiteliales con mTOR silenciado o tratadas con raptor (el inhibidor de mTORC1), se encontró que esto era suficiente para abolir la incorporación dependiente de AKT de la glucosa, piruvato o acetato hacia los lípidos celulares y este efecto se ve más pronunciado en la incorporación de acetil-CoA, el cual solo requiere la actividad de Fasn (Porstmann et al., 2008), sin embargo, en nuestro modelo de exposición con Cd por uno y tres meses, SREBP-1c no está siendo activado, ya que los niveles de SREBP-1c-fosforilado (una fosforilación de regulación negativa) en los grupos tratados con Cd se mantienen igual al de los NT (Fig. 21A, 21B, 21C, 21D, 21E), por lo tanto no se están ejecutando señales lipogénicas, aunado a ello, con la evaluación de la enzima limitante de la síntesis de lípidos Fasn, corroboramos que la falta de activación de SREBP-1c en los ratones tratados con Cd por uno y tres meses mantiene los niveles de Fasn como el NT (Fig. 21F, 21I, 21L) y que la síntesis de colesterol tampoco se está promoviendo al tener los niveles de la enzima HMGCoAR en las muestras tratadas por uno y tres meses sin diferencia con respecto al NT (Fig. 21H, 21K), lo que explica la falta de acumulación lipídica tanto en el tejido hepático (Fig. 18A, 18B, 18C, 18D, 18E, 18F y Fig. 19A, 19B, 19C), es decir, que a uno y tres meses de exposición a Cd la maquinaria de lipogénesis no se está promoviendo y por ello, no se incrementa el contenido de TG y colesterol en el hígado.

En la línea celular HepG2, se encontró que la exposición de Cd con 5 μ M por un hora promueve la activación de STAT3 mediado por ERK, promoviendo la acumulación de HSP-70 en las células, como un posible mecanismo de protección en contra de la toxicidad del Cd (Souza et al., 2009), por ello se evaluó si la exposición sub-crónica y

crónica a Cd promueve la acumulación de HSP-70, como un posible mecanismo de protección hepática, sin embargo no se encontró incrementado el contenido de HSP-70 en nuestro modelo de un mes (Fig. 22A, 22B) y tres meses (Fig. 22A, 22C), lo que indica que el mecanismo de protección hepática a Cd en este modelo podría ser independiente al de HSP-70. Aunado a ello, otros trabajos han reportado que el Cd promueve la activación de STAT3; en ratones de la cepa C57BL6/J de 8 a 10 semanas de edad expuestos a Cd en el agua de tomar a una concentración de 10 μ M por 14 días, encontraron que las células endoteliales linfáticas adquirirían características angiogénicas y proliferativas mediado por la activación de STAT3 (Xing et al., 2024), sin embargo, en nuestro modelo y órgano de estudio, no encontramos que STAT3 se active a uno (Fig. 22D, 22E) y tres meses (Fig. 22D, 22E), quizás porque el tiempo de exposición es muy corto como para inducir la activación de STAT3 y por lo tanto, los niveles de HSP-70 no se incrementen.

Entre los componentes de la ruta de las MAPKs, ERK está involucrada en la regulación de la proliferación celular y diferenciación, JNK es la molécula clave en la transducción de señales celulares inducidas por estrés y p38 media la ocurrencia de la inflamación celular, proliferación y apoptosis (Cui et al., 2021). En la línea celular de hepatocitos humanos L02, encontraron que el silenciamiento de la fosfatasa DUSP16 (un inactivador de JNK), promueve la activación de JNK en las células tratadas con ácido palmítico y diversos estudios han demostrado que la regulación negativa de JNK protege contra MASLD, ya que se ha reportado que JNK es un inductor de inflamación (Wu et al., 2020), en los datos obtenidos se observó que el tratamiento con Cd a tres

meses disminuye el contenido de p-JNK (Fig. 23D, 23F), indicando que la disminución de JNK activa, es lo que podría estar previniendo la acumulación de lípidos en los hepatocitos y el daño celular, al impedir la inflamación mediada por el Cd. p38 es activada por Cd en respuesta al estrés inmediato, tomando un papel crucial en la respuesta celular a estresores ambientales, diferenciación y regulación del ciclo celular (Kefaloyianni et al., 2005). Se ha encontrado que p38 es necesario para la progresión mitótica y contribuye a la citocinesis por activar a MNK1 en los hepatocitos (Rius-Pérez et al., 2019). Con respecto a p38, se encontró que solo a tres meses de exposición con Cd, se incrementó el contenido de p-p38 (Fig. 23A, 23C), sin embargo, permitiendo quizás que su activación esté asociada con la proliferación de los hepatocitos al estar involucrada con la citocinesis. Sin embargo, aún falta por dilucidar el efecto que tiene la activación de p38 junto con la represión de JNK.

El yodo se encuentra presente en una amplia variedad de alimentos, es un microelemento exógeno esencial que debe ser consumido regularmente (Nedić, 2023), es principalmente utilizado para la síntesis de la T3 y T4 en la tiroides; en el sistema sanguíneo, la T4 y T3 pueden circular unidas a proteínas incluidas la albumina y ser depositadas en hígado para ser metabolizadas y liberar el yodo, el cual se excreta mediante los ácidos biliares (Ahad et al., 2010). El análisis por ICP-MS mostró el incremento de yodo en las muestras de hígado obtenidas de la exposición crónica (Fig. 24B), se buscó si existía una correlación con el incremento de los niveles de Cd y los de yodo, dicho análisis arrojó que el incremento de la acumulación de Cd (Fig. 24A), se relaciona positivamente con el incremento en los niveles de yodo (Fig. 24C), este

hallazgo abre muchas preguntas entre ellas la que más resalta es ¿Podrá el yodo estar tomando un papel protector ante el daño que pudiera estar ejerciendo el Cd?; hasta el momento existe poca literatura que haya evaluado esta relación yodo-cadmio. Sin embargo, en ratones Balb-c tratados con una dieta suplementada con 2.4 y 4.8 mg/l de KIO₃, es decir 8 y 16 veces más de lo que se debe consumir en la dieta, se encontró que el exceso de los niveles de yodo pudiera estar favoreciendo el desarrollo de la esteatosis, esto al inducir la expresión de las enzimas limitantes de la síntesis de lípidos como SREBP-1c y Fasn (Xia et al., 2013), ahora bien, esto se reporta con la exposición a altos niveles de yodo, por lo que la pregunta sigue sonando en sentido de si el yodo obtenido fisiológicamente del alimento puede tomar un papel protector.

Por otro lado, se sabe que el procesamiento de T4 a T3 en el hígado está regulado por la 5'-deyodasa D1 y los niveles de D1 son directamente regulados por los niveles de T3 (Milanesi et al., 2017). La actividad de la D3 se expresa en múltiples estructuras fetales, es decir se asocia al desarrollo embrionario, ya que, en humanos adultos, su expresión es alta en tejidos como el endometrio y la placenta, limitando su expresión a mujeres (Huang, 2005). Keser y colaboradores (2009) encontraron que la actividad de D3 incrementó posterior a la hepatectomía parcial y se asoció con el incremento de la proliferación celular y la disminución de los niveles locales y circulantes de T3 y T4 (Kester et al., 2009). Con los resultados obtenidos, se abre la pregunta si la exposición a Cd durante 3 meses favorece el incremento de yodo (Fig. 24D) en el hígado, debido a que el daño ejercido en algunos hepatocitos permite que hepatocitos sanos puedan proliferar, según lo encontrado con el análisis morfométrico (Fig. 10, Fig. 11) gracias a

la D3 y su mecanismo de quitar el yodo de la estructura de la T4 para convertirla en T3. Para responder esta pregunta, sería interesante evaluar los niveles de hormonas T3 y T4, en plasma y en hígado con el fin de evaluar si hay un cambio posterior al tratamiento, así mismo, evaluar el contenido de las enzimas D1 y D3 en el hígado como posible inductor de proliferación de los hepatocitos, que pudiera dar respuesta al encontrado en este proyecto.

10. Conclusión

El consumo de Cd (10 mg/L) durante un mes favorece la regeneración de los hepatocitos mediante un mecanismo aún por dilucidar, sin afectar la funcionalidad hepática, ya que no altera las enzimas de daño hepático en suero. Sin embargo, la exposición a Cd durante tres meses conduce a la acumulación de este metal tóxico en el hígado, promoviendo la muerte celular de algunos hepatocitos y, como resultado, la proliferación de hepatocitos sanos, probablemente mediada por la activación de p38 y la represión de JNK. El aumento de los niveles de Cd intracelulares también parece incrementar los niveles de yodo hepático, aunque el mecanismo detrás de esta relación aún no está claro, lo que plantea la pregunta sobre el papel del yodo en el hígado en el contexto de la exposición al Cd. Además, la exposición a Cd durante tres meses no parece alterar los niveles de Zn y por ende, los niveles de MT-II en el hígado permanecen sin cambios. El consumo de Cd durante uno y tres meses aparentemente no afecta la funcionalidad renal, dado que no se observa un aumento de proteínas en la orina. En estos períodos de exposición, el Cd no induce la acumulación de lípidos, ya que no activa la vía lipogénica AKT/mTOR ni favorece la acumulación de enzimas

lipogénicas. Aunque el hígado no muestra signos de daño exacerbado, probablemente debido a la baja concentración de Cd acumulada, sí presenta señales de daño sutil que podrían intensificarse con períodos de exposición más prolongados (Fig. 25).

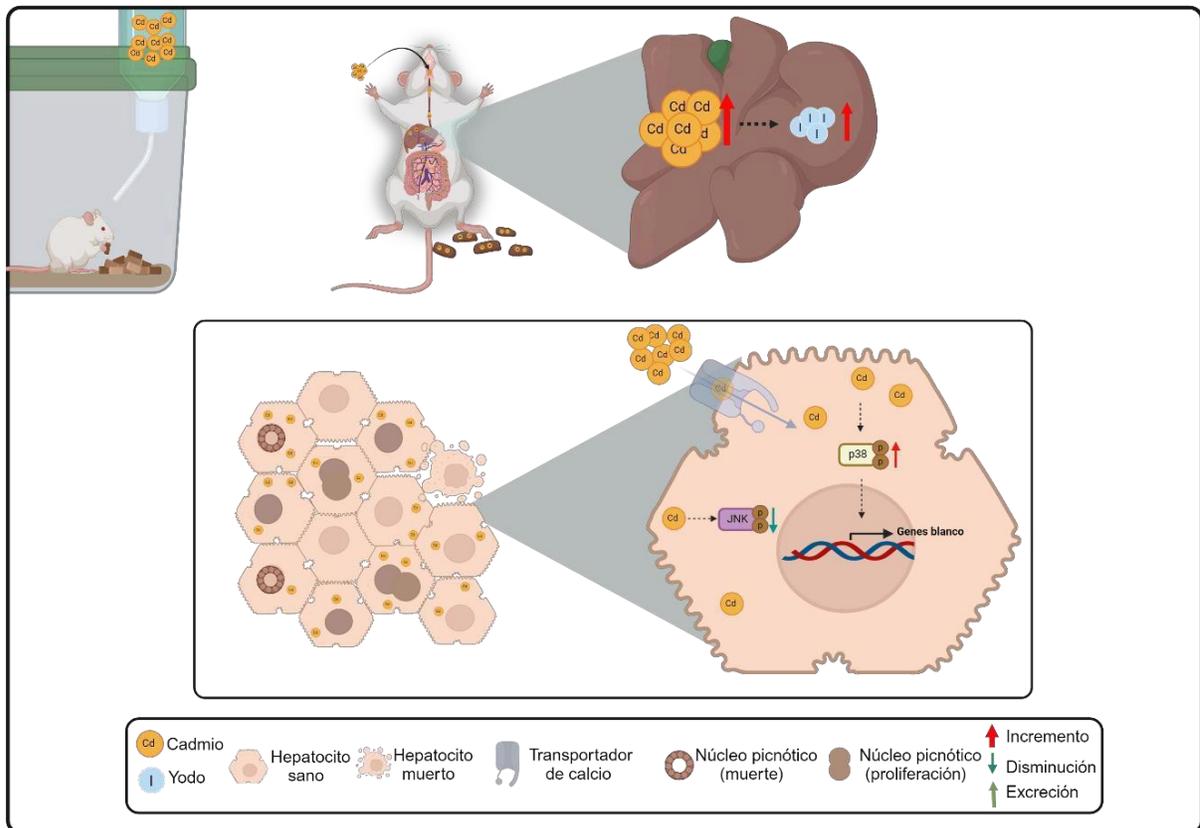


Fig. 25. Respuesta del hígado ante el consumo de Cd. La exposición a Cd durante tres meses favorece su deposición a nivel hepático, favoreciendo la muerte de los hepatocitos y promoviendo la proliferación celular. Así mismo, la deposición de Cd en el hígado incrementa los niveles de yodo hepático.

11. Referencias

- Ahad, F., & Ganie, S. A. (2010). Iodine, Iodine metabolism and Iodine deficiency disorders revisited. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 14(1), 13. [/pmc/articles/PMC3063534/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23811114/)
- Alshehri, A. S., El-kott, A. F., El-Kenawy, A. E., Khalifa, H. S., & AlRamlawy, A. M. (2021). Cadmium chloride induces non-alcoholic fatty liver disease in rats by stimulating miR-34a/SIRT1/FXR/p53 axis. *Science of the Total Environment*, 784. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147182>
- Anerillas, C., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2020). Regulation of senescence traits by MAPKs. *GeroScience*, 42(2), 397. <https://doi.org/10.1007/S11357-020-00183-3>
- Ang, C. H., Hsu, S. H., Guo, F., Tan, C. T., Yu, V. C., Visvader, J. E., Chow, P. K. H., & Fu, N. Y. (2019). Lgr5+ pericentral hepatocytes are self-maintained in normal liver regeneration and susceptible to hepatocarcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(39), 19530–19540. https://doi.org/10.1073/PNAS.1908099116/SUPPL_FILE/PNAS.1908099116.SAPP.PDF
- Angelico, F., Ferro, D., & Baratta, F. (2021). Is the mediterranean diet the best approach to NAFLD treatment today? In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 3, pp. 1–6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu13030739>
- Asif, S., Kim, R. Y., Fatica, T., Sim, J., Zhao, X., Oh, Y., Denoncourt, A., Cheung, A. C., Downey, M., Mulvihill, E. E., & Kim, K. H. (2022). Hmgcs2-mediated ketogenesis modulates high-fat diet-induced hepatosteatosis. *Molecular Metabolism*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101494>
- ATSDR. (1999). *Resumen de Salud Pública Cadmio*. www.atsdr.cdc.gov/es
- ATSDR. (2012). *TOXICOLOGICAL PROFILE FOR CADMIUM*.
- ATSDR. (2023, May 23). *Cadmium Toxicity: What Is the Biological Fate of Cadmium in the Body?* | *Environmental Medicine* | ATSDR. <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/cadmium/Biological-Fate.html>
- Banales, J. M., Huebert, R. C., Karlsen, T., Strazzabosco, M., LaRusso, N. F., & Gores, G. J. (2019). Cholangiocyte pathobiology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2019 16:5, 16(5), 269–281. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0125-y>
- Bernhoft, R. A. (2013). Cadmium toxicity and treatment. In *The Scientific World Journal* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/394652>

- Bianco, A. C., & da Conceição, R. R. (2018). The Deiodinase Trio and Thyroid Hormone Signaling. *Methods in Molecular Biology*, 1801, 67–83. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7902-8_8
- Bruinstroop, E., van der Spek, A. H., & Boelen, A. (2023). Role of hepatic deiodinases in thyroid hormone homeostasis and liver metabolism, inflammation, and fibrosis. *European Thyroid Journal*, 12(3). <https://doi.org/10.1530/ETJ-22-0211>
- Burton, J. C., Antoniadou, W., Okalova, J., Roos, M. M., & Grimsey, N. J. (2021). Atypical p38 Signaling, Activation, and Implications for Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 4183, 22(8), 4183. <https://doi.org/10.3390/IJMS22084183>
- Cao, X., Fu, M., Bi, R., Zheng, X., Fu, B., Tian, S., Liu, C., Li, Q., & Liu, J. (2021). Cadmium induced BEAS-2B cells apoptosis and mitochondria damage via MAPK signaling pathway. *Chemosphere*, 263. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128346>
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 50–83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10/ASSET/34E7CAE3-9440-459B-A51C-B0D21B9097E6/ASSETS/GRAPHIC/ZMR9990922670010.JPEG>
- Castro L, & Silva G. (2015). HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(5), 600–612. <https://doi.org/10.1016/J.RMCLC.2015.09.006>
- Chadha, R., & Meador-Woodruff, J. H. (2020). Downregulated AKT-mTOR signaling pathway proteins in dorsolateral prefrontal cortex in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2020 45:6, 45(6), 1059–1067. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0614-2>
- Chen, J. W., Kong, Z. L., Tsai, M. L., Lo, C. Y., Ho, C. T., & Lai, C. S. (2018). Tetrahydrocurcumin ameliorates free fatty acid-induced hepatic steatosis and improves insulin resistance in HepG2 cells. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), 1075–1085. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.005>
- Cheng, Q., Li, C., Yang, C. fang, Zhong, Y. juan, Wu, D., Shi, L., Chen, L., Li, Y. wen, & Li, L. (2019). Methyl ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through the TGF-β1/Smad and NOX4/ROS pathways. *Chemico-Biological Interactions*, 299, 131–139. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2018.12.006>
- Chunhabundit, R. (2016). Cadmium exposure and potential health risk from foods in Contaminated area, Thailand. *Toxicological Research*, 32(1), 65–72. <https://doi.org/10.5487/TR.2016.32.1.065/METRICS>

- Coulthard, L. R., White, D. E., Jones, D. L., McDermott, M. F., & Burchill, S. A. (2009). p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, 15(8), 369–379. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2009.06.005>
- Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical Journal*, 429(3), 403–417. <https://doi.org/10.1042/BJ20100323>
- Cui, H., Lin, Y., Xie, L., & Zhao, J. (2021). Urantide decreases hepatic steatosis in rats with experimental atherosclerosis via the MAPK/Erk/JNK pathway. *Molecular Medicine Reports*, 23(4). <https://doi.org/10.3892/MMR.2021.11923>
- Dao Thi, V. L., Wu, X., Belote, R. L., Andreo, U., Takacs, C. N., Fernandez, J. P., Vale-Silva, L. A., Prallet, S., Decker, C. C., Fu, R. M., Qu, B., Uryu, K., Molina, H., Saeed, M., Steinmann, E., Urban, S., Singaraja, R. R., Schneider, W. M., Simon, S. M., & Rice, C. M. (2020). Stem cell-derived polarized hepatocytes. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15337-2>
- De la Rosa Rodriguez, M. A., Deng, L., Gemmink, A., van Weeghel, M., Aoun, M. L., Warnecke, C., Singh, R., Borst, J. W., & Kersten, S. (2021). Hypoxia-inducible lipid droplet-associated induces DGAT1 and promotes lipid storage in hepatocytes. *Molecular Metabolism*, 47. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101168>
- Del Carmen, E. M., Nica Souza, V., Bucio, L., Hernández, E., Damián-Matsumura, P., Nica Zaga, V., & Concepción Gutiérrez-Ruiz, M. (2002). Cadmium induces a 1 collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells. In *Toxicology* (Vol. 170). www.elsevier.com/locate/toxicol
- Delalande, O., Desvaux, H., Godat, E., Valleix, A., Junot, C., Labarre, J., & Boulard, Y. (2010). Cadmium – glutathione solution structures provide new insights into heavy metal detoxification. *The FEBS Journal*, 277(24), 5086–5096. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2010.07913.X>
- Deng, M., Wang, J., Wu, H., Wang, M., Cao, D., Li, J., Wu, Y., & Gong, J. (2020). IL-4 Alleviates Ischaemia-Reperfusion Injury by Inducing Kupffer Cells M2 Polarization via STAT6-JMJD3 Pathway after Rat Liver Transplantation. *Biomed Res Int*, 2020, 2953068–2953068. <https://doi.org/10.1155/2020/2953068>
- Dhar, D., Baglieri, J., Kisseleva, T., & Brenner, D. A. (2020). Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. <https://doi.org/10.1177/1535370219898141>, 245(2), 96–108. <https://doi.org/10.1177/1535370219898141>
- Dong, G., Chen, H., Qi, M., Dou, Y., & Wang, Q. (2015). Balance between metallothionein and metal response element binding transcription factor 1 is mediated by zinc ions (Review). In *Molecular Medicine Reports* (Vol. 11, Issue 3, pp. 1582–1586). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2969>

- Enriquez-Cortina, C., Almonte-Becerril, M., Clavijo-Cornejo, D., Palestino-Domínguez, M., Bello-Monroy, O., Nuño, N., López, A., Bucio, L., Souza, V., Hernández-Pando, R., Muñoz, L., Gutiérrez-Ruiz, M. C., & Gómez-Quiroz, L. E. (2013). Hepatocyte growth factor protects against isoniazid/rifampicin-induced oxidative liver damage. *Toxicological Sciences*, *135*(1), 26–36. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft134>
- Escobar, M. D. C., Souza, V., Bucio, L., Hernández, E., Gmez-Quiroz, L. E., & Ruiz, M. C. G. (2009). MAPK activation is involved in Cadmium-induced Hsp70 expression in HepG2 cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *19*(8), 503–509. <https://doi.org/10.3109/15376510903325670>
- Gadd, V. L., Aleksieva, N., & Forbes, S. J. (2020). Epithelial Plasticity during Liver Injury and Regeneration. *Cell Stem Cell*, *27*(4), 557–573. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2020.08.016/ASSET/F10A8A12-7C0D-4A66-A30B-68C179B49764/MAIN.ASSETS/GR3.JPG>
- Gao, M., Dong, Z., Sun, J., Liu, W., Xu, M., Li, C., Zhu, P., Yang, X., Shang, X., Wu, Y., & Liu, S. (2020). Liver-derived exosome-laden lncRNA MT1DP aggravates cadmium-induced nephrotoxicity. *Environmental Pollution*, *258*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113717>
- Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., & Catalano, A. (2020). The effects of cadmium toxicity. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113782>
- Gissen, P., & Arias, I. M. (2015). Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *Journal of Hepatology*, *63*(4), 1023–1037. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2015.06.015/ASSET/99CE1C91-B248-406D-8E20-541EF5ECBDDA/MAIN.ASSETS/GR6.JPG>
- Go, Y.-M., Sutliff, R. L., Chandler, J. D., Khalidur, R., Kang, B.-Y., Anania, F. A., Orr, M., Hao, L., Fowler, B. A., & Jones, D. P. (2015). Low-Dose Cadmium Causes Metabolic and Genetic Dysregulation Associated With Fatty Liver Disease in Mice. *Toxicological Sciences*, *147*(2), 524–534. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv149>
- Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., & Groneberg, D. A. (2006). The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology (London, England)*, *1*(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-1-22>
- Gordillo, M., Evans, T., & Gouon-Evans, V. (2015). Orchestrating liver development. *Development*, *142*(12), 2094–2108. <https://doi.org/10.1242/DEV.114215>
- Hanlon, C. L., & Yuan, L. (2022). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Role of Visceral Adipose Tissue. *Clinical Liver Disease*, *19*(3), 106–110. <https://doi.org/10.1002/CLD.1183>

- Hatch-McChesney, A., & Lieberman, H. R. (2022). Iodine and Iodine Deficiency: A Comprehensive Review of a Re-Emerging Issue. *Nutrients* 2022, Vol. 14, Page 3474, 14(17), 3474. <https://doi.org/10.3390/NU14173474>
- He, X., Qi, Z., Hou, H., Qian, L., Gao, J., & Zhang, X. X. (2020). Structural and functional alterations of gut microbiome in mice induced by chronic cadmium exposure. *Chemosphere*, 246. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125747>
- Hernández-Cruz, E. Y., Amador-Martínez, I., Aranda-Rivera, A. K., Cruz-Gregorio, A., & Pedraza Chaverri, J. (2022). Renal damage induced by cadmium and its possible therapy by mitochondrial transplantation. *Chemico-Biological Interactions*, 361. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2022.109961>
- Hijmans, B. S., Grefhorst, A., Oosterveer, M. H., & Groen, A. K. (2014). Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: Mechanism and metabolic consequences. In *Biochimie* (Vol. 96, Issue 1, pp. 121–129). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.007>
- Huang, S. A. (2005). Physiology and pathophysiology of type 3 deiodinase in humans. *Thyroid : Official Journal of the American Thyroid Association*, 15(8), 875–881. <https://doi.org/10.1089/THY.2005.15.875>
- Jin, Y., Zhang, S., Tao, R., Huang, J., He, X., Qu, L., & Fu, Z. (2016). Oral exposure of mice to cadmium (II), chromium (VI) and their mixture induce oxidative- and endoplasmic reticulum-stress mediated apoptosis in the livers. *Environmental Toxicology*, 31(6), 693–705. <https://doi.org/10.1002/tox.22082>
- Jones, M. W., Small, K., Kashyap, S., & Deppen, J. G. (2023). Physiology, Gallbladder. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482488/>
- Kassouf, T., & Sumara, G. (2020). Impact of Conventional and Atypical MAPKs on the Development of Metabolic Diseases. *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 1256, 10(9), 1256. <https://doi.org/10.3390/BIOM10091256>
- Katz, M., Amit, I., & Yarden, Y. (2007). Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1161–1176. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2007.01.002>
- Kefaloyianni, E., Gourgou, E., Ferle, V., Kotsakis, E., Gaitanaki, C., & Beis, I. (2005). Acute thermal stress and various heavy metals induce tissue-specific pro- or anti-apoptotic events via the p38-MAPK signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *The Journal of Experimental Biology*, 208(Pt 23), 4427–4436. <https://doi.org/10.1242/JEB.01924>
- Kester, M. H. A., Toussaint, M. J. M., Punt, C. A., Matondo, R., Aarnio, A. M., Darras, V. M., Everts, M. E., De Bruin, A., & Visser, T. J. (2009). Large induction of type III deiodinase expression after partial hepatectomy in the regenerating mouse and rat liver. *Endocrinology*, 150(1), 540. <https://doi.org/10.1210/EN.2008-0344>

- Khan, Z., Elahi, A., Bukhari, D. A., & Rehman, A. (2022). Cadmium sources, toxicity, resistance and removal by microorganisms-A potential strategy for cadmium eradication. *Journal of Saudi Chemical Society*, 26(6), 101569. <https://doi.org/10.1016/J.JSCS.2022.101569>
- Kumar, R., Mishra, A., Gautam, P., Feroz, Z., Vijayaraghavalu, S., Likos, E. M., Shukla, G. C., & Kumar, M. (2022). Metabolic Pathways, Enzymes, and Metabolites: Opportunities in Cancer Therapy. *Cancers* 2022, Vol. 14, Page 5268, 14(21), 5268. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14215268>
- Kus, E., Kaczara, P., Czyzyska-Cichon, I., Szafranska, K., Zapotoczny, B., Kij, A., Sowinska, A., Kotlinowski, J., Mateuszuk, L., Czarnowska, E., Szymonski, M., & Chlopicki, S. (2019). LSEC Fenestrae Are Preserved despite Pro-inflammatory Phenotype of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Mice on High Fat Diet. *Frontiers in Physiology*, 10(FEB), 426602. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.00006/BIBTEX>
- Lagomarsino, A. (2012). Liver regeneration in nonalcoholic fatty liver disease. *Medwave*, 12(11), e5559–e5559. <https://doi.org/10.5867/medwave.2012.11.5559>
- Li, W., Li, L., & Hui, L. (2020). Cell Plasticity in Liver Regeneration. *Trends in Cell Biology*, 30(4), 329–338. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2020.01.007/ASSET/F9A8838D-B3CD-4647-B592-640E2CBD7F22/MAIN.ASSETS/GR2.JPG>
- Li, Y., Chen, C., Lu, L., Guo, W., VanWagner, L. B., Shikany, J. M., Zhang, S., & Kahe, K. (2022). Cadmium Exposure in Young Adulthood Is Associated with Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Midlife. *Digestive Diseases and Sciences*, 67(2), 689–696. <https://doi.org/10.1007/S10620-021-06869-8>
- Liu, J., Huang, X., Werner, M., Broering, R., Yang, D., & Lu, M. (2017). Advanced method for isolation of mouse hepatocytes, liver sinusoidal endothelial cells, and Kupffer cells. *Methods in Molecular Biology*, 1540, 249–258. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6700-1_21
- Liu, Y. mei, Cong, S., Cheng, Z., Hu, Y. xin, Lei, Y., Zhu, L. li, Zhao, X. ke, Mu, M., Zhang, B. fang, Fan, L. da, Yu, L., & Cheng, M. liang. (2020). Platycodin D alleviates liver fibrosis and activation of hepatic stellate cells by regulating JNK/c-JUN signal pathway. *European Journal of Pharmacology*, 876, 172946. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2020.172946>
- Maeso-Díaz, R., Ortega-Ribera, M., Fernández-Iglesias, A., Hide, D., Muñoz, L., Hessheimer, A. J., Vila, S., Francés, R., Fondevila, C., Albillos, A., Peralta, C., Bosch, J., Tacke, F., Cogger, V. C., & Gracia-Sancho, J. (2018). Effects of aging on liver microcirculatory function and sinusoidal phenotype. *Aging Cell*, 17(6), e12829. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12829>
- Martínez Flores, K., Uribe Marín, B. C., Souza Arroyo, V., Bucio Ortiz, L., López Reyes, A., Gómez-Quiroz, L. E., Rojas del Castillo, E., & Gutiérrez Ruiz, M. C. (2013).

Hepatocytes display a compensatory survival response against cadmium toxicity by a mechanism mediated by EGFR and Src. *Toxicology in Vitro*, 27(3), 1031–1042. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.01.017>

Martínez-Flores K, Fernández-Torres J, Del Razo LM, Aztatzi-Aguilar OG, Zamudio-Cuevas Y, Martínez-Nava GA & López-Macay A. (2024). Efecto del cadmio a través del tabaquismo en el desarrollo de osteoartritis de rodilla. Segunda Reunión de Metales Pesados en la Biología y la Salud. Educación Continúa, UAM-Iztapalapa. https://dc45f18ba8c048bdb84559518261b73b.filesusr.com/ugd/2700da_48a30fc85b38467b97b6e4ca75233c61.pdf

Messina, A., Luce, E., Hussein, M., & Dubart-Kupperschmitt, A. (2020). Pluripotent-Stem-Cell-Derived Hepatic Cells: Hepatocytes and Organoids for Liver Therapy and Regeneration. *Cells* 2020, Vol. 9, Page 420, 9(2), 420. <https://doi.org/10.3390/CELLS9020420>

Michalopoulos, G. K., & Bhushan, B. (2020). Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2020 18:1, 18(1), 40–55. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0342-4>

Milanesi, A., & Brent, G. A. (2017). Iodine and Thyroid Hormone Synthesis, Metabolism, and Action. *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals*, 143–150. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802168-2.00012-9>

Mittal, S., Inamdar, S., Acharya, J., Pekhale, K., Kalamkar, S., Boppana, R., & Ghaskadbi, S. (2020). miR-3666 inhibits development of hepatic steatosis by negatively regulating PPAR γ . *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(10). <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2020.158777>

Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Nishida, E., & Hagiwara, M. (1996). A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23), 13675–13679. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13675>

Morton, O. (2023, May 5). *Metales y metaloides tóxicos: los efectos dañinos en las funciones del cuerpo*. <https://Conahcyt.Mx/Conahcyt-Expone-Problematika-de-Metales-y-Metaloides-Toxicos-y-Su-Impacto-En-La-Salud/>.

Nagataki, S., & Yokoyama, N. (1997). *Iodine: Metabolism and Pharmacology*. 171–188. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60709-7_7

Nedić, O. (2023). Iodine: Physiological importance and food sources. *EFood*, 4(1), e63. <https://doi.org/10.1002/EFD2.63>

Niture, S., Gadi, S., Lin, M., Qi, Q., Niture, S. S., Moore, J. T., Bodnar, W., Fernando, R. A., Levine, K. E., & Kumar, D. (2023). Cadmium modulates steatosis, fibrosis, and

oncogenic signaling in liver cancer cells by activating notch and AKT/mTOR pathways. *Environmental Toxicology*, 38(4), 783–797. <https://doi.org/10.1002/tox.23731>

Nordberg, M., & Nordberg, G. F. (1975). Distribution of metallothionein-bound cadmium and cadmium chloride in mice: preliminary studies. *Environmental Health Perspectives*, 12, 103. <https://doi.org/10.1289/EHP.7512103>

Nordberg, M., & Nordberg, G. F. (2022). Metallothionein and Cadmium Toxicology—Historical Review and Commentary. *Biomolecules*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/BIOM12030360>

Ohta, H., & Ohba, K. (2020). Involvement of metal transporters in the intestinal uptake of cadmium. *The Journal of Toxicological Sciences*, 45(9), 539–548.

Osaki, L. H., & Gama, P. (2013). MAPKs and Signal Transduction in the Control of Gastrointestinal Epithelial Cell Proliferation and Differentiation. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, Vol. 14, Pages 10143-10161, 14(5), 10143–10161. <https://doi.org/10.3390/IJMS140510143>

Park, E., Kim, J., Kim, B., & Park, E. Y. (2021). Association between environmental exposure to cadmium and risk of suspected non-alcoholic fatty liver disease. *Chemosphere*, 266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128947>

Park, W. J., Park, J. W., Merrill, A. H., Storch, J., Pewzner-Jung, Y., & Futerman, A. H. (2014). Hepatic fatty acid uptake is regulated by the sphingolipid acyl chain length. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841(12), 1754. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2014.09.009>

Paudyal, B. P. (2005). Poisoning : pattern and profile of admitted cases in a hospital in central Nepal. *JNMA; Journal of the Nepal Medical Association*, 44(159), 92–96. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16554862/>

Peeters, R. P., & Visser, T. J. (2017). Metabolism of Thyroid Hormone. *New Comprehensive Biochemistry*, 18, 81–103. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60641-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60641-9)

Peng, Y., Wang, Y., Zhou, C., Mei, W., & Zeng, C. (2022). PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway? *Frontiers in Oncology*, 12, 819128. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.819128/BIBTEX>

Pi, H., Liu, M., Xi, Y., Chen, M., Tian, L., Xie, J., Chen, M., Wang, Z., Yang, M., Yu, Z., Zhou, Z., & Gao, F. (2019). Long-term exercise prevents hepatic steatosis: a novel role of FABP1 in regulation of autophagy-lysosomal machinery. *FASEB Journal*, 33(11), 11870–11883. <https://doi.org/10.1096/fj.201900812R>

Planas-Paz, L., Orsini, V., Boulter, L., Calabrese, D., Pikiólek, M., Nigsch, F., Xie, Y., Roma, G., Donovan, A., Mart, P., Beckmann, N., Dill, M. T., Carbone, W., Bergling, S., Isken, A., Mueller, M., Kinzel, B., Yang, Y., Ma, X., ... Tchorz, J. S. (2016). The RSPO–

LGR4/5–ZNF3/RNF43 module controls liver zonation and size. *Nature Cell Biology* 2016 18:5, 18(5), 467–479. <https://doi.org/10.1038/ncb3337>

- Polyzos, S. A., Kountouras, J., & Mantzoros, C. S. (2017). Adipose tissue, obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Endocrinologica*, 42(2), 92–108. <https://doi.org/10.23736/S0391-1977.16.02563-3>
- Porstmann, T., Santos, C. R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., Griffiths, J. R., Chung, Y. L., & Schulze, A. (2008). SREBP Activity Is Regulated by mTORC1 and Contributes to Akt-Dependent Cell Growth. *Cell Metabolism*, 8(3), 224–236. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2008.07.007/ATTACHMENT/F7F2A7D0-2CE5-4497-8D67-C7094415FD7C/MMC1.PDF>
- Provera, A., Vecchio, C., Sheferaw, A. N., Stoppa, I., Pantham, D., Dianzani, U., & Sutti, S. (2024). From MASLD to HCC: What's in the middle? *Heliyon*, 10(15), e35338. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E35338/ASSET/E97DAE13-1C4E-40E2-819C-6EA198D7B019/MAIN.ASSETS/GR1.JPG>
- Rahman, H. H., Niemann, D., & Munson-McGee, S. H. (2022). Association between environmental toxic metals, arsenic and polycyclic aromatic hydrocarbons and chronic obstructive pulmonary disease in the US adult population. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(36), 54507–54517. <https://doi.org/10.1007/S11356-022-19695-W/METRICS>
- Reyes-Hinojosa, D., Lozada-Pérez, C. A., Zamudio Cuevas, Y., López-Reyes, A., Martínez-Nava, G., Fernández-Torres, J., Olivos-Meza, A., Landa-Solis, C., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Rojas del Castillo, E., & Martínez-Flores, K. (2019). Toxicity of cadmium in musculoskeletal diseases. In *Environmental Toxicology and Pharmacology* (Vol. 72). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103219>
- Rius-Pérez, S., Tormos, A. M., Pérez, S., Finamor, I., Rada, P., Valverde, Á. M., Nebreda, A. R., Sastre, J., & Taléns-Visconti, R. (2019). p38 α deficiency restrains liver regeneration after partial hepatectomy triggering oxidative stress and liver injury. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39428-3>
- Rosales-Cruz, P., Domínguez-Pérez, M., Reyes-Zárata, E., Bello-Monroy, O., Enríquez-Cortina, C., Miranda-Labra, R., Bucio, L., Gómez-Quiroz, L. E., Rojas-Del Castillo, E., Gutiérrez-Ruiz, M. C., & Souza-Arroyo, V. (2018). Cadmium exposure exacerbates hyperlipidemia in cholesterol-overloaded hepatocytes via autophagy dysregulation. *Toxicology*, 398–399, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.02.007>
- Rui, L. (2014). Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177–197. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C130024>
- Ruissen, M. M., Mak, A. L., Beuers, U., Tushuizen, M. E., & Holleboom, A. G. (2020). Non-alcoholic fatty liver disease: a multidisciplinary approach towards a cardiometabolic

liver disease. *European Journal of Endocrinology*, 183(3), R57–R73. <https://doi.org/10.1530/EJE-20-0065>

Ruz-Maldonado, I., Gonzalez, J. T., Zhang, H., Sun, J., Bort, A., Kabir, I., Kibbey, R. G., Suárez, Y., Greif, D. M., & Fernández-Hernando, C. (2024). Heterogeneity of hepatocyte dynamics restores liver architecture after chemical, physical or viral damage. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45439-0>

Schulze, R. J., Krueger, E. W., Weller, S. G., Johnson, K. M., Casey, C. A., Schott, M. B., & McNiven, M. A. (2020). Direct lysosome-based autophagy of lipid droplets in hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(51), 32443–32452. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2011442117/-/DCSUPPLEMENTAL>

Shim, J. H., Xiao, C., Paschal, A. E., Bailey, S. T., Rao, P., Hayden, M. S., Lee, K. Y., Bussey, C., Steckel, M., Tanaka, N., Yamada, G., Akira, S., Matsumoto, K., & Ghosh, S. (2005). TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes & Development*, 19(22), 2668–2681. <https://doi.org/10.1101/GAD.1360605>

Simoni-Nieves, A., Salas-Silva, S., Chávez-Rodríguez, L., Escobedo-Calvario, A., Desoteux, M., Bucio, L., Souza, V., Miranda-Labra, R. U., Muñoz-Espinosa, L. E., Coulouarn, C., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Marquardt, J. U., & Gomez-Quiroz, L. E. (2021). The consumption of cholesterol-enriched diets conditions the development of a subtype of hcc with high aggressiveness and poor prognosis. *Cancers*, 13(7), 1721. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13071721/S1>

Singhal, R. K., Anderson, M. E., & Meister, A. (1987). Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1(3), 220–223. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.1.3.2887478>

Sorrenti, S., Baldini, E., Pironi, D., Lauro, A., D'orazi, V., Tartaglia, F., Tripodi, D., Lori, E., Gagliardi, F., Praticò, M., Illuminati, G., D'andrea, V., Palumbo, P., & Ulisse, S. (2021). Iodine: Its Role in Thyroid Hormone Biosynthesis and Beyond. *Nutrients 2021, Vol. 13, Page 4469*, 13(12), 4469. <https://doi.org/10.3390/NU13124469>

Souza, V., Escobar, M. D. C., Gómez-Quiroz, L., Bucio, L., Hernández, E., Cossio, E. C., & Gutiérrez-Ruiz, M. C. (2004). Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology*, 197(3), 213–228. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.01.006>

Souza, V., Escobar, M. del C., Bucio, L., Hernández, E., Gómez-Quiroz, L. E., & Gutiérrez Ruiz, M. C. (2009). NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced-STAT3 activation in HepG2 cells. *Toxicology Letters*, 187(3), 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.02.021>

- Souza-Arroyo, V., Fabián, J. J., Bucio-Ortiz, L., Miranda-Labra, R. U., Gomez-Quiroz, L. E., & Gutiérrez-Ruiz, M. C. (2022). The mechanism of the cadmium-induced toxicity and cellular response in the liver. In *Toxicology* (Vol. 480). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153339>
- Suhani, I., Sahab, S., Srivastava, V., & Singh, R. P. (2021). Impact of cadmium pollution on food safety and human health. *Current Opinion in Toxicology*, *27*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.COTOX.2021.04.004>
- Sun, T., Pikiólek, M., Orsini, V., Bergling, S., Holwerda, S., Morelli, L., Hoppe, P. S., Planas-Paz, L., Yang, Y., Ruffner, H., Bouwmeester, T., Lohmann, F., Terracciano, L. M., Roma, G., Cong, F., & Tchorz, J. S. (2020). AXIN2+ Pericentral Hepatocytes Have Limited Contributions to Liver Homeostasis and Regeneration. *Cell Stem Cell*, *26*(1), 97-107.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.10.011>
- Takaesu, G., Surabhi, R. M., Park, K. J., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., & Gaynor, R. B. (2003). TAK1 is Critical for IκB Kinase-mediated Activation of the NF-κB Pathway. *Journal of Molecular Biology*, *326*(1), 105–115. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01404-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01404-3)
- Targher, G., Byrne, C. D., & Tilg, H. (2024). MASLD: a systemic metabolic disorder with cardiovascular and malignant complications. *Gut*, *73*(4), 691–702. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2023-330595>
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, *27*(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- Tsai, T. H., Chen, E., Li, L., Saha, P., Lee, H. J., Huang, L. S., Shelness, G. S., Chan, L., & Chang, B. H. J. (2017). The constitutive lipid droplet protein PLIN2 regulates autophagy in liver. *Autophagy*, *13*(7), 1130–1144. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1319544>
- Vanlaeys, A., Fouquet, G., Kischel, P., Hague, F., Pasco-Brassart, S., Lefebvre, T., Rybarczyk, P., Dhennin-Duthille, I., Brassart, B., Ouadid-Ahidouch, H., & Gautier, M. (2020). Cadmium exposure enhances cell migration and invasion through modulated TRPM7 channel expression. *Archives of Toxicology*, *94*(3), 735–747. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02674-w>
- Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S. J., & Sul, H. S. (2015). Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2015* *16*:11, *16*(11), 678–689. <https://doi.org/10.1038/nrm4074>
- Watanabe, T. (2016). Physiological and pathological interactions between liver and kidney. *The Liver in Systemic Diseases*, 221–249. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55790-6_11/TABLES/4

- Wei, Y., Zhou, J., Yu, H., & Jin, X. (2019). AKT phosphorylation sites of Ser473 and Thr308 regulate AKT degradation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(3), 429–435. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1549974>
- WHO. (2019). *PREVENTING DISEASE THROUGH HEALTHY ENVIRONMENTS*. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/329480/WHO-CED-PHE-EPE-19.4.3-eng.pdf>
- Wu, Y. K., Hu, L. F., Lou, D. S., Wang, B. C., & Tan, J. (2020). Targeting DUSP16/TAK1 signaling alleviates hepatic dyslipidemia and inflammation in high fat diet (HFD)-challenged mice through suppressing JNK MAPK. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 524(1), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.037>
- Wyrich, M., Ohlig, H., Wessolly, M., Mairinger, E., Steinborn, J., Brcic, L., Hegedus, B., Hager, T., Greimelmaier, K., Wohlschlaeger, J., Mairinger, F. D., & Borchert, S. (2023). Induction of metallothionein expression by supplementation of zinc induces resistance against platinum-based treatment in malignant pleural mesothelioma. *Translational Cancer Research*, 12(8), 1929–1936. <https://doi.org/10.21037/TCR-22-2651/COIF>
- Xia, Y., Qu, W., Zhao, L. N., Han, H., Yang, X. F., Sun, X. F., Hao, L. P., & Xu, J. (2013). Iodine excess induces hepatic steatosis through disturbance of thyroid hormone metabolism involving oxidative stress in BaLB/c mice. *Biological Trace Element Research*, 154(1), 103–110. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9705-9>
- Xing, Y., Wang, X., Liu, J., Zhang, Y., Tianran, H., Dong, L., Tian, J., & Liu, J. (2024). Low-dose cadmium induces lymphangiogenesis through activation of the STAT3 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 175, 116741. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2024.116741>
- Xu, F., Na, L., Li, Y., & Chen, L. (2021). Retraction Note to: Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours (Cell & Bioscience, (2020), 10, 1, (54), 10.1186/s13578-020-00416-0). *Cell and Bioscience*, 11(1), 1–1. <https://doi.org/10.1186/S13578-021-00667-5/METRICS>
- Xu, Z., Han, X., Ou, D., Liu, T., Li, Z., Jiang, G., Liu, J., & Zhang, J. (2020). Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(2), 575–587. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-10257-8/TABLES/2>
- Yagi, S., Hirata, M., Miyachi, Y., & Uemoto, S. (2020). Liver Regeneration after Hepatectomy and Partial Liver Transplantation. *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 8414*, 21(21), 8414. <https://doi.org/10.3390/IJMS21218414>

- Yan, L. J., & Allen, D. C. (2021). Cadmium-induced kidney injury: Oxidative damage as a unifying mechanism. In *Biomolecules* (Vol. 11, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom11111575>
- Zarubin, T., & Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research*, 15(1), 11–18. <https://doi.org/10.1038/SJ.CR.7290257>
- Zhang, S., Jin, Y., Zeng, Z., Liu, Z., & Fu, Z. (2015). Subchronic Exposure of Mice to Cadmium Perturbs Their Hepatic Energy Metabolism and Gut Microbiome. *Chemical Research in Toxicology*, 28(10), 2000–2009. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00237>
- Zou, H., Wang, T., Yuan, J., Sun, J., Yuan, Y., Gu, J., Liu, X., Bian, J., & Liu, Z. (2020). Cadmium-induced cytotoxicity in mouse liver cells is associated with the disruption of autophagic flux via inhibiting the fusion of autophagosomes and lysosomes. *Toxicology Letters*, 321, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.12.019>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00260

Matrícula: 2223803121

Efecto del cadmio en la acumulación de lípidos a nivel hepático en un modelo murino.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 13 del mes de noviembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ
DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ
DRA. NATALIA NUÑO LAMBARRI
DR. KARINA MARTINEZ FLORES

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: JESSICA NOHEMI JIMENEZ FABIAN

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JESSICA NOHEMI JIMENEZ FABIAN
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ

VOCAL

DRA. LETICIA BUCIO ORTIZ

VOCAL

DRA. NATALIA NUÑO LAMBARRI

SECRETARIO

DR. KARINA MARTINEZ FLORES