



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA**

“Alteración de la vía de la insulina y de la actividad metabólica tras la exposición a material particulado y una dieta rica en fructosa”

Tesis que presenta:

M. en C. José Arturo Jiménez Chávez

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
en la Especialidad en Toxicología

Directores de tesis :

Dr. Olivier Christophe Barbier  
Departamento de Toxicología, Cinvestav

Dra. Andrea Marisa Gabriela De Vizcaya Ruiz  
Universidad de California Irvine

Ciudad de México

Mayo, 2023

## Resumen

Estudios epidemiológicos y en modelos experimentales en animales han mostrado que los efectos tóxicos inducidos (respuesta inflamatoria, estrés oxidante, modificación del sistema renina angiotensina aldosterona, RAS) por la exposición al material particulado menor a 2.5  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2.5}$ ) pueden estar asociados con el desarrollo de resistencia a la insulina (RI) y de enfermedades metabólicas (obesidad, síndrome metabólico, diabetes). Además, la actual pandemia de dietas ricas en carbohidratos y lípidos contribuyen en el desarrollo de estas enfermedades metabólicas. La exposición al  $\text{PM}_{2.5}$  y la creciente concentración en el consumo de carbohidratos (fructosa, glucosa, sacarosa) y lípidos en la dieta contribuyen en la generación de estrés oxidante y procesos inflamatorios en los humanos. Sin embargo, a pesar de las evidencias obtenidas aún no se ha comprendido la interacción entre estos dos factores, el  $\text{PM}_{2.5}$  y una dieta rica en fructosa (DRF), pueden modificar los diferentes mecanismos relacionados con la RI y las enfermedades metabólicas. Este trabajo investigó los cambios morfofisiológicos, bioquímicos y moleculares relacionados con la vía de la insulina que pueden llevar a la RI en un modelo *in vivo* después de la exposición a una DRF,  $\text{PM}_{2.5}$ , o la exposición combinada  $\text{PM}_{2.5}$  + DRF. Ratas macho Sprague Dawley fueron expuestas de manera subcrónica (8 semanas) a aire filtrado (AF),  $\text{PM}_{2.5}$ , aire filtrado y DRF o la combinación  $\text{PM}_{2.5}$  + DRF. Los resultados del análisis de los parámetros morfométricos no presentaron cambios entre los grupos de exposición a lo largo del estudio. A lo largo de la exposición subcrónica los grupos de  $\text{PM}_{2.5}$  o DRF no presentaron cambios importantes en los parámetros serológicos ni la expresión de proteínas. La exposición a  $\text{PM}_{2.5}$  + DRF mostró un incremento de la concentración de leptina, glucosa e insulina en suero durante varias semanas. El estado hiperinsulinémico que se presentó contribuyó al incremento del índice HOMA-IR. Esta exposición generó la disrupción de la vía de señalización de la insulina/AKT en pulmón, hígado y músculo esquelético por la modificación de la expresión de las proteínas IR- $\beta$ , IRS-p o AKT-p; un indicativo de la modificación en el transporte de glucosa en estos tejidos. Además, la expresión proteica del receptor tipo 1 de angiotensina ( $\text{AT}_1\text{R}$ ) se incrementó en pulmón e hígado; esta puede contribuir en la disrupción de la vía de la insulina en estos tejidos. Los tejidos sensibles a insulina, hígado y músculo esquelético

presentaron alteraciones histológicas y daño estructural; se observó la presencia de infiltrado celular en músculo esquelético, un indicativo de un proceso inflamatorio; y el daño del núcleo celular en los islotes de Langerhans en el páncreas. De manera conjunta, nuestros resultados muestran una RI sistémica en el grupo de la exposición combinada de PM<sub>2.5</sub> + DRF. La exposición continua al PM<sub>2.5</sub> en conjunto con una DRF podría contribuir al desarrollo de enfermedades metabólicas como el síndrome metabólico y la diabetes.

## **Abstract**

Insulin resistance (IR) and metabolic disorders (obesity, metabolic syndrome, diabetes) are non-pulmonary adverse effects induced by fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) exposure. The worldwide pandemic of high fructose sweeteners and fat rich modern diets, also contribute to IR development. Despite the existing evidence, the concomitant effect between these two factors, the PM<sub>2.5</sub> exposure and the fructose rich diet (FRD), have not been completely understood. We investigated some of the underlying effects of IR, altered biochemical insulin action and Insulin/AKT pathway biomarkers. Male Sprague Dawley rats were subchronically exposed to filtered air, PM<sub>2.5</sub>, a fructose rich diet (FRD), or PM<sub>2.5</sub> + FRD. Exposure to PM<sub>2.5</sub> or FRD alone did not induce metabolic changes. However, PM<sub>2.5</sub> + FRD induced leptin release, systemic hyperinsulinemia, and Insulin/AKT dysregulation in insulin-sensitive tissues preceded by altered AT<sub>1</sub>R levels. Histological damage in liver, skeletal muscle and white adipose tissue were observed because of the insulin pathway modification in these tissues and the hyperinsulinemia in the PM<sub>2.5</sub> + FRD co-exposure group. Also, increased HOMA-IR was observed in this group, our results indicate that the concomitant exposure to a ubiquitous environmental pollutant, such as PM<sub>2.5</sub>, and a metabolic disease risk factor, a FRD, can contribute to the metabolic disorder pandemic occurring in highly polluted locations.

Este proyecto fue realizado en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, y se llevó a cabo con el financiamiento del proyecto No. 286739 de la convocatoria CB-2016 del CONACyT; de igual forma el alumno José Arturo Jiménez Chávez estuvo apoyado por la beca de Doctorado No. 780827 del CONACyT.

## **Dedicatoria**

**Este trabajo va dedicado a todos aquellos quienes han sido parte de mi caminar en algún momento de mi vida y de mi carrera. Principalmente a mis padres, mis hermanos, y a mi familia.** A esa familia que he escogido a lo largo de mi vida y que va más allá de los lazos consanguíneos, porque siempre son, han sido y serán parte de mi caminar.

## **Agradecimientos.**

A Dios, por ser esa fuerza que mueve el universo y que nos deja fluir por este mundo trazando nuestro propio destino.

A la Dra. Andrea De Vizcaya Ruiz, gracias jefa por confiar en mí y por seguirlo haciendo a lo largo de todos estos años, por todas las experiencias, las oportunidades y los buenos momentos. Gracias por permitirme seguir siendo parte de su equipo y por todo lo que ha hecho por mí.

Al Dr. Olivier Christophe Barbier, gracias doc por haber tomado este reto desde el inicio como mi asesor y ahora como mi tutor. Gracias por siempre estar al pendiente, por todos sus consejos y sus aportaciones a este trabajo.

A mis asesores de tesis, Dra. Patricia Segura, Dra. Angélica Rueda, Dra. Luz María del Razo y Dr. Gamaliel Aztatzi, por formar parte de este proyecto de tesis con su comentarios y sugerencias, sus correcciones. Por siempre buscar la mejora de este proyecto desde su experiencia. Gracias por hacer de este trabajo de tesis un trabajo más completo y con mejores resultados.

A mi familia, a mi madre, a mi padre, a mis hermanos, a mi abue, a mis tías. Porque a pesar de todas las tormentas, los retos y las adversidades han permanecido a mi lado cuidandome y buscando entender todas mis locuras. Gracias por estar aún a la distancia, pero siempre cuidandome, procurándome y protegiendome en todo momento.

A la Bióloga Teresa Marisela Uribe Ramírez, por su apoyo en el manejo de los animales, las técnicas de inmunodetección, las cirugías de los animales de experimentación y la determinación de los parámetros morfométricos. Gracias jefa Mary por siempre apoyarme en todas las técnicas del laboratorio, por procurarme en todo momento tanto en mi vida como en mi trabajo académico. Gracias por tus

consejos, enseñanzas y sugerencias que me ayudaron a crecer y mejorar como investigador y como ser humano.

Al Dr. Russell Morales y la Dra. Aidee Solorio por el apoyo en la realización de las técnicas de laboratorio, por contribuir al desarrollo de este proyecto y por transmitirme sus conocimientos en la ciencia.

Al tecnico de laboratorio Angel Barrera Hernández por su apoyo en la extracción y la determinación de los componentes inorgánicos en el material particulado.

A mis amigos de Toxicología Andrea, Gerardo, Nadia, Sandra, Jonathan, Jazmín, Manolo, Cecy, Ross, Elvira, Christian, Russell, Andrés, Sol, Laura y Yadira. Gracias por hacer más llevadera mi estancia en Cinvestav, por apoyarme en todo momento con sus consejos. Gracias por todas las salidas, las fiestas, los momentos de reflexión y de diversión.

A mis asesores en la ciencia la Dra. Iliana Medina Ramírez, el Dr. Gerardo García Rivas y el Dr. Flemming R. Cassee. Gracias por haberme permitido ser parte de su laboratorio durante mis estancias, por permitirme generar nuevas experiencias y conocimientos, pero sobre todo por ser parte de mi desarrollo como científico y como ser humano.

Al Colegio de profesores del Departamento de Toxicología, agradezco sus enseñanzas a lo largo de mi estancia en el Departamento de Toxicología.

Al Cinvestav-IPN por permitirme seguir con mi desarrollo científico y académico dentro de sus instalaciones; por el acceso a la educación y al desarrollo de este proyecto de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante estos cuatro años que me permitió seguir desarrollandome y manteniendome durante este tiempo.

# ÍNDICE

Resumen .....	II
<i>Abstract</i> .....	IV
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Contaminación ambiental .....	1
1.2 Contaminación del aire .....	2
1.3 Material particulado (PM) .....	3
1.4 Los contaminantes del aire y el sistema respiratorio .....	4
1.5 Efecto del material particulado en el sistema respiratorio: estrés oxidante e inflamación .....	6
1.6 La diabetes y sus factores de riesgo .....	10
1.7 La vía de la insulina y su inhibición .....	11
1.8 Resistencia a la Insulina (RI) .....	14
1.9 La dieta rica en fructosa .....	15
1.10 El PM <sub>2.5</sub> , la DRF y el desarrollo de la resistencia a la insulina .....	18
1.11 Justificación. ....	21
1.12 Hipótesis. ....	21
1.13 Objetivo general. ....	21
1.14 Objetivos particulares. ....	22
<b>2. Materiales y métodos.....</b>	<b>23</b>
2.1 Diseño experimental.....	23
2.2 Animales y diseño experimental.....	24
2.3 Modelo de exposición.....	24
2.4 Modelo de dieta rica en fructosa (DRF).....	25
2.5 Determinación de algunos parámetros morfométricos en los animales. ....	26
2.6 Colección de tejidos. ....	26

2.7 Caracterización de la composición y concentración del PM <sub>2.5</sub> .....	26
2.8 Determinación de la concentración de endotoxina. ....	27
2.9 Determinación de los niveles séricos de diferentes marcadores pro-inflamatorios.....	28
2.10 Determinación de los niveles de glucosa, insulina y curva de tolerancia a la glucosa (CTG) .	29
2.11 Calculo de los valores de HOMA-IR y de HOMA-β.....	30
2.12 Cuantificación de los niveles de AT1R, IR-β, SRI-1, SRI-1p, AKT y AKT-p.....	30
2.13 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....	32
2.14 Análisis histológico. ....	32
2.15 Análisis estadístico.....	33
<b>3. Resultados .....</b>	<b>34</b>
3.1 Caracterización de la composición y concentración del PM <sub>2.5</sub> .....	34
3.2 Determinación de los efectos sistémicos del PM <sub>2.5</sub> + DRF. ....	38
3.3 Determinación de algunos parámetros morfométricos de los diferentes grupos de exposición. .....	38
3.4 Determinación de los niveles séricos de diferentes marcadores pro-inflamatorios.....	40
3.5 Determinación de los niveles de insulina, glucosa y la CTG. ....	42
3.6 Cálculo de los índices HOMA-IR y HOMA-β. ....	46
3.7 Determinación del efecto de hiperinsulinemia sobre la vía de la insulina/AKT en los tejidos sensibles a insulina.....	48
3.8 Determinación del daño estructural de los tejidos sensibles a insulina y el páncreas.....	53
<b>4. Discusiones .....</b>	<b>61</b>
4.1 Caracterización de la composición del PM <sub>2.5</sub> .....	61
4.2 Efecto en el metabolismo de los componentes del PM <sub>2.5</sub> .....	63
4.3 Efecto del modelo de dieta rica en fructosa (DRF) .....	64
4.4 Efecto de la exposición combinada de PM <sub>2.5</sub> + DRF sobre los parámetros morfométricos. ....	65

4.5 Efecto de la exposición combinada de PM <sub>2.5</sub> + DRF sobre algunos marcadores pro-inflamatorios. ....	66
4.6 Efecto de la exposición combinada de PM <sub>2.5</sub> + DRF sobre los niveles de glucosa e insulina ...	67
4.7 Modificación de los valores de HOMA-IR por la exposición combinada de PM <sub>2.5</sub> + DRF .....	68
4.8 Modificación de la vía de la insulina/AKT por la exposición combinada de PM <sub>2.5</sub> + DRF .....	69
4.9 Daño estructural de los tejidos sensibles a insulina y el páncreas por la exposición combinada de PM <sub>2.5</sub> + DRF.....	70
5. Conclusiones.....	73
6. Perspectivas.....	75
7. Referencias .....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Depósito de las partículas en el sistema respiratorio de acuerdo con su diámetro aerodinámico. ....	6
Figura 2. Activación de la vía de PI3K por la interacción de la Ins con su receptor. ....	13
Figura 3. La dieta rica en fructosa y sus efectos. ....	17
Figura 4. Diseño experimental de la evaluación de las partículas.....	22
Figura 5. Esquema de exposición a PM <sub>2.5</sub> y/o una DRF.....	25
Figura 6. Diseño experimental de las técnicas de laboratorio empleadas. ....	23
Figura 7. Determinación de los niveles séricos de algunos marcadores pro-inflamatorios en los grupos de exposición.....	41
Figura 8. Determinación de los niveles de insulina y glucosa durante varias semanas en los grupos de exposición. ....	43
Figura 9. Determinación de la curva de tolerancia a la glucosa en los grupos de exposición. ....	45
Figura 10. Cálculo de los valores de HOMA-IR y HOMA-β en los grupos de exposición. ....	47

<b>Figura 11. Determinación de la modificación de la vía de la insulina/AKT en el pulmón de los grupos de exposición. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 12. Determinación de la modificación de la vía de la insulina/AKT en el hígado de los grupos de exposición.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 13. Determinación de la modificación de la vía de la insulina/AKT en el músculo de los grupos de exposición.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 14. Determinación de la modificación de la vía de la insulina/AKT en el tejido graso de los grupos de exposición.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 15. Análisis de la estructura del hígado de los grupos de exposición. ..</b>	<b>54</b>
<b>Figura 16. Análisis de la estructura del músculo esquelético de los grupos de exposición. ....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 17. Análisis de la estructura del tejido graso de los grupos de exposición. ....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 18. Análisis de la estructura del páncreas de los grupos de exposición. ....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 19. Análisis de la estructura de los islotes d Langerhans de los grupos de exposición. ....</b>	<b>59</b>

## **ÍNDICE DE TABLAS.**

<b>Tabla 1 Efectos adversos de los contaminantes particulados sobre diferentes modelos biológicos. ....</b>	<b>8</b>
<b>Tabla 2 Efecto del material particulado sobre el metabolismo. ....</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 3 Anticuerpos utilizados para su identificación por western blot.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabla 4 Determinación de la concentración de partículas durante las semanas de exposición. ....</b>	<b>34</b>
<b>Tabla 5 Composición elemental y concentración de endotoxina en el PM<sub>2.5</sub>.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 6 Componentes orgánicos en el PM<sub>2.5</sub> .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 7 Medición de la curvatura de los animales. ....</b>	<b>38</b>
<b>Tabla 8 Medición de la longitud de los animales. ....</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 9 Medición del peso de los animales. ....</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 10 Determinaciones morfométricas de los animales. ....</b>	<b>40</b>

## Lista de abreviaturas y acrónimos.

**SRAA** Sistema renina angiotensina aldosterona

**PM<sub>2.5</sub>** Material particulado menor a 2.5  $\mu\text{m}$

**RI** Resistencia a la insulina

**DRF** Dieta rica en fructosa

**HOMA-IR** Homeostatic model assessment of insulin resistance index, del inglés

**HOMA- $\beta$**  Homeostatic model assessment of  $\beta$ -cells function, del inglés

**IR- $\beta$**  Porción  $\beta$  del receptor a insulina

**IRS** Sustrato del receptor a insulina

**IRS-p** Sustrato del receptor a insulina fosforilado

**AKT** Proteína cinasas B

**AKT-p** Proteína cinasas B fosforilada

**AT<sub>1</sub>R** Receptor tipo 1 a angiteinsina II

**AT<sub>2</sub>R** Receptor tipo 2 a angiteinsina II

**OMS** organización Mundial de la Salud

**PM** Material particulado

**O<sub>3</sub>** Ozono

**CO** Monóxido de carbono

**SO** Óxidos de azufre

**NO** Óxidos de nitrógeno

**EPOC** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**PM<sub>10</sub>** Material particulado menor a 10 micrómetros

**PUF** Partículas ultrafinas

**HO** Hemoxigenasa

**GSH** Glutación reducido

**SOD** Superóxido dismutasa

**Acta1** Alfa actina 1

**Col3a1** Colágeno tipo III

**HbA1c** Hemoglobina glicosilada

**S/D** Sistólica/diastólica

**IRR**, tasa de incidencia

**Nrf2** Factor relacionado al factor eritroide 2

**GST** Glutación total

**MCP-2** Proteína quimiotáctica de monocitos 2

**ACE** Enzima convertidora de angiotensina

**LBA** Lavado bronqueo-alveolar

**Ins** Insulina

**RIns** Receptor a insulina

**GLUT 4** transportador de glucosa 4

**PI3K** Fosfatidlinositol 3-cinasa

**MAPK** Vía de las cinasas activada por mitógenos

**PI4-P** Fosfatidil inositol 4 fosfato

**PI4,5P<sub>2</sub>** Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato

**PIP<sub>2</sub>** Fosfatidil inositol 3,4 bisfosfato

**PIP<sub>3</sub>** Fosfatidil inositol 3,4,5 trisfosfato

**PDK1** Cinasa dependiente de fosfoinositidina 1

**PDK2** Cinasa dependiente de fosfoinositidina 1

**IL** Interleucina

**TNF** Factor de necrosis tumoral

**Ang II** Angeotensina II

**GLUT 2** Transportador de glucosa 2

**GLUT 5** Transportador de glucosa 2

**KHK** Cetohehexocinasa

**ALDOB** Aldolasa B

**Acetil-CoA** Acetil co-enzima A

**AST** Aspartato aminotransferasa

**ALT** Alanina aminotransferasa

**CAT** Catalasa

**JNK** Cinasa c-Jun n-terminal

**Apo B** Apolipoproteína B

**MCP-1** Proteína quimiotáctica de monocitos 1

**STAT3** Transductor de señales y activador de transcripción 3

**SOCS3** Supresor de señalización de citocinas 3

**CTG** Curva de tolerancia a la glucosa

**UPEAL** Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio

**VACES** Sistema versátil de enriquecimiento de la concentración de aerosoles

**LETI** Laboratorio experimental de Toxicología Inhalatoria

**IMC** índice de masa corporal

**TBS** Solución buffer Tris

**PAI-1** Inhibidor del activador de plasmalógeno 1

**EEM** Error estándar de la media

## **1. Introducción.**

### **1.1 Contaminación ambiental**

La contaminación ambiental es definida cómo la presencia de componentes químicos, físicos y biológicos del sistema tierra/atmósfera hasta tal punto que los procesos ambientales normales se ven afectados de manera negativa. Los contaminantes pueden ser sustancias que se presentan de manera natural, pero que llegan a exceder sus niveles normales, o pueden ser producidos por la actividad del hombre, en cuyo caso la naturaleza no es capaz de procesar o neutralizar el daño causado por esta (Muralikrishna y Manickam, 2017). La urbanización y la industrialización, junto con el desarrollo económico han llevado a un aumento en el consumo de energías y la descarga de desechos en el ambiente (Kelishadi y Poursafa, 2010).

Los contaminantes ambientales han sido asociados con múltiples efectos adversos en la salud, de entre los que destacan los trastornos perinatales, mortalidad infantil, enfermedades respiratorias, alergias, problemas cardiovasculares, aumento del estrés oxidante, disfunción endotelial, entre otros (Kelishadi, 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha determinado que cada año la exposición a contaminantes ambientales (contaminación del aire, humo de segunda mano, agua contaminada, falta de sanidad e higiene) causa la muerte de 1.7 millones de niños menores de 5 años (el 26% del total de muertes en este sector de la población), así como la muerte de 4.9 millones de adultos mayores (de entre 50 a 75 años). Este problema en general lleva a la muerte de 12.6 millones de individuos, el 23% de las muertes en el mundo cada año (WHO, 2018).

Se ha reportado que más del 50% de las muertes causadas por la contaminación son debido a los contaminantes presentes en el aire, además de ser una de las principales causas de enfermedades no transmisibles a nivel mundial (WHO, 2018). Dado lo anterior, es fundamental estudiar los efectos de los contaminantes sobre la salud, principalmente de aquellos presentes en el aire, investigando a fondo los mecanismos por los cuales estos inducen el desarrollo de diferentes enfermedades.

## 1.2 Contaminación del aire

Se ha definido a la contaminación del aire como una mezcla de partículas sólidas y líquidas y gases presentes en este. De todos los contaminantes del aire, los más comunes y persistentes son el material particulado (PM), el ozono a nivel del suelo ( $O_3$ ), el monóxido de carbono (CO), los óxidos de azufre (SO), los óxidos de nitrógeno (NO) y el plomo (Pb) (Kelishadi y Poursafa, 2010).

Los contaminantes del aire pueden tener varias clasificaciones. Dependiendo de su fuente de emisión o de los cambios que se pueden presentar en estos al estar en contacto con el ambiente pueden ser clasificados como contaminantes primarios o secundarios. Se considera a un contaminante como primario cuando es emitido directamente desde la fuente, y se mezclan con el aire de la troposfera. Algunos de estos contaminantes primarios pueden interactuar entre ellos o con la radiación solar en reacciones químicas o fotoquímicas y formar nuevos contaminantes, los cuales son conocidos como contaminantes secundarios (Muralikrishna & Manickam, 2017).

Se ha determinado que la contaminación del aire es la principal causa de muerte en el mundo. Los efectos en la salud de este tipo de contaminación van desde el aumento en las admisiones de pacientes a los hospitales y visitas a las salas de emergencia hasta un aumento en las muertes. Se estima que 7 millones de muertes prematuras al año están asociadas a la contaminación del aire y provoca la pérdida de otros tantos más millones de años de vida saludable. Estas muertes asociadas principalmente por enfermedades del corazón, infartos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cáncer de pulmón e infecciones respiratorias agudas en niños (“WHO,” 2022). Además, la contaminación del aire se ha asociado con daños en el metabolismo como la hiperleptinemia y la resistencia a la insulina, o enfermedades metabólicas como la diabetes, obesidad y el síndrome metabólico (Schraufnagel et al., 2019a)

De los contaminantes criterio presentes en el aire, el PM ha sido asociado a los mayores efectos de morbilidad y mortalidad en los seres humanos. Las concentraciones altas de este contaminante en las ciudades densamente pobladas generan grandes problemas de salud, pero también problemas económicos (Bowe et al., 2018; Schraufnagel et al., 2019b). A nivel mundial, de acuerdo con la carga mundial de enfermedades, se estima que en 2015 y 2019, 4.2 millones de muertes y 4.1

millones de muertes son atribuibles al material particulado menor a 2.5 micras (PM<sub>2.5</sub>), respectivamente; además de generar 103.1 millones de años de vida ajustados por discapacidad en 2015, y 118 millones de años de vida ajustados por discapacidad en 2019 (Cohen et al., 2017; Sang et al., 2022). En México, el PM<sub>2.5</sub> se ha asociado a la muerte de 14,666 personas durante 2015, llevando a pérdidas económicas de más de 14,000 millones de dólares (Trejo-González et al., 2019). Específicamente, en la Ciudad de México, considerada una de las ciudades más contaminadas en México, se ha determinado desde 2014 que el PM<sub>2.5</sub> causa alrededor de 8000 muertes al año (SEMARNAT, 2021). Además de las muertes que este contaminante puede causar, actualmente la evidencia científica ha demostrado fuertes asociaciones entre el PM<sub>2.5</sub> y diferentes enfermedades metabólicas como obesidad, síndrome metabólico y diabetes, que además de afectar la calidad de vida de las personas contribuyen a grandes pérdidas económicas hasta el momento no cuantificadas para México (Kobos & Shannahan, 2021; Zhang et al., 2018). Como ejemplo, en Estados Unidos, el costo estimado total de los diagnosticados con diabetes en 2017 fue de 327,000 millones de dólares, incluyendo 237,000 millones de dólares en gastos médicos directos y 90,000 millones de dólares en productividad reducida (Yang et al., 2018). El continuar estudiando a estos contaminantes, y específicamente al PM, no sólo contribuye a saber más acerca de sus efectos en los seres humanos (morbilidad y mortalidad), la búsqueda de alternativas para disminuir la generación de estos contaminantes, los costos altos que estos generan y a la mejora de la calidad de vida de la población general.

### **1.3 Material particulado (PM)**

El PM es una mezcla de partículas sólidas y líquidas (aerosoles) en el aire, que consisten en una gran variedad de componentes. El origen o fuentes de emisión de estas partículas pueden ser naturales como incendios forestales, erosión de suelos, re-suspensión de polvo, entre otros; o como resultado de actividades humanas tales como las emisiones derivadas de la quema de combustibles fósiles por vehículos, plantas de poder e industrias (Adams, *et al.*, 2015). Estas partículas pueden ser inertes o extremadamente reactivas dependiendo de su composición, y presentan un tamaño que va desde los 100 µm hasta los 0.1 µm o menores (Muralikrishna & Manickam,

2017). El PM puede ser clasificado de acuerdo a su tamaño como  $PM_{10}$  (partículas  $\leq 10 \mu m$ ), partículas finas o  $PM_{2.5}$  ( $\leq 2.5 \mu m$ ) y partículas ultra finas o PUF ( $\leq 0.1 \mu m$ ) (Rai, 2016b).

Los componentes principales del PM incluyen metales, compuestos orgánicos, material carbonoso inorgánico, iones sulfato, nitrato, amonio, entre otros. Esta composición puede variar de acuerdo con el tamaño del PM; el  $PM_{10}$  consiste principalmente de una corteza de minerales, materiales biológicos (polen, hongos, endotoxina y bacterias) y sales de mar; mientras que, el  $PM_{2.5}$  está compuesto de un núcleo de carbono, hidrocarburos y partículas secundarias formadas de óxidos de azufre y nitrógeno (Adams et al., 2015); además de componentes biológicos como bioaerosoles, bacterias, hongos y endotoxinas (Ramli et al., 2020). El tiempo de vida del PM puede variar desde unos segundos a algunos meses; esto depende de su tasa de sedimentación, tamaño, la densidad de las partículas y la turbulencia de las corrientes de aire (Miller, 2006). De igual forma, dependiendo de su tamaño y las características meteorológicas, el PM puede ser transportado a lo largo de varios kilómetros desde la fuente de emisión (Popek et al., 2015).

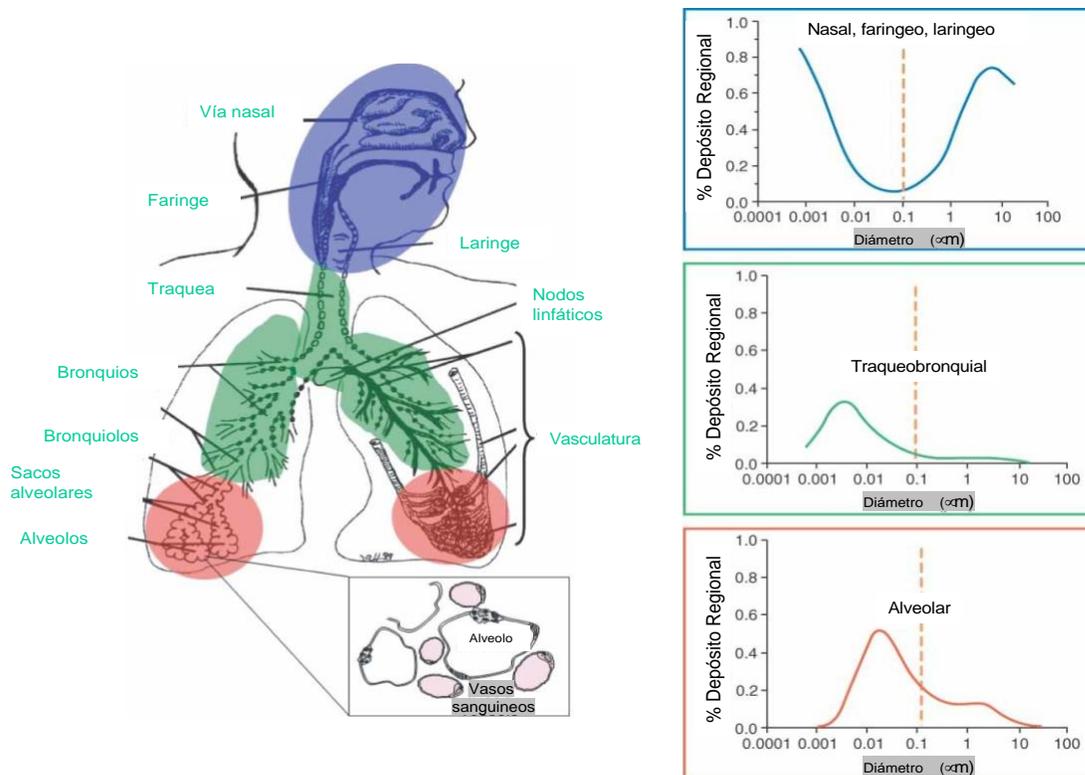
#### **1.4 Los contaminantes del aire y el aparato respiratorio**

Las principales vías de entrada del  $PM_{2.5}$  al organismo son tres; la vía inhalatoria, la ingesta por el tracto gastrointestinal y el depósito en la piel (Elder et al., 2009). Dependiendo de algunas características fisicoquímicas de este contaminante como su tamaño, pueden permanecer por un tiempo indefinido en el aire, entre más pequeño es el diámetro de la partículas, más tiempo permanecen estas suspendidas en el aire (Rai et al., 2016a), y por tanto es más fácil que estas ingresen por la vía inhalatoria.

El sistema respiratorio se puede dividir en vías aéreas altas, y vías aéreas bajas. La transición entre estas dos secciones se localiza donde las vías del sistema respiratorio y el digestivo se diferencian, y es justo en el inicio de la laringe. Las vías aéreas altas están formadas por la nariz y las cavidades paranasales, la faringe y parte de la cavidad oral. Las vías aéreas bajas consisten en la laringe, la tráquea, el tallo bronquial y todas las vías aéreas que se ramifican extensamente dentro de los pulmones, como los bronquios intrapulmonares, los bronquiolos y los ductos alveolares (Rogers et al.,

2011). Los alveolos son las unidades respiratorias terminales que se encuentran en el pulmón con un diámetro aproximado de 200 – 300  $\mu\text{m}$  en los humanos. Los neumocitos tipo I, neumocitos tipo II y los fibroblastos, y algunas células inmunes (células plasmáticas, linfocitos y células fagocíticas) son los principales tipos celulares alveolares. Los fibroblastos son el principal grupo involucrado en la síntesis de la matriz extracelular, los mecanismos de reparación y contribuyen al mantenimiento de la funcionalidad de los neumocitos tipo II (Nandkumar et al., 2015). Los neumocitos tipo I componen el 95% de la superficie alveolar; son células marcadamente diferenciadas que poseen algunos organelos y dado su grosor (0.1 – 0.5  $\mu\text{m}$ ) proveen una barrera trivial para el intercambio de gases. Los neumocitos tipo II presentan una forma cúbica y ocupan el 5% de la superficie del alveolo; son los encargados de mantener la homeostasis del espacio alveolar, secretar el surfactante pulmonar y son precursores de los neumocitos tipo I (Ochs & O’Brodvich, 2012).

Al ser inhalado, el PM puede ser transportado y depositado a lo largo del tracto respiratorio, desde las vías aéreas superiores hasta los alveolos por medio de difusión, en el caso de las PUF, e impactación, choque, y sedimentación en el caso del  $\text{PM}_{2.5}$  (Oberdörster et al., 2005). Este PM puede depositarse a lo largo de las regiones extra e intratorácicas (Geiser & Kreyling, 2010). En la Figura 1 se muestra el porcentaje de depósito y las regiones del sistema respiratorio donde se depositan las partículas con base en su diámetro aerodinámico.



(Modificado de Oberdörster et al., 2005).

**Figura 1. Depósito de las partículas en el sistema respiratorio de acuerdo con su diámetro aerodinámico.**

Estudios de la exposición al PM utilizando modelos biológicos *in vitro*, *in vivo* y de efectos adversos en poblaciones humanas han mostrado el poder oxidante e inflamatorio de estas partículas en el sistema cardiopulmonar, efectos que pueden llevar a diferentes daños locales, pero también a efectos sistémicos, los cuales requieren ser estudiados a profundidad debido a la implicación que esto tiene en la salud pública.

### **1.5 Efecto del material particulado en el sistema respiratorio: estrés oxidante e inflamación**

Diferentes efectos tóxicos sobre los modelos biológicos han sido observados por la exposición al PM<sub>2.5</sub> o PUF en el sistema cardio respiratorio. Estudios epidemiológicos han mostrado la asociación entre los niveles ambientales del PM<sub>2.5</sub> y el aumento en los síntomas de rinitis y asma, así como en el posible aumento de la inflamación

alérgica y el desarrollo de respuestas inmunes alérgicas (Rai et al., 2016a). Entre sus efectos, referente al PM proveniente de emisiones vehiculares (notablemente la fracción fina ( $\leq 2.5 \mu\text{m}$  de tamaño aerodinámico) y la ultrafina ( $\leq 0.1 \mu\text{m}$  de tamaño aerodinámico)), ha sido asociado específicamente a efectos como estrés oxidante, daño a la mitocondria, peroxidación de lípidos, incremento en los niveles de los genes relevantes en la inflamación cardiovascular y aterosclerosis temprana (Akhtar et al., 2014; Hill et al., 2021; Li et al., 2008; Wan et al., 2019) La Tabla 1 muestra algunas de las investigaciones realizadas del PM y los efectos observados utilizando distintos modelos biológicos y estudios en poblaciones expuestas.

**Tabla 1. Efectos adversos de la exposición al PM sobre diferentes modelos biológicos.**

Contaminante	Modelo biológico	Efectos		
		Actividad antioxidante	Inflamación	Otros
PM <sub>10</sub> , PM <sub>2.5</sub> , PM <sub>0.2</sub> 10, 50, 100 µg/mL 4 h (Akhtar et al., 2014)	Células A549	Incremento de ARNm HO-1.	Incremento de ARNm IL-8.	
PM <sub>2.5</sub> 1,10,100,200,400 µg/mL 48 h (Y. Chen et al., 2018)	Células A549	Incremento en los niveles de ERO, GSH y SOD.	Liberación de TNF-α e IL-6.	
PM <sub>10</sub> , PM <sub>2.5</sub> , PUF 32, 178, 107 µg/m <sup>3</sup> 3 días, 8 sem (Aztatzi-Aguilar et al., 2015)	Ratas Sprague Dawley (macho)	Disminución de HO-1 en pulmón y corazón.	Incremento de IL-6 en corazón (PM <sub>2.5</sub> y PUF). Incremento de AT <sub>1</sub> R en pulmón y corazón.	Aumento ARNm Acta1 y Col3a1 en corazón
PM <sub>2.5</sub> 375 µg/m <sup>3</sup> 8 sem (Aztatzi-Aguilar et al., 2016)	Ratas Sprague Dawley (macho)		Incremento de AT1R y ACE.	Incremento de la presión arterial en varias semanas. Incremento de los marcadores de daño renal temprano.
PM <sub>10</sub> , PM <sub>2.5</sub> , PUF 32, 178, 107 µg/m <sup>3</sup>	Ratas Sprague Dawley (macho)	Incremento de HO-1, SOD-2, GST en pulmón.	Incremento de IL-1β, IL-6 y MCP-2 en LBA.	

3 días, 8 sem (Aztatzi-Aguilar et al., 2018)			Traslocación nuclear Nrf2 en pulmón y aorta.	
PUF 400 µg /kg (Morales-Rubio et al., 2019)	Ratones C57BL/6J pun/pun <i>In utero</i>		Aumento en los mediadores de inflamación (madre, placenta, feto). Incremento de nivel de ACE y AT1R en feto y crías.	Incremento de la presión arterial crías.
PM <sub>10</sub> , PM <sub>2.5</sub> 67.84, 35.3 µg/m <sup>3</sup> 1 año (Chuang et al., 2011)	Hombres y mujeres 54–90 años		Incremento de neutrófilos por PM <sub>2.5</sub> .	Aumento de colesterol total, glucosa en ayunas, HbA1c y presión S/D por PM <sub>2.5</sub>
PM <sub>2.5</sub> 20.7 µg/m <sup>3</sup> 10 años (Coogan et al., 2012)	Mujeres afroamericanas 21–69 años			531 casos incidentes de hipertensión (IRR 1.48) 183 casos incidentes de diabetes tipo II (IRR 1.63)

\* Abreviaturas. HO, hemoxigenasa; IL, interleucina; TNF, factor de necrosis tumoral; ERO, especies reactivas de oxígeno; GSH, glutatión reducido; SOD, superóxido dismutasa; Ang II, angiotensina II; AT1R, receptor 1 a angiotensina II; Acta1, alfa actina 1; Col3a1, colágeno tipo III; HbA1c, hemoglobina glicosilada; S/D, sistólica/diastólica; IRR, tasa de incidencia; Nrf2, factor relacionado al factor eritroide 2; GST, glutatión total, MCP-2, proteína quimiotáctica de monocitos 2 ; ACE, enzima convertidora de angiotensina; LBA, lavado bronqueo-alveolar .

Cómo se observa en la Tabla 1, los efectos causales más comúnmente identificados por la exposición a partículas atmosféricas son la producción de estrés oxidante e inflamación en el sistema cardiopulmonar. Estos efectos pueden translocarse desde el sistema respiratorio hacia torrente sanguíneo, provocando efectos sistémicos (Aztatzi-Aguilar et al., 2016; Morales-Rubio et al., 2019). El daño oxidante e inflamatorio, además de causar daño sobre los tejidos, puede inducir diferentes efectos sobre el metabolismo. Actualmente, se ha observado que el aumento de ciertas citocinas inflamatorias (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) y de las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden generar resistencia a la insulina (RI) en tejidos sensibles a la insulina (Ins) y de manera sistémica, dado por la acción de estos sobre diferentes receptores y por la estimulación de vías de señalización.

Ha sido demostrado que las partículas más pequeñas contenidas dentro del PM<sub>2.5</sub> y los efectos generados por este PM (ERO, marcadores inflamatorios, entre otros) en los alveolos son capaces de ser traslocados e incorporarse al torrente sanguíneo (Qvarfordt, Anderson, Sanchez-Crespo, Diakopoulou, & Svartengren, 2022).

### **1.6 La diabetes**

La diabetes es definida cómo una afección crónica que se produce cuando se presentan niveles elevados de glucosa en sangre debido a que el organismo la deja de producir, no produce concentraciones suficientes de Ins, o no logra utilizar esta hormona de manera normal (a lo que se le denomina RI)(Diabetes, 2010). En México es la segunda causa de muerte, y se estima que alrededor del 15.8% de la población presenta esta enfermedad, de los cuales el 36% desconoce que presenta esta condición (“ENSANUT 2021,” 2021); sin embargo, los datos de la International Diabetes Federation estima que alrededor de 14.1 millones de mexicanos han desarrollado esta enfermedad, presentando una prevalencia de diabetes en México del 16.9% (FEDERATION, 2021). Es importante además considerar los inconvenientes y las complicaciones que esta enfermedad puede causar, el tratamiento y atención de esta enfermedad generan gastos importantes al sector salud y a quien lo padece (Arredondo & De Icaza, 2011). Diferentes investigaciones han asociado el incremento de esta enfermedad con la exposición a contaminantes

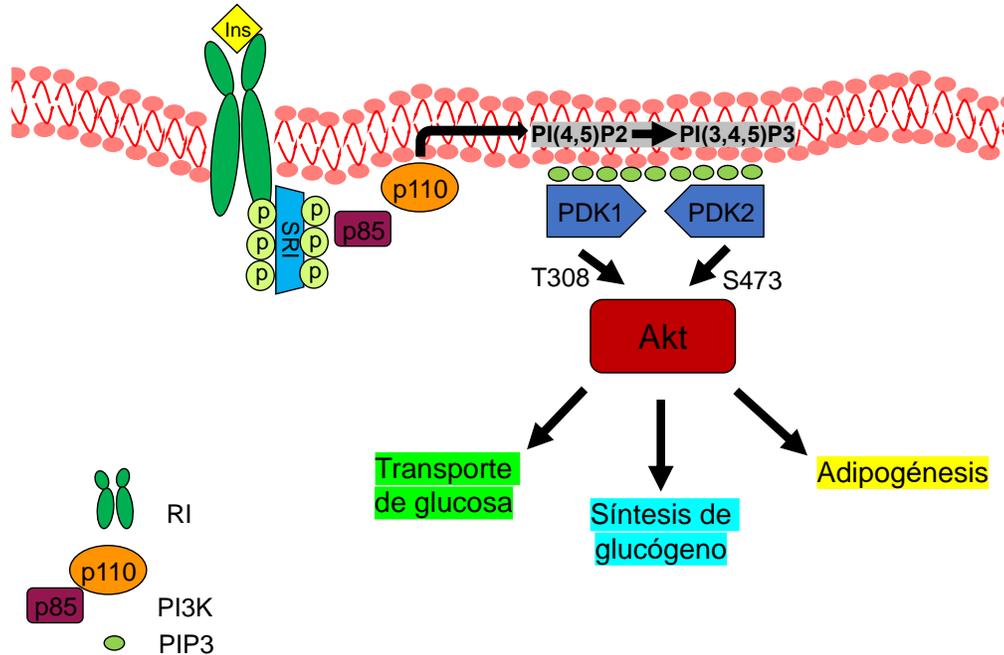
ambientales, como lo es el PM (Sang et al., 2022; Schraufnagel et al., 2019a); sin embargo, el mecanismo por el cual los factores ambientales pueden contribuir con la incidencia de esa enfermedad es desconocido. Uno de los mecanismos propuestos es la inhibición de la vía de la Ins, la cual se encarga principalmente del metabolismo de glucosa y de algunas macromoléculas. La inhibición de esta vía puede llevar a la RI en los tejidos sensibles a Ins, y por tanto favorecer al desarrollo de la diabetes.

### **1.7 La vía de la insulina y su inhibición**

La Ins es un polipéptido de 5.8 kDa en el ser humano, y es sintetizada como preinsulina en las células  $\beta$  pancreáticas. Dentro de la célula, en el retículo endoplásmico, esta proteína es procesada a proinsulina para ser transportada posteriormente a la red trans-Golgi donde gránulos inmaduros de esta son formados; a través de las endopeptidasas, la proinsulina es escindida para dar lugar a la Ins, la cual es empaquetada en gránulos maduros en el citoplasma a la espera de señales metabólicas (Najjar et al., 2003). La Ins, mantiene las concentraciones normales de glucosa en la sangre al facilitar el transporte celular de glucosa mediante la translocación de vesículas con el transportador de glucosa 4 (GLUT4) a la membrana plasmática (Arora et al., 2012), regula el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas y promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos (Wilcox et al., 2007).

Una vez que la Ins es sintetizada, esta es transportada y distribuida por el torrente sanguíneo para actuar sobre los tejidos sensibles a la Ins como hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. La acción de la Ins es iniciada por su interacción con el receptor de insulina (RIns), una proteína heterotetrámerica formado por dos unidades  $\alpha$  y dos unidades  $\beta$  que están unidas por puentes disulfuro. La unión de la Ins al RIns lleva a una serie de transfosforilaciones intramoleculares, donde una de las subunidades  $\beta$  fosforila su subunidad adyacente. Una vez que la tirosina cinasa de RIns es activada, promueve la autofosforilación en la subunidad  $\beta$  de tres de sus residuos de tirosina (Tyr-1158, Tyr-1162, Tyr-1163), para amplificar su actividad cinasa. Posterior a su activación, este receptor es capaz de reclutar diferentes sustratos como a la familia de proteínas del sustrato del receptor de insulina (SRI) (Arora et al., 2012).

Existen dos vías que propagan la señal generada por la acción de la Ins; la vía de la fosfatidlinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Estas vías regulan la mayoría de las acciones de la Ins asociadas al metabolismo, la expresión genética y los efectos mitogénicos (Najjar et al., 2003). De estas vías, la vía de PI3K es el principal mecanismo por el que se ejerce el efecto de la Ins en el metabolismo de glucosa y lípidos. Esta vía se inicia con el RIns activo y su interacción con el SRI que lleva a la fosforilación de este último; el SRI interactúa a su vez con la PI3K activándola y dada la cercanía de su subunidad p110 a sus posibles sustratos PI4-P (fosfatidil inositol 4 fosfato) y PI4,5P<sub>2</sub> (fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato), estos pueden ser fosforilados en la posición 3 del inositol para formar PIP<sub>2</sub> (PI 3,4 bisfosfato) y PIP<sub>3</sub> (PI 3,4,5 trisfosfato). Una vez formado PIP<sub>3</sub>, este sirve como punto de anclaje para PDK1 y AKT o proteína cinasa B (Akt/PKB); PDK2 es reclutado y es capaz de fosforilar a AKT en la S474, mientras que PDK1 fosforila a AKT en la T308 activándolo (Figura 2). Una vez activada AKT, es capaz de regular varios de los efectos metabólicos a través de la fosforilación de un gran número de sustratos como la enzima glucógeno sintasa, la glucógeno sintasa cinasa 3, entre otras (Olivares & Arellano, 2008).



**Figura 2. Activación de la vía de PI3K por la interacción de la Ins con su receptor.**

Esta activación permite el aumento en la síntesis de glucógeno, la captación de glucosa desde el exterior de la célula, la adipogénesis, entre otras (Modificado de Olivares y Arellano, 2008).

La regulación de la señalización de la Ins es mediada por la endocitosis rápida del receptor o su degradación por la unión de la Ins al receptor. La acción de la Ins puede ser regulada por fosfatasa de tirosina que desfosforilan los residuos de tirosina de la unidad  $\beta$  del receptor, o por serina/treonina cinasas que regulan la actividad tirosina cinasa. El secuestro de los receptores de insulina o la disminución del número de receptores en la superficie de la membrana también se han asociado con la disminución de la actividad de la insulina (Najjar et al., 2003).

En ciertos casos, cuando se presentan concentraciones normales o elevadas de la Ins, puede existir una respuesta atenuada a este estímulo, causando niveles de glucosa elevados en el exterior de la célula, en parte dados por la deficiencia en la expresión/translocación de GLUT4; este fenómeno es conocido como RI (Wilcox et al., 2007). Diversos factores tanto a nivel del RIns, las vías de señalización subyacente a este receptor, así como por el daño a los organelos pueden llevar a la RI. De estos factores se pueden destacar: el estrés al retículo endoplásmico (RE), que lleva a un incremento del proceso inflamatorio; la disfunción mitocondria, que tras la falla de este

organelo, existe un mayor número de ácidos grasos insaturados y sus precursores los cuales directamente pueden llevar a la RI; el proceso inflamatorio, que mediante la liberación de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), las interleucinas 6, 8, 1 $\beta$  y 18 (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-18), la resistina y la angiotensina II (Ang II) participan en las vías de señalización que culminan en la RI (Gutiérrez-Rodelo et al., 2017).

Uno de los mecanismos cada vez más estudiados sobre la RI, es aquel producido por la angiotensina II (Ang II). Se ha demostrado que la Ang II inhibe la señalización de la Ins a través de la vía PI3K/AKT, llevando a la inhibición del transporte de glucosa producido por la Ins; esto mediante un aumento de la producción de ERO, procesos inflamatorios y la activación de la vía de señalización de las Rho cinasas (Sowers et al., 2004). El efecto ejercido sobre la actividad de la Ins por parte de la Ang II comienza mediante la unión de esta a su receptor. Se ha detectado que existen dos tipos de receptor a Ang II conocidos como receptor tipo 1 de angiotensina II (AT<sub>1</sub>R) y receptor tipo 2 de angiotensina II (AT<sub>2</sub>R). Los efectos vasoconstrictores y antagonistas de la Ang II han sido asociados a su unión con el AT<sub>1</sub>R (Guthrie et al., 1995). Una vez habiéndose presentado la unión de la Ang II y el AT<sub>1</sub>R, se puede desencadenar la vía de las Rho cinasas o de otras pequeñas GTPasas asociadas a este receptor.

A pesar de que los posibles mecanismos que llevan a la inhibición de la vía de la Ins, la RI y sus efectos sistémicos aún existen muchos vacíos con respecto a cómo se pueden generar esta condición y la inhibición de su vía.

### **1.8 Resistencia a la Insulina (RI)**

La RI se define como la habilidad reducida de la insulina para disminuir las concentraciones de glucosa sanguínea (Brierley & Semple, 2021). Diferentes factores se han asociado a la RI, como se mencionó, el incremento de la inflamación, el estrés oxidante, y la activación del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) son algunos de los factores que pueden contribuir al desarrollo de la RI (Rehman & Akash, 2016). En un primer momento, diferentes proteínas relacionadas con estas vías y sistemas (estrés oxidante, inflamación, SRAA) son capaces de inhibir a las proteínas de la vía de la insulina (SRI, AKT, entre otras). La inhibición de esta vía en los tejidos

sensibles a insulina lleva a la disminución en la captación de glucosa y su metabolismo, así como al aumento en bajo grado de la inflamación en los tejidos sensibles a la Ins. Este efecto en la inhibición de la captación de glucosa lleva al incremento en la síntesis de insulina en el páncreas como un método compensatorio para favorecer la captación de glucosa.

El incremento de la Ins de manera sistémica produce un incremento en la captación de glucosa por parte del hígado y el músculo esquelético principalmente. Este aumento en la actividad de la vía de la Ins puede generar el desgaste del músculo esquelético (Egerman & Glass, 2014).

A largo plazo, el efecto compensatorio del incremento de la síntesis de la insulina y las condiciones de estrés metabólico generan el daño de los islotes pancreáticos, inhibiendo por completo la síntesis de Ins y, por ende, disminuyendo la captación y el metabolismo de glucosa. Como consecuencia, existe un incremento de los niveles de glucosa en sangre, y un proceso inflamatorio sistémico que puede llevar al desarrollo de la diabetes (Freeman & Pennings, 2020).

En la búsqueda del entendimiento del desarrollo de la RI, se han empleado diversos modelos de dietas ricas en lípidos o carbohidratos. Estos modelos pueden llevar al desarrollo de la RI sistémica y la inhibición de la vía de la Ins. Tal es el caso de dieta rica en fructosa (DRF), que puede funcionar como un modelo ideal para el estudio de la RI.

### **1.9 Dieta rica en fructosa**

En las últimas décadas, el consumo de fructosa a través de diferentes alimentos y bebidas como endulzante (jarabe de maíz con alto contenido en fructosa) ha ido en aumento (Lancaster et al., 2020). Este incremento en el consumo de fructosa ha sido asociado con aumento en el riesgo a diferentes efectos metabólicos en el organismo, tales como la RI, incremento de lípidos entre otros; favoreciendo el desarrollo a diferentes enfermedades cardiovasculares, así como obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2 (Chan et al., 2021; Zheng et al., 2016).

El consumo de fructosa en la dieta permite su absorción intestinal y su paso hasta el torrente sanguíneo. El transporte de fructosa al interior de los enterocitos por el

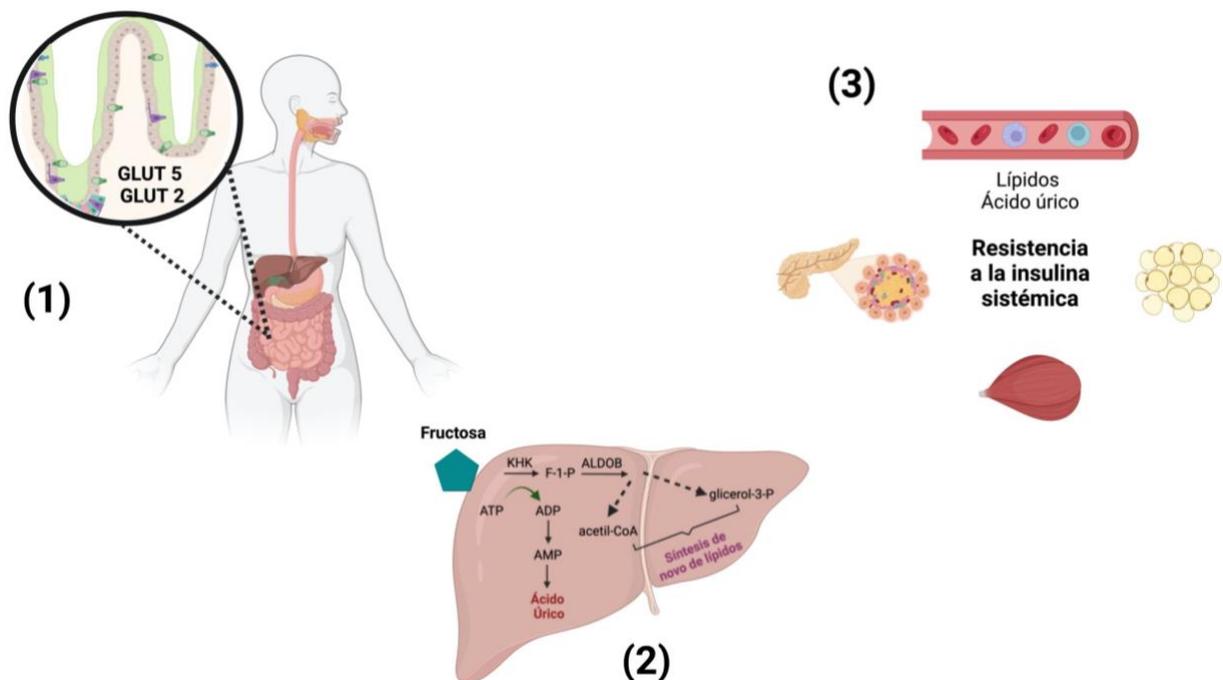
transportador GLUT5, y su posterior paso a la sangre con ayuda del GLUT 2 permite que la fructosa se encuentre disponible con gran facilidad en el torrente sanguíneo (Figura 3-1) (Chan et al., 2021). Una vez que la glucosa se encuentra en la sangre puede ser directamente transportada al hígado, su principal órgano metabolizador. Dentro del hígado se lleva a cabo el proceso denominado fructólisis, el cual se encarga del metabolismo de la fructosa. Cabe destacar que la fructólisis es capaz de llevarse a cabo con mayor rapidez que la glucólisis en el hígado, pues las enzimas que se encargan de la fructólisis se encuentran en concentraciones superiores. En este proceso intervienen varias enzimas que facilitan la degradación de la fructosa; sin embargo, durante esta fructólisis, la formación de dos sub-productos de este metabolismo (el ácido úrico y la síntesis *de novo* de los lípidos) favorecen el daño generado por este carbohidrato (Pan & Kong, 2018; Wong & Brown, 2014).

La fructosa es convertida a Fructosa-1-fosfato por acción del a cetohecoquinasa (KHK, por sus siglas en inglés); sin embargo, de esta reacción, pueden desencadenarse otras reacciones llevando un incremento en la síntesis de ácido úrico. Posteriormente, la Aldolasa B (ALDOB) que participa en la fructólisis favorece la formación de glicerol-3-fosfato y acetil Co enzima A (acetil-CoA), ambos subproductos participan y favorecen la síntesis *de novo* de los lípidos en el hígado (Figura 3-2).

Cuando existe un alto consumo de fructosa, la fosforilación de la fructosa es muy rápida pero la reacción con aldolasa es lenta. Así, la fructosa-1-fosfato se acumula y el fosfato intracelular disminuye. Esta disminución estimula a la AMP deaminasa (AMPD), que cataliza la reacción de AMP a inosina monofosfato, incrementando la tasa de degradación de purinas. Esta degradación de purinas produce ácido úrico (Caliceti et al., 2017).

El incremento de los diacilgliceroles y ceramidas generado por la síntesis *de novo* en el hígado lleva a un cambio en el perfil lipídico de este tejido, generando dislipidemias, hígado graso y la RI. De una manera similar, el incremento de ácido úrico favorece el estrés oxidante y la inflamación en el tejido, llevando a la RI en el hígado (Figura 3-2). En general tanto la respuesta inflamatoria como los lípidos sintetizados pueden llegar a torrente sanguíneo, donde pueden pasar a otros tejidos llevando al desarrollo de RI sistémica (Figura 3-3) (Pan & Kong, 2018).

El efecto sistémico de la DRF ya sea en agua de bebida o en la comida ha sido probado en distintos modelos animales, en los cuales, la fructosa ha estado presente en concentraciones de 10 a 60% p/p o p/v. Todos estos modelos llevan al desarrollo de la RI y hasta el desarrollo de síndrome metabólico o diabetes en los animales (Wong & Brown, 2014). Los resultados obtenidos de estos modelos, pueden favorecer al entendimiento de estas enfermedades, de su desarrollo y de cómo interactúan con otros factores de riesgo para generar diferentes enfermedades metabólicas (Chan et al., 2021).



**Figura 3. La dieta rica en fructosa y sus efectos.**

(1) Una vez que la fructosa es consumida, es llevada por el tracto gastrointestinal y absorbida por los enterocitos con ayuda de GLUT 5, para ser trasladada al torrente sanguíneo por medio de GLUT 2. (2) En el hígado, la fructólisis es llevada a cabo, generando subproductos que pueden llevar a la RI del hígado. (3) La liberación de los lípidos y el ácido úrico sintetizados en el hígado al torrente sanguíneo pueden generar una RI sistémica.

### **1.10 El PM<sub>2.5</sub>, la DRF y el desarrollo de la resistencia a la insulina**

Como se mencionó antes, la exposición al PM puede llevar a procesos inflamatorios y de estrés oxidante a nivel local y sistémico. Estos efectos ya se han asociado a daño en marcadores metabólicos, así como la posibilidad del desarrollo de enfermedades metabólicas en diferentes poblaciones. Una población de individuos pre-diabéticos y diabéticos en Ausburgo, Alemania que estuvieron en monitoreo por dos años (2006 – 2008) mostró una asociación entre la exposición residencial al PM<sub>2.5</sub> con el incremento en los niveles de Ins, y HOMA-IR; así como una asociación marginal con el incremento de los niveles de glucosa y leptina (Wolf et al., 2016). Esta misma población fue estudiada posteriormente para un análisis longitudinal utilizando los valores séricos obtenidos entre los años 1999-2001, 2006-2008 y 2011-2013; los resultados mostraron una asociación entre el promedio anual de PM<sub>2.5</sub>, y los valores séricos de Ins, los índices HOMA-IR y HOMA-β. Ambos estudios muestran que existe una asociación entre el daño metabólico y el desarrollo de la RI por la exposición continua a PM<sub>2.5</sub>. Varias investigaciones han empleado diferentes modelos animales para determinar los mecanismos que pueden llevar a este daño metabólico y el desarrollo de RI por la exposición al PM<sub>2.5</sub>. Además, se han empleado modelos de exposición combinada a lípidos o carbohidratos con la finalidad de poder determinar la contribución de ambos factores de riesgo en el desarrollo de esta condición. La Tabla 2 muestra algunos de estos ejemplos.

**Tabla 2. Efecto del material particulado sobre el metabolismo de glucosa y la vía de la insulina.**

<b>Contaminante Concentración</b>	<b>Modelo Animal</b>	<b>Modelo de exposición</b>	<b>Efectos</b>
PM <sub>2.5</sub> 70 µg/m <sup>3</sup> Partículas NiSO <sub>4</sub> 0.44 µg/m <sup>3</sup> (Xu et al., 2012)	Ratones macho knockout ApoE	12 semanas Cuerpo completo	La exposición a PM <sub>2.5</sub> y PM <sub>2.5</sub> + Ni generaron un incremento del HOMA-IR. La co-exposición a PM <sub>2.5</sub> + Ni generó un incremento de glucosa basal. Incremento de infiltrado de macrófagos en tejido graso en PM <sub>2.5</sub> y PM <sub>2.5</sub> + Ni.
PM <sub>2.5</sub> (Xu,et al., 2017)	C57BL/6 Ratones macho	12 semanas Cuerpo completo	Resistencia a la insulina, disminución de la tolerancia a la glucosa. Incremento de AST y la ALT. Disminución de glucógeno y su síntesis. Incremento de lípidos en hígado y suero. Incremento de estrés oxidante (HO-1, SOD, CAT), activación de la vía de JNK en hígado. Incremento de IRS-P, disminución de AKT.
PM <sub>2.5</sub> 62.5 µg/m <sup>3</sup> (Reyes-Caballero et al., 2019)	C57BL/6J Ratones macho	16 semanas Cuerpo completo	Disminución de la glucólisis y el ciclo de Krebs en hígado. Incremento de la vía de las pentosas fosfato y posible Incremento de la síntesis <i>de novo</i> de los ácidos grasos.

PM <sub>2.5</sub> 228.70 µg/m <sup>3</sup> (Li et al., 2020)	C57BL/6 Ratones macho y hembra	24 semanas Cuerpo completo	Hembras más susceptibles a la RI y la acumulación de lípidos en hígado. Incremento de Triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol en hígado. Incremento de ApoB y transporte microsomal de lípidos.
116.39 µg/m <sup>3</sup> (Liu et al., 2014)	C57BL/6 Ratones macho	8 o 17 semanas de exposición Cuerpo completo  Dieta rica en lípidos (60%)	A las 8 semanas No se observaron cambios metabólicos. A las 17 semanas cambio en el HOMA-IR y el HOMA-β , disminución de la tolerancia a la glucosa. Incremento de respuesta inflamatoria , disminución de AKT-p en hígado y grasa, incremento de lípidos en plasma.
PM <sub>2.5</sub> 1mg/kg (Long et al., 2020a)	Ratas Wistar macho	6 exposiciones Intratraqueal  Dieta rica en grasa (10%), sacarosa (5%) y colesterol (10%)	Incremento de IL-6, TNF-α y MCP-1 en pulmón, sólo IL-6 en sangre, hígado y grasa. Inducción de STAT3/SOCS3 en hígado. Inhibición de STAT e IL-6 disminuyen el desbalance de glucosa.

Abreviaturas: AST, Aspartato aminotransferasa; ALT, Alanina aminotransferasa; HO-1, hemoxigenasa SOD, superóxido dismutasa; CAT, Catalasa; JNK, Cinasa c-Jun n-terminal; Apo B, Apolipoproteína B; MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos 1 ; STAT3, Transductor de señales y activador de transcripción 3 SOCS3, Supresor de señalización de citocinas 3.

### **1.11 Justificación.**

En la actualidad, uno de los principales problemas de los países en desarrollo es la contaminación ambiental. En México, la contaminación por PM<sub>2.5</sub> es uno de los principales problemas que aquejan la calidad del aire de las ciudades más importantes del país. Diferentes efectos adversos y sobre la salud humana han sido reportados por causa de este contaminante (estrés oxidante, inflamación, activación del sistema SRAA enfermedades cardiorespiratorias), destacándose su posible asociación con el desarrollo de la RI y la diabetes. Uno de los mecanismos propuestos por los cuales el PM<sub>2.5</sub> puede contribuir al desarrollo de la RI es mediante la modificación de la vía de la Ins como consecuencia de la activación de procesos inflamatorios y el sistema RAS. Además de los factores ambientales, el consumo en la dieta de altas concentraciones de lípidos y/o carbohidratos han sido asociados con el desarrollo de patologías metabólicas. Diferentes modelos experimentales de dietas ricas en carbohidratos, como la DRF, han sido empleados para desarrollar RI. Aunque las asociaciones entre el PM<sub>2.5</sub> y diferentes efectos metabólicos ya se han reportado, los mecanismos moleculares por los cuales estos efectos pueden generarse aún no se han dilucidado completamente. Es por ello, que el siguiente trabajo evaluó el efecto del PM<sub>2.5</sub> sobre la alteración de la vía de señalización de la Ins y la alteración de la actividad metabólica *in vivo*.

### **1.12 Hipótesis.**

La exposición al PM<sub>2.5</sub> y la DRF inducirá la alteración de la vía de la Ins y la alteración en la actividad metabólica *in vivo*.

### **1.13 Objetivo general.**

Evaluar el efecto de la exposición a PM<sub>2.5</sub> y la DRF sobre la alteración de la vía de la Ins y de la actividad metabólica *in vivo*.

#### **1.14 Objetivos particulares.**

- Realizar la exposición a PM<sub>2.5</sub>, la DRF o la co-exposición a aire filtrado, PM<sub>2.5</sub> y la DRF en ratas Sprague Dawley macho durante 8 semanas.
- Cuantificar e identificar los componentes orgánicos, inorgánicos y aerobiológicos del PM<sub>2.5</sub>.
- Determinar las alteraciones en los parámetros morfométricos en respuesta a la exposición a PM<sub>2.5</sub>, la DRF o la co-exposición a PM<sub>2.5</sub> y la DRF.
- Cuantificar los cambios en los parámetros bioquímicos relacionados con la vía de la insulina (glucosa, insulina, leptina y la CTG) por la exposición a PM<sub>2.5</sub>, la DRF o la co-exposición a PM<sub>2.5</sub> y la DRF.
- Determinar la modificación de los índices metabólicos relacionados con la vía de la insulina (IMC, HOMA-IR, HOMA-  $\beta$ ) por la exposición a PM<sub>2.5</sub>, la DRF o la co-exposición a PM<sub>2.5</sub> y la DRF.
- Determinar la alteración de la morfología histológica en los tejidos sensibles a Ins posterior a la exposición a PM<sub>2.5</sub>, la DRF o la co-exposición a PM<sub>2.5</sub> y la DRF.
- Evaluar los cambios en la expresión de proteínas de la vía de la Ins y el AT1R por la exposición a PM<sub>2.5</sub>, la DRF o la co-exposición a PM<sub>2.5</sub> y la DRF.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Diseño experimental

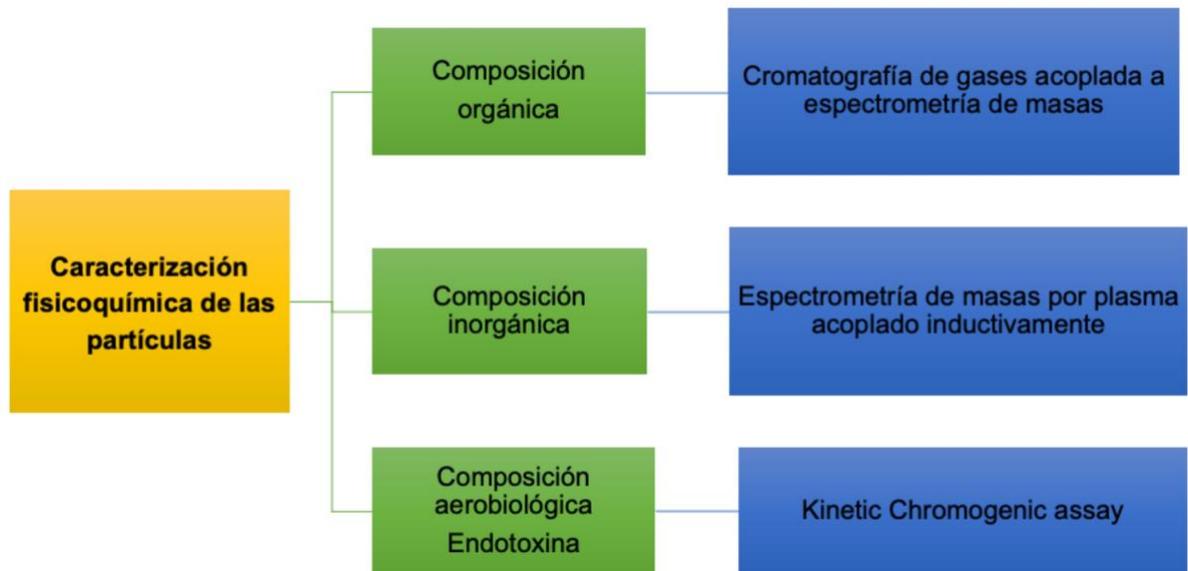


Figura 4. Evaluación fisicoquímica de las partículas.

Esquema general de la determinación de la composición de las partículas.

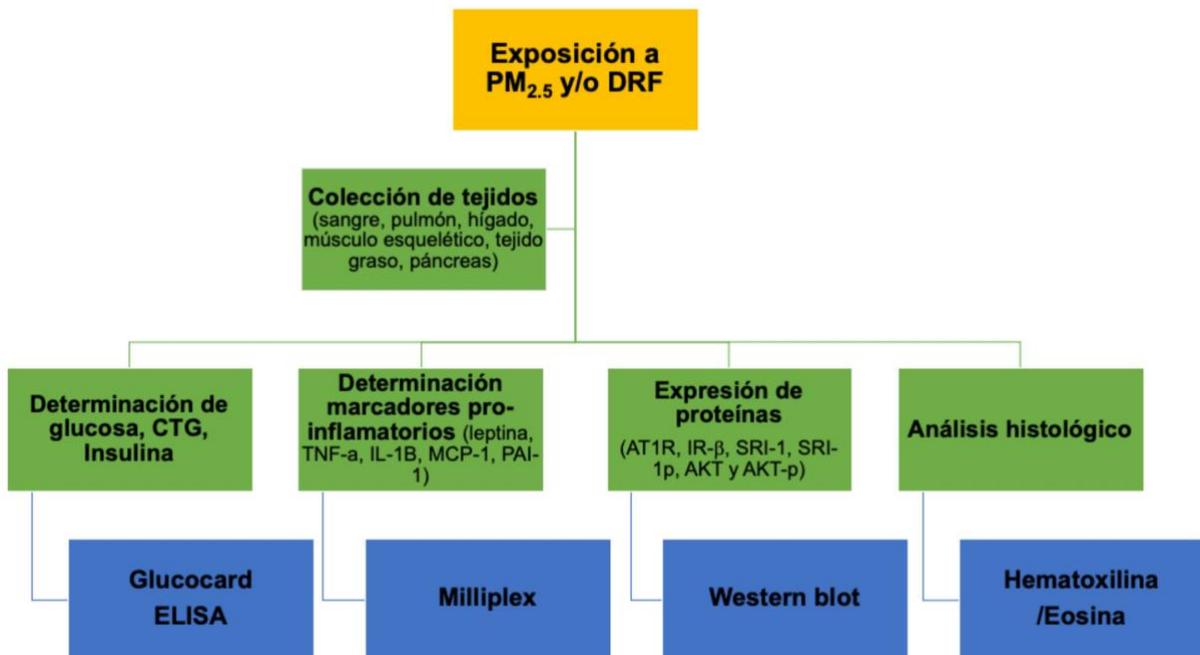


Figura 5. Diseño experimental que detalla las técnicas de laboratorio empleadas.

Esquema de los experimentos y los métodos empleados a realizar tras la exposición de 8 semanas.

## 2.2 Animales y diseño experimental

Este trabajo fue previamente evaluado y autorizado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Cinvestav (CICUAL-Cinvestav), bajo el protocolo No. 0312-20. De la misma manera, el cuidado de los animales, así como los procedimientos experimentales fueron realizados bajo la guía de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO.

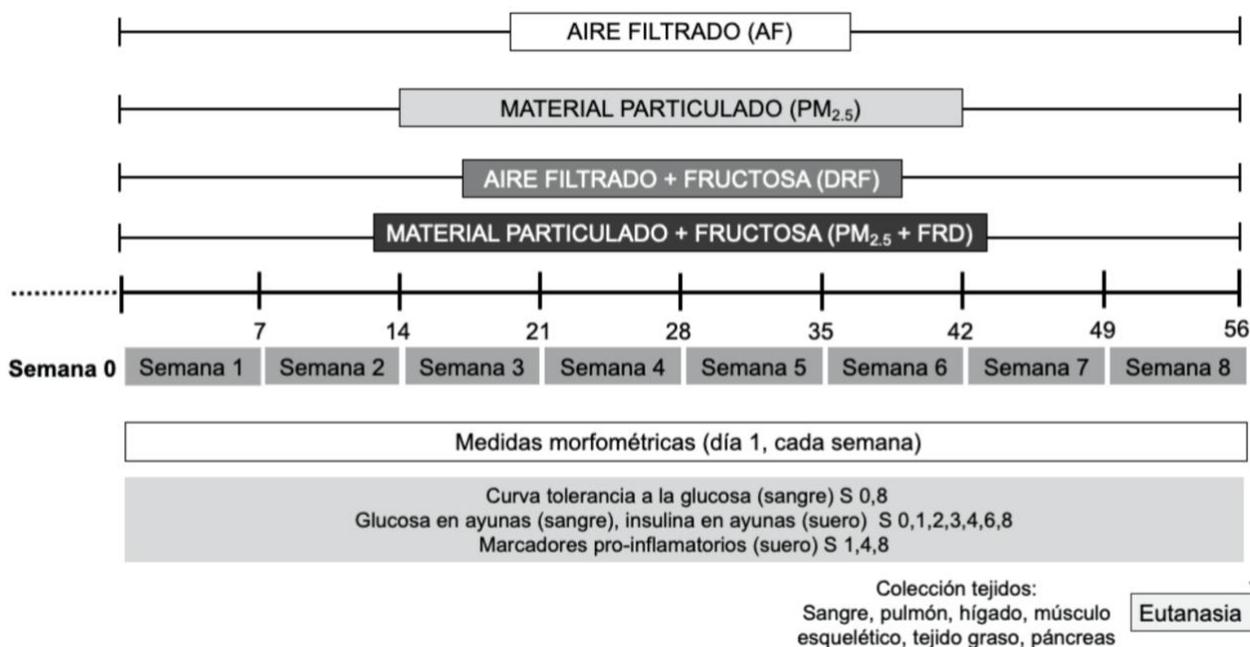
Las ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 8 semanas de edad fueron empleadas para este estudio. Las ratas se obtuvieron de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Cinvestav. Estos animales fueron cuidados en el bioterio del Cinvestav de acuerdo con las guías institucionales en un ambiente 12h luz/ 12 h oscuridad con agua y comida *ad libitum*; bajo una atmósfera de humedad relativa del 40 – 60% y un rango de temperatura de entre 20 a 23 °C. Los animales fueron divididos al azar en 4 grupos (8 animales por grupo). Cada grupo fue expuesto de manera sub-crónica a Aire filtrado (AF), Materia particulado menor a 2.5 micras (PM<sub>2.5</sub>), Aire filtrado más dieta rica en fructosa (DRF) o la exposición combinada a PM<sub>2.5</sub> + DRF (Figura 6).

## 2.3 Modelo de exposición

**2.3.1 Principio.** El sistema versátil de enriquecimiento de la concentración de aerosoles (VACES, por sus siglas en inglés) permite una exposición de cuerpo completo en los animales a concentrados de material particulado. Ese modelo de exposición es empleado para simular ambientes cercanos a la exposición ambiental permitiendo concentrar partículas del aire (0.02 a 10 µg) con un factor 10 (Herman et al., 2020).

**2.3.2 Procedimiento.** El presente estudio se llevó a cabo en la zona norte de la Ciudad de México, en una zona industrial con alto flujo vehicular. La atmósfera enriquecida de PM<sub>2.5</sub> fue generado utilizando un sistema versátil de enriquecimiento y concentración de aerosoles (VACES por sus siglas en inglés) localizado dentro del Laboratorio Experimental de Toxicología Inhalatoria (LETI) en la Unidad de cuidado de animales en el Cinvestav. Durante la exposición las ratas fueron confinadas en cámaras de

exposición de sellado hermético de cuerpo completo, dónde los animales estuvieron expuestos a AF o PM<sub>2.5</sub> por 5 horas/día, 4 días/semana, por 8 semanas (Figura 6).



**Figura 4. Esquema de exposición a PM<sub>2.5</sub> y/o la DRF.**

Esquema general de las semanas de exposición al PM<sub>2.5</sub> y/o la DRF. Se determinan las muestras a analizar y los tiempos de obtención de dichas muestras.

## 2.4 Modelo experimental de dieta rica en fructosa (DRF)

**2.4.1 Principio.** En la actualidad los endulzantes a base de fructosa son ampliamente utilizados en la industria alimentaria, exponiendo a los seres humanos a grandes cantidades de este carbohidrato. Se ha observado, que el metabolismo de la fructosa en los organismos lleva al incremento en la inflamación y estrés crónico sistémico que puede generar diferentes efectos adversos en el metabolismo (RI, diabetes, obesidad, hasta 17 semanas en concentraciones variables de fructosa (10 – 60%) pueden generar RI y/o diabetes en diferentes modelos animales (Lancaster, 2020; Roeb & Weiskirchen, 2021).

**2.4.2 Procedimiento.** Para investigar si la DRF contribuye con la respuesta a la exposición al PM<sub>2.5</sub>, 2 de los 4 grupos de exposición fueron expuestos a la DRF *ad*

*libitum* en agua de bebida (el agua de bebida fue preparada en una proporción 20% m/v de fructosa), durante las 8 semanas de exposición (Figura 6).

## **2.5 Evaluación de parámetros morfométricos en los animales.**

**2.5.1 Procedimiento.** Durante las semanas 0, 1, 2, 3, 4, 6 y 8 de exposición, diferentes mediciones morfométricas fueron realizadas en los animales. El peso de los animales fue obtenido mediante el uso de una balanza granataria. De la misma forma se empleó una cinta métrica para medir la curvatura (tomada por encima de las patas traseras de las ratas) y el largo de los animales (tomado desde la punta del morro hasta el ano del animal) fueron medidos. Con estos valores, la ganancia de peso y los índices de masa corporal (IMC) y de Lee fueron calculados. El IMC fue calculado mediante la siguiente fórmula  $IMC = \text{peso (kg)} / [\text{estatura (m)}]^2$ . Mientras que el índice de Lee se calculó con la fórmula  $\text{Índice Lee} = \sqrt[3]{[\text{peso corporal (kg)}] / \text{longitud (m)}} * 1000$ .

## **2.6 Colección de tejidos.**

**2.6.1 Procedimiento.** Al final de las 8 semanas de exposición (24 h después de la última exposición a  $PM_{2.5}$ ), los animales fueron anestesiados (ketamina/xilacina) para posteriormente obtener sangre directamente del corazón del animal y practicarles la eutanasia por desangrado. Diferentes tejidos (n = 6 animales) como pulmón, hígado, músculo esquelético, páncreas y adiposo blanco abdominal fueron disectados, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-70^{\circ}C$  hasta su análisis (Figura 6).

## **2.7 Caracterización de la composición y concentración del $PM_{2.5}$**

**2.7.1 Principio.** El espectrómetro de masas de plasma acoplado inductivamente permite el nebulizado de la muestra en el sistema, creando un aerosol muy fino que es posteriormente transferido al plasma de argón. La alta temperatura del plasma atomiza y ioniza la muestra, generando iones los cuales son extraídos a través de la región de interfaz a un grupo de lentes electrostáticos (iones ópticos). Los iones ópticos enfocan y guían el láser de iones hacia el analizador cuadrupolo de masa. El analizador de masa separa los iones de acuerdo con su relación masa/carga, y estos iones son medidos en el detector.

Por otra parte, la cromatografía de gases es un término que engloba todos los métodos cromatográficos en los cuales la fase móvil es un gas. En esta técnica, la fase móvil con la mezcla de compuestos se distribuye por la fase estacionaria de acuerdo con la

afinidad de cada componente con la fase estacionaria, separando a dichos componentes. El acoplamiento con un espectrómetro de masas permite que los componentes posteriormente sean ionizados mediante su impactación con electrones; por diferencia de masa carga entre los iones de cada componente, lo que permite su identificación (Sánchez-Guijo et al., 2006; Wilschefski & Baxter, 2019).

**2.7.2 Procedimiento.** El análisis de los componentes orgánicos y elementales del PM<sub>2.5</sub> se describe a continuación. Las muestras de PM<sub>2.5</sub> se obtuvieron de las cámaras de exposición, y colectadas en filtros (47 mm de diametro con tamaño de poro 2 µm; GE healthcare, Amersham Place, UK) de politetrafluoroetileno (PTFE, por sus siglas en inglés). Los filtros fueron aclimatados y pesados controlando la temperatura y humedad antes y después del muestreo (Figura 4).

Los compuestos orgánicos del PM<sub>2.5</sub> se determinaron por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés), equipado con un filtro de cuadrupolo (modelo 6890 plus/5973 N, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Los compuestos orgánicos fueron obtenidos por extracción asistida por ultrasonido usando etanol como solvente de extracción.

El análisis de los elementos de mayor composición (Li, B, V, Cr, Co, Cu, As, Sr, Mo, Cd, Cs, Ba, Hg, Bi, Sn, Sb, Al, Se, Pb, Ni, Ti, Mn, Fe and Zn) fue realizado utilizando un Espectrometro de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS por sus siglas en inglés; modelo NexION 300D, Perkin Elmer, E.U.A.). La determinación se realizó en el Laboratorio de Metales acreditado por la entidad mexicana de acreditación A.C. (INV-0007-013/19). Las partículas fueron obtenidas mediante sonicado de los filtros durante 2 minutos usando metanol como solvente, la suspensión obtenida fue secada bajo nitrógeno. Las partículas secas se resuspendieron en agua acidificada (HNO<sub>3</sub> 65% diluido en agua hasta una concentración final de 0.16% de ácido) y sonicadas para su suspensión homogénea y su análisis. Se empleó un gráfico multielemental para identificar y cuantificar la composición elemental del PM<sub>2.5</sub>.

## **2.8 Determinación de la concentración de endotoxina.**

**2.8.1 Principio.** Una cantidad traza de endotoxina coagula el lisado de hemocitos proveniente del cangrejo de herradura. Esta reacción de gelificación es empleada para

determinar la concentración de endotoxina bacteriana. La reacción entre las proteasas presentes en el lisado y la endotoxina puede ser cuantificada mediante espectrometría a 405 nm (Iwanaga, 2007).

**2.8.2 Procedimiento.** La determinación de la endotoxina presente en el PM<sub>2.5</sub> fue cuantificada utilizando el Pyrochrome, Kinetic Chromogenic assay (Chromogenic Endotoxin Quant Kit A39552, Pierce ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Donde una suspensión de PM<sub>2.5</sub> a una concentración de 1 mg/mL fue preparada en agua libre de endotoxina. Esta suspensión fue empleada para su reacción con el Kit antes mencionado y posteriormente la absorbancia de la solución obtenida fuera medida. Las medidas de absorbancia se obtuvieron a 405 nm utilizando un espectrofotómetro Pyros Kinetix Flex Instrument (Associates of Cape Cod, Inc.) (Figura 4).

## **2.9 Determinación de las concentraciones séricas de diferentes marcadores pro-inflamatorios.**

**2.9.1 Principio.** El ensayo multiplex es un ensayo modificado de ELISA que ha sido adaptado para medir múltiples analitos en la misma muestra de manera simultánea. Está basado en la incubación de las muestras de varias fuentes que contienen citocinas u otros mediadores celulares con una mezcla de perlas magnéticas. Cada perla está acoplada con un anticuerpo específico para cada analito. La incubación es seguida por una serie de lavados y posteriormente anticuerpos biotinizados son adicionados para unirse a los anticuerpos específicos de cada analito y formar un complejo tipo sándwich. Posteriormente una molécula reportera es adicionada para poder detectar la presencia de los analitos conjugadas. Las perlas son reconocidas por su patrón cromogénico o fluorescente durante su análisis (Figura 5) (Elsabahy y Wooley, 2013).

**2.9.2 Procedimiento.** La determinación de citocinas (leptina, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PAI-1 y MCP-1) se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones mencionadas por el fabricante (RADPCMAG-82 K MILLIPLEX® MAP Rat Adipocyte panel; EMD Millipore, Billerica, MA, USA). El suero de los animales se descongeló para posteriormente ser incubado con las perlas conjugadas con los marcadores de interés durante toda la noche a 4° C. Posteriormente, se lavaron las muestras para retirar el exceso de

proteínas no unidas y se incubaron con los anticuerpos acoplados a biotina por 1 h. Pasado este tiempo, se realizó nuevamente un lavado para eliminar el exceso y se agregó el complejo reportero de estreptavidina-ficoeritrina para posteriormente ser incubado por 30 min. Las muestras se analizaron en el equipo MAGPIX (Luminex Corporation, Estados Unidos) y los datos obtenidos se procesaron con el software Xponent (Luminex Corporation, Estados Unidos).

## **2.10 Determinación de las concentraciones de glucosa, insulina y curva de tolerancia a la glucosa (CTG)**

**2.10.1 Principio.** La determinación de glucosa en tiras reactivas se lleva a cabo mediante la reacción específica de la b-D-glucosa con la glucosa oxidasa, agua y oxígeno que permite la formación de ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Este peróxido de hidrógeno puede ser posteriormente usado para oxidar a un cromógeno o determinar el consumo de oxígeno de la reacción anterior y así determinar la concentración de glucosa presente en la muestra (Kruse, 1990). La determinación de Ins en suero se realiza mediante la técnica de ELISA tipo sándwich, en la que las moléculas de Ins de la muestra son capturadas por anticuerpos monoclonales anti-rata (unidos a la microplaca), posteriormente esta unión es marcada mediante el uso de anticuerpos policlonales biotinizados que se unen con la peroxidasa de rábano; que posteriormente puede ser cuantificado por su reacción con la tetrametilbenzidina (Aydin, 2015).

**2.10.2 Procedimiento.** La CTG fue realizada durante la semana 0 y la semana 8. Para esta primera prueba, las ratas se mantuvieron en ayunas por 8 horas para realizar el primer análisis de glucosa en sangre a tiempo cero. La muestra de sangre se obtuvo por goteo tras realizar pequeño corte en la cola del animal. Posteriormente una solución de glucosa (2mg/g peso del animal) fue administrado vía oral, y se analizó la concentración de glucosa en sangre de cada animal a los 15, 30, 60 y 120 minutos (Glucocard™ test strips; ARKRAY Factory Inc., Netherlands). Las concentraciones de glucosa en ayunas se determinaron durante las semanas 0, 1, 2, 3, 4, 6 y 8 de exposición utilizando las tiras reactivas de Glucocard™ (ARKRAY Factory Inc., Netherlands). Durante estas mismas semanas las concentraciones de Ins fueron

determinados mediante el kit de ELISA EZRMI-13 Rat/ Mouse ELISA (EMD Millipore, Billerica, MA, USA), bajo los protocolos del fabricante (Figura 6).

## **2.11 Cálculo de los valores de HOMA-IR y de HOMA- $\beta$**

**2.11.2 Procedimiento.** Para el cálculo de los índices HOMA-IR y HOMA- $\beta$  se emplearon las concentraciones de glucosa e Ins en ayunas obtenidos del experimento anterior. Basados en la equivalencia de 1 mg de Ins = 24 unidades internacionales (UI), el índice HOMA-IR (del inglés homeostatic model assessment of insulin resistance index) fue calculado de acuerdo a la fórmula  $HOMA-IR = [\text{concentración de Ins en ayunas (ng/mL)} \times \text{concentración de glucosa en ayunas (mg/dL)} \times 24] / 405$ . El HOMA- $\beta$  (del inglés homeostatic model assessment of  $\beta$ -cells function) fue calculado por la fórmula  $HOMA-\beta = [360 \times \text{concentración de Ins en ayunas (ng/mL)}] / [\text{concentración de glucosa en ayunas (mg/dL)} - 63]$  (R. Li et al., 2020; Liu et al., 2014).

## **2.12 Determinación de la expresión de proteínas por Western blot**

**2.12.1 Principio.** Esta técnica es utilizada para separar e identificar proteínas. En esta, una mezcla de proteínas es separada basadas en su peso molecular, a través de electroforesis en gel. Estos resultados son después transferidos a una membrana produciendo una banda para cada proteína. La membrana es después incubada con anticuerpos marcadores específicos para la proteína de interés. A estos anticuerpos primarios se unen anticuerpos secundarios marcados que posteriormente pueden ser detectados. El grosor de la banda obtenida corresponde a la cantidad de proteína presente (Mahmood y Yang, 2012).

**2.12.2 Procedimiento.** La porción de tejido se homogeneizó mediante politrón con buffer de lisis (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH 8.0) e inhibidores de proteasas COMPLETE, e inhibidor de fosfatasas, las muestras se homogeneizaron por 5 minutos, se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min, y se hicieron alícuotas del sobrenadante. Las muestras de proteína obtenidas de los tejidos se ajustaron con solución de homogeneización hasta un volumen final de 50  $\mu$ L y concentración de 30 $\mu$ g, se añadieron 5  $\mu$ L de buffer de carga, se desnaturalizaron a 60 °C y se dejaron reposar las alícuotas a temperatura ambiente. Las muestras se cargaron en geles de

12% de poliacrilamida. Los geles se corrieron a temperatura ambiente y voltaje constante (70V) durante 5 horas hasta 1 cm antes de finalizar el gel. Pasado este tiempo, las proteínas del gel de electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se utilizó un marcador de peso molecular BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder y la tinción de rojo Ponceau S. La membrana se lavó con TBS 1X y se bloqueó con leche descremada al 5% por 1h. Posteriormente se adicionó el Ab primario y se dejó toda la noche a 4° C (Tabla 3). Pasado este tiempo la membrana se lavó 3 veces en TBS 1X-Tween 0.2%, para incubarse después con el Ab secundario conjugado durante 1 h a temperatura ambiente y agitación constante; nuevamente, la membrana se lavó y se reveló mediante un sistema de detección ECL (Enhanced chemiluminescence). Se utilizó como control de carga de la cantidad de proteína la inmunodetección de actina (P.M. 42 kDa). Las placas fotográficas obtenidas se analizaron por medio del software ImageJ 1.37v para obtener la densitometría de las bandas (Figura 6).

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados para su identificación por Western blot.**

Proteína	Concentración/Anticuerpo	No. Producto
Receptor tipo 1 angiotensina II (AT <sub>1</sub> R)	1:1000 Anticuerpo mouse monoclonal	sc-515884
Receptor de insulina b (IR-b)	1:1000 Anticuerpo mouse monoclonal	sc-135949
Substrato del receptor a insulina 1 (IRS-1)	1:1000 Anticuerpo mouse monoclonal	sc-8038
IRS-1 fosforilado (IRS-p)	1:10000 Anticuerpo rabbit policlonal phospho s307	ab1194
Serina/treonina protein-cinasa (AKT)	1:10000 Anticuerpo rabbit policlonal	ab179463
Serina/treonina protein-cinasa fosforilada (AKT-p)	1:10000 Anticuerpo rabbit policlonal phospho s473	ab81283
Anticuerpo secundario goat anti rabbit IgG	1:10000 anticuerpo polyclonal	1706515
Anticuerpo secundario rabbit anti mouse	1:10000 anticuerpo policlonal	51802104

## **2.13 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

**2.13.1 Principio.** Este método se basa en la unión del colorante Azul de Coomassie G250 a las proteínas. Este colorante puede existir en cuatro formas iónicas. La forma más aniónica del colorante (de color azul) se une a las proteínas y tiene una absorbancia máxima de 590 nm. Así, la cantidad de proteína puede ser estimada al determinar la cantidad de colorante en su forma iónica azul. El colorante se une más fácilmente a los residuos arginil y lisil de las proteínas. Esta cuantificación es llevada a cabo por la determinación de la absorbancia a 595 nm (Kruger, 1996).

**2.13.2 Procedimiento.** Se preparó una gráfica de calibración mediante la dilución de una solución de albúmina bovina sérica de 2 mg/mL con H<sub>2</sub>O-dd. Se colocaron cada uno de los volúmenes de H<sub>2</sub>O-dd y albúmina de las diluciones de la gráfica de calibración por triplicado en una placa de 48 pozos, teniendo un volumen de dilución de 1 mL, este volumen se igualó para las muestras problema. Posteriormente se adicionaron 900 µL de reactivo de Bradford; se dejaron incubar por 15 min en oscuridad y se leyó la placa a 595 nm en el instrumento TECAN Infinite® 200 (Tecan, Suiza).

## **2.14 Análisis histológico.**

**2.14.1 Principio.** Los colorantes hematoxilina y eosina han sido ampliamente utilizados para reconocer diferentes tipos de tejidos y los cambios morfológicos de estos. La hematoxilina es un colorante morado/azul profundo que tiñe los ácidos nucleicos por la formación de un complejo; la eosina es un colorante rosa que tiñe de manera inespecífica a las proteínas. De manera general, en los tejidos los núcleos se encuentran teñidos de azul, mientras el citoplasma y la matriz extracelular presentan diferentes tonos de rosa (Fischer et al., 2008).

**2.14.2 Procedimiento.** Los tejidos embebidos en parafina de los 4 grupos de exposición fueron seccionados en cortes de 5 µm, preparados y teñidos con los colorantes hematoxilina y eosina. Los tejidos teñidos fueron observados y diferentes imágenes fueron tomadas (dos laminillas por cada muestra) bajo un microscopio óptico de alta resolución (Keyence Microscope BZ-X800, Keyence Corporation of America, IL, USA). Las imágenes obtenidas fueron analizadas para determinar la concentración

de lípidos (hígado), el número de células nucleadas (músculo, tejido adiposo), el tamaño de islotes o el incremento de la granularidad celular (páncreas) utilizando el software Image J (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Para este ensayo se analizaron aproximadamente 20 imágenes a diferentes aumentos (4X, 10X, 20X, 60X) de cada animal (Figura 5).

### **2.15 Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos el Software Prisma 8.0 (GraphPad Software, Inc. E.U.A.) fue empleado. Todos los datos fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Los resultados fueron analizados para determinar la normalidad de los datos. Posteriormente, se procedió a realizar el análisis por ANOVA de una vía y prueba *post-hoc* Bonferroni. Los datos de Western blot fueron analizados empleando la prueba no paramétrica de U de Man-Whitney. Los datos se consideraron significativos a valores de  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$  o  $p < 0.0001$ .

### 3. Resultados

#### 3.1 Caracterización de la composición y concentración del PM<sub>2.5</sub>

La colección, concentración y exposición de las ratas Sprague Dawley al PM<sub>2.5</sub> fue llevada a cabo en el norte de la Ciudad de México en el Laboratorio Experimental de Toxicología Inhalatoria (LETI) del Cinvestav. Esta exposición se llevó a cabo del 20 de octubre de 2020 hasta el 11 de diciembre de 2020.

La concentración del PM<sub>2.5</sub> en aire-ambiente y en las cámaras de exposición fue determinado durante cada una de las semanas de exposición (Tabla 4); el promedio de la concentración de estas partículas fue de  $33.75 \pm 12.40 \mu\text{g}/\text{m}^3$  en aire-ambiente, y de  $337.5 \pm 101.03 \mu\text{g}/\text{m}^3$  en las cámaras de exposición en el periodo del estudio. Estos datos muestran que el nivel de PM<sub>2.5</sub> al que estuvieron expuestos los animales fue aproximadamente 10 veces mayor a la concentración de PM<sub>2.5</sub> en el ambiente durante las semanas de exposición.

**Tabla 4. Determinación de la concentración de partículas durante las semanas de exposición.**

Semana	Aire ambiente ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	Cámaras de exposición ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
1	26.67	313.33
2	33.33	486.67
3	46.67	280.00
4	53.33	360.00
5	33.33	313.33
6	26.67	266.67
7	36.67	200.00
8	13.33	480.00
Promedio	$33.75 \pm 12.40$	$337.5 \pm 101.03$

Valores promedio obtenidos por semana.

De la misma manera, durante estas 8 semanas, se colectaron partículas en filtros de teflón los cuales se encontraban conectados directo a las líneas de flujo de aire de las cámaras de exposición de los animales. Estos filtros fueron obtenidos con la finalidad de determinar la composición elemental, la presencia de compuestos orgánicos y de endotoxina. Las tablas 5 y 6 muestran la presencia de estos componentes, así como sus concentraciones.

**Tabla 5. Composición elemental y concentración de endotoxina en el PM<sub>2.5</sub>**

Metales	ng/m <sup>3</sup>	Metales de transición	ng/m <sup>3</sup>
Li	2.89	Fe	57.93
Al	14.97	Ni	7.27
Mn	10.56	Co	0.185
Zn	325.93	Cu	13.09
As	1.00	Mo	1.12
Se	3.45	V	18.61
Sr	2.48	Cr	4.46
Cd	0.77	Otros elementos	ng/m <sup>3</sup>
Sn	3.97	B	46.45
Sb	3.33	Cs	0.04
Ba	4.54	Endotoxina	22.21 UE/m <sup>3</sup>
Hg	0.25		
Tl	0.10		
Pb	2.59		
Bi	0.18		

Las concentraciones promedio fueron obtenidas de al menos 4 filtros.

La Tabla No. 5 muestra el promedio de todos los elementos detectados en el PM<sub>2.5</sub>. La tabla fue dividida en dos grupos mayoritarios. La primera columna nos muestra a aquellos elementos considerados como metales y metaloides; mientras que en la segunda columna se aprecia a los metales de transición. Los elementos más

abundantes observados en los metales fueron el zinc, el aluminio y el manganeso con concentraciones promedio de 325.93 ng/m<sup>3</sup>, 14.97 ng/m<sup>3</sup> y 10.56 ng/m<sup>3</sup> respectivamente. Los metales de transición más abundantes fueron el hierro, vanadio y cobre; con concentraciones promedio de 57.93 ng/m<sup>3</sup>, 18.61 ng/m<sup>3</sup> y 13.09 ng/m<sup>3</sup> respectivamente. De la misma forma, se detectó una concentración promedio de 22.21 UE/m<sup>3</sup> de endotoxina en las partículas.

En la Tabla 6 se observan los compuestos orgánicos presentes en el PM<sub>2.5</sub> donde resaltan 3 grupos importantes, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), los alcanos y los ftalatos. De los HAP más abundantes en la muestra se encontraron al benzo[ghi]perileno (13.80 ng/m<sup>3</sup>), el indeno[1,2,3-cd]pireno (13.05 ng/m<sup>3</sup>) y el dibenzo[a,h]antraceno (12.67 ng/m<sup>3</sup>). En el caso de los alcanos, el tetracosano (450.58 ng/m<sup>3</sup>), el nonadecano (432.83 ng/m<sup>3</sup>) y el tritricontano (432.65ng/m<sup>3</sup>) fueron los más abundantes. Los ftalatos bis[2etilhexil]ftalato (1516.43 ng/m<sup>3</sup>), di-n-butil ftalato (260.29ng/m<sup>3</sup>) y diisobutil ftalato (60.99 ng/m<sup>3</sup>) se encontraron en mayor concentración.

La presencia tanto de estos elementos, compuestos orgánicos y componentes biológicos ha sido asociada a la generación de daño oxidante e inflamatorio en los seres vivos; y actualmente, estos componentes del material particulado han comenzado a asociarse a daños sobre el metabolismo a nivel sistémico. Por esta razón, es importante determinar la contribución de el PM<sub>2.5</sub> en el daño metabólico en los seres vivos.

**Tabla 6. Componentes orgánicos en el PM<sub>2.5</sub>**

Hidrocarburo aromático policíclico (HAP)	ng/m <sup>3</sup>	Alcano	ng/m <sup>3</sup>
Fluoreno	1.95	n-Tridecano (nC13)	307.12
Fenantreno	6.70	n-Tetradecano (nC14)	1.64
Antraceno	0.24	n-Pentadecano (nC15)	59.40
Fluoranteno	1.58	n-Nonadecano (nC19)	432.83
Pireno	1.20	n-Tricosano (nC23)	307.44
Benzo[a]antraceno	2.41	n-Tetracosano (nC24)	450.58
Benzo[b]fluoranteno	4.97	n-Pentacosano (nC25)	11.80
Benzo[k]fluoranteno	9.41	n-Hexacosano (nC26)	192.88
Benzo[j]fluoranteno	0.70	n-Heptacosano (nC27)	25.99
Benzo[e]pireno	0.75	n-Octacosano (nC28)	195.83
Benzo[a]pireno	8.52	n-Nonacosano (nC29)	284.48
Dibenzo[a,h]antraceno	12.67	n-Tritricontano (nC33)	432.65
Benzo[ghi]perileno	13.80	<b>Ftalato</b>	<b>ng/m<sup>3</sup></b>
Coronene	2.71	Diisobutil ftalato	60.99
Indeno[1,2,3-cd]pireno	13.05	Di-n-butil ftalato	260.29
Criseno	2.86	Di-n-pentyl ftalato	0.06
Trifenileno	0.55	Bis[2-etil-hexil] ftalato	1516.43
Benzofenona	9.24	Diciclohexil ftalato	5.05
Naftaleno	1.68		
9 Fluorenona	0.18		
2-Metil antraceno	1.22		
1-Metil antraceno	0.15		
Antraquinona	1.60		
Reteno	0.28		

Las concentraciones promedio fueron obtenidas de al menos 4 filtros.

### 3.2 Evaluación de los efectos sistémicos del PM<sub>2.5</sub> + DRF.

En la siguiente sección se describen los datos obtenidos del estudio de 32 ratas de la cepa Sprague Dawley (machos de 8 semanas de edad), estos animales fueron divididos en 4 grupos diferentes de manera aleatoria. La finalidad de esta investigación fue el determinar los efectos sistémicos sobre el metabolismo de estos animales causados por la exposición a PM<sub>2.5</sub> en combinación con DRF (PM<sub>2.5</sub> + DRF). Como se mencionó en la sección anterior los animales estuvieron expuestos a AF (considerado el grupo control de la exposición ambiental), expuestos a PM<sub>2.5</sub> (para determinar aquellos efectos causados sólo por este contaminante ambiental), expuestos a DRF (para determinar aquellos efectos atribuibles a esta dieta) y el grupo expuesto a PM<sub>2.5</sub> + DRF (para determinar el efecto combinado del contaminante ambiental y una dieta que se ha comprobado puede llevar a la RI).

### 3.3 Determinación de parámetros morfométricos.

Durante 8 semanas se llevó a cabo el seguimiento y la determinación de algunos parámetros morfométricos de los animales de los 4 grupos experimentales. La medición de la curvatura abdominal, el largo de los animales y el peso fue determinado cada semana durante 7 semanas de 8 (S0, S1, S2, S3, S4, S6 o S8). Las tablas 7, 8 y 9 muestran respectivamente los valores obtenidos de los animales.

**Tabla 7. Medición de la curvatura de los animales.**

Grupo	S1 (cm)	S2 (cm)	S4 (cm)	S6 (cm)	S8 (cm)
AF	13.5 ± 1.84	15.92 ± 0.86	16.75 ± 0.42	17.25 ± 0.82	18.75 ± 0.99
PM <sub>2.5</sub>	15.12 ± 1.19	16.31 ± 0.42	17.0 ± 0.71	17.87 ± 0.83	18.56 ± 0.56
DRF	15.62 ± 0.44	16.0 ± 0.53	16.87 ± 0.69	17.44 ± 0.62	19.0 ± 0.60
PM <sub>2.5</sub> + DRF	15.19 ± 0.26	15.44 ± 0.49	17.44 ± 0.86	18.31 ± 0.80	18.75 ± 0.80

Se muestran los valores de la medición de la curvatura de los 30 animales. Estos valores fueron determinados posterior a la exposición en las cámaras del VACES. Se muestra el promedio de los datos ± DE, n= 6.

**Tabla 8. Medición de la longitud de los animales.**

Grupo	S1 (cm)	S2 (cm)	S4 (cm)	S6 (cm)	S8 (cm)
AF	20.0 ± 1.14	21.33 ± 0.82	23.0 ± 1.26	24.75 ± 1.18	24.58 ± 0.49
PM <sub>2.5</sub>	20.0 ± 0.26	22.25 ± 0.71	22.94 ± 0.56	24.94 ± 0.68	24.87 ± 0.44
DRF	19.81 ± 1.03	22.06 ± 0.56	22.75 ± 0.75	25.0 ± 0.53	25.0 ± 0.60
PM <sub>2.5</sub> + DRF	20.0 ± 0.53	21.56 ± 0.42	23.5 ± 0.53	24.81 ± 0.59	24.75 ± 0.46

Se muestran los valores de la medición de la longitud de los 30 animales. Estos valores fueron determinados posterior a la exposición en las cámaras del VACES. Se muestra el promedio de los datos ± DE, n= 6.

**Tabla 9. Medición del peso de los animales.**

Grupo	S0 (g)	S1 (g)	S2 (g)	S3 (g)	S4 (g)	S6 (g)	S8 (g)
AF	166.0 ± 25.51	217.0 ± 33.26	257.33 ± 31.91	286.33 ± 32.37	311.67 ± 31.45	353.83 ± 32.74	370.33 ± 38.20
PM <sub>2.5</sub>	151.25 ± 19.96	218.0 ± 20.46	259.12 ± 18.67	290.12 ± 17.48	313.75 ± 17.43	357.62 ± 19.08	372.25 ± 19.42
DRF	165.62 ± 19.34	218.0 ± 17.53	255.62 ± 15.25	286.50 ± 15.38	309.37 ± 16.79	349.87 ± 20.55	368.25 ± 22.24
PM <sub>2.5</sub> + DRF	159.0 ± 10.29	211.62 ± 8.45	254.0 ± 10.42	287.5 ± 14.56	315.62 ± 17.65	359.50 ± 23.96	381.37 ± 28.06

Se observa el peso de 30 animales durante las semanas 0, 1, 2, 3, 4, 6 y 8 de exposición. El valor de la masa de los animales fue determinado posterior a su exposición en el VACES. Se muestra el promedio de los datos ± DE, n= 6.

Una vez obtenidos estos datos, la ganancia de peso promedio de cada grupo fue calculada; con los valores de la medición de curvatura y longitud de los animales se calcularon los valores de dos importantes índices de obesidad, el Índice de Masa Corporal (IMC) y el Índice de Lee. De la misma forma, y dado que la fructosa fue suplementada a los animales en agua de bebida, el consumo promedio de agua de los

animales durante las 8 semanas fue obtenido. Estos valores se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10. Determinaciones morfométricas de los animales.**

Grupo	Ganancia de peso (g)	Índice de masa corporal	Índice de Lee	Consumo promedio de agua (mL)
AF	204.3 ± 16.6	0.58 ± 0.04	0.288 ± 0.009	187.8 ± 28.76
PM <sub>2.5</sub>	221 ± 24.6	0.60 ± 0.01	0.289 ± 0.004	219.4 ± 26.57
DRF	202.6 ± 18.9	0.58 ± 0.01	0.285 ± 0.004	349.4 ± 39.99*** $\alpha\alpha\alpha$
PM <sub>2.5</sub> + DRF	222.3 ± 28.7	0.61 ± 0.02	0.291 ± 0.005	323.6 ± 25.06*** $\alpha\alpha\alpha$

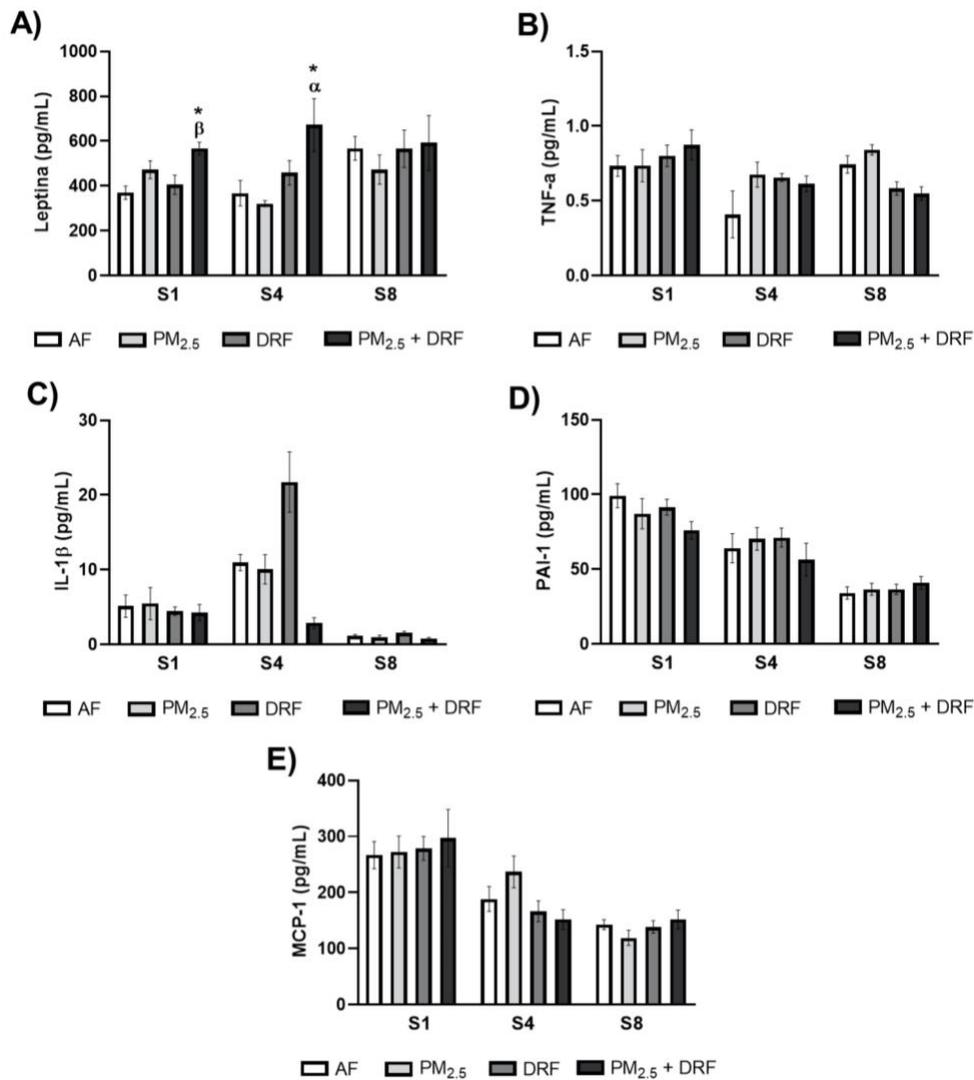
Los datos mostrados de la ganancia de peso hacen referencia al incremento de peso desde la semana 0 a la semana 8. Del consumo de agua, se obtuvieron los promedios de consumo de la semana 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8 de todos los animales. En el caso del IMC y el índice de Lee, fueron obtenidos con los datos de la semana 8. Valores significativos de \*\*\*p = 0.0001 comparado con el grupo AF;  $\alpha\alpha\alpha$ p = 0.0001 comparado con el grupo PM<sub>2.5</sub>. ANOVA de una vía, análisis post-hoc Bonferroni.

De todos los parámetros morfométricos e índices calculados, ninguno presentó un cambio estadísticamente significativo. A pesar de no contarse con datos completos de cada semana (no se contaron con datos de la semana 3), se decidió calcular un promedio general de consumo de agua de cada uno de los grupos de animales. Este consumo promedio de agua presentó un incremento estadísticamente significativo en los grupos de DRF y PM<sub>2.5</sub> + DRF. A pesar de no existir ningún cambio en la fisiología de los animales, fue necesario analizar los posibles cambios a nivel sistémico y tejido específicos causados por la exposición combinada del PM<sub>2.5</sub> + DRF.

### **3.4 Determinación de las concentraciones séricas de diferentes marcadores pro-inflamatorios.**

Cómo ya se mencionó, el PM<sub>2.5</sub> puede generar una respuesta inflamatoria, la cual ha sido estudiada principalmente en el sistema cardio-respiratorio. Además, esta misma respuesta inflamatoria se ha asociado a el daño del metabolismo y la RI. Basados en

lo anterior, la determinación de diferentes marcadores pro-inflamatorios (leptina, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PAI-1 y MCP-1) se realizó en suero. La Figura 7 muestra los niveles de estos marcadores durante las semanas 1, 4 y 8 de exposición.



**Figura 4. Determinación de las concentraciones séricas de marcadores pro-inflamatorios en los grupos de exposición.**

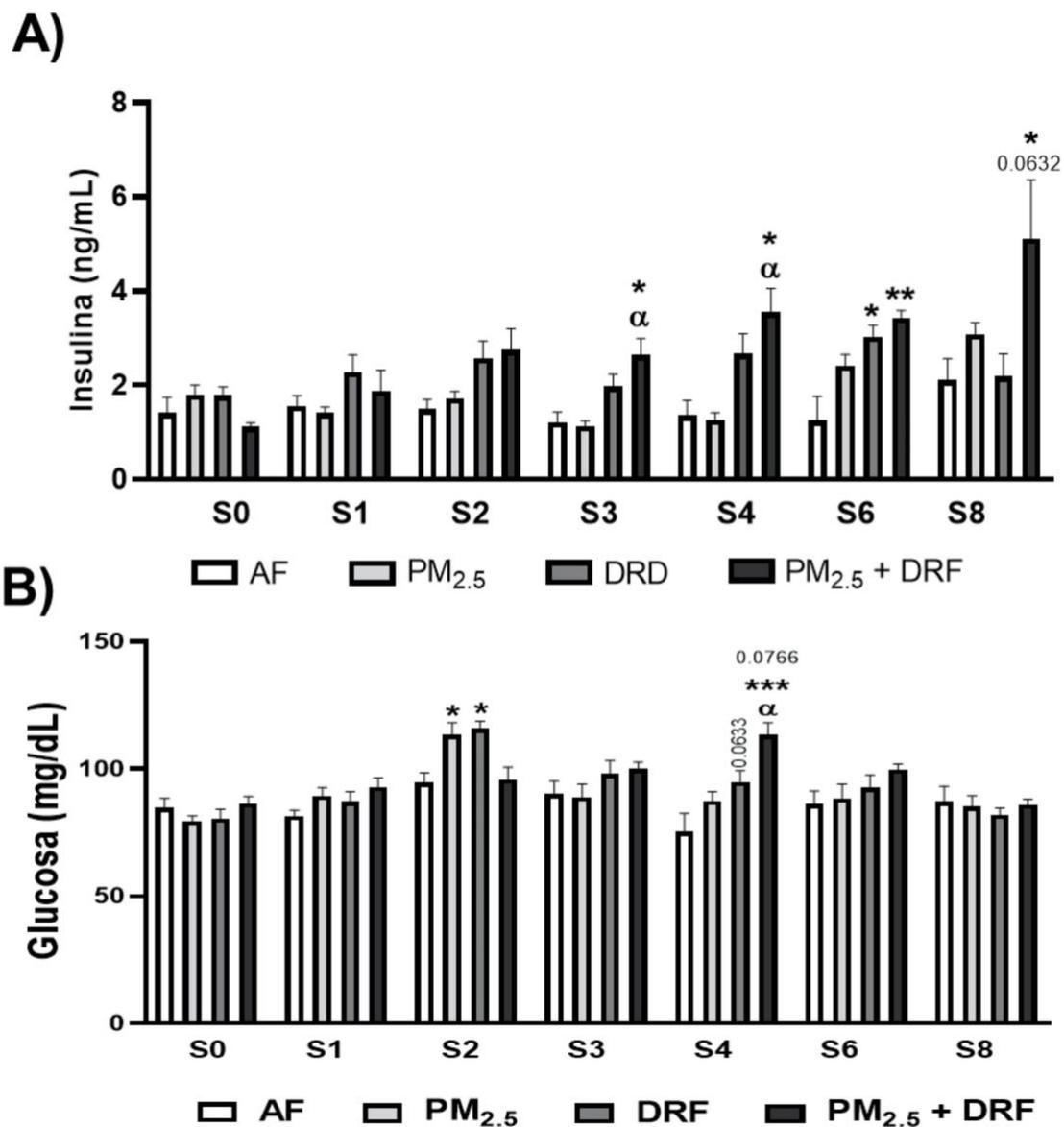
Durante la semana 1, 4 y 8 se determinó la concentración de leptina (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C), PAI-1 (D) y MCP-1 (E). Las barras muestran el promedio de cada grupo  $\pm$  EEM. Los valores corresponden al menos 6 animales por grupo. Valores significativos de \* $p = 0.05$ , comparado con el grupo AF;  $\alpha p = 0.05$  comparado con el grupo PM<sub>2.5</sub>;  $\beta p = 0.05$  comparado con el grupo DRF. Análisis de ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.

De los marcadores pro-inflamatorios determinados en la Figura 7, sólo la leptina mostró incrementos estadísticamente significativos. Durante la semana 1, el grupo de

exposición a PM<sub>2.5</sub> + DRF presentó un incremento significativo comparado con el grupo de AF y el grupo de la DRF; mientras que en la semana 4, este mismo grupo, presentó un incremento significativo comparado con el grupo de AF y el grupo de PM<sub>2.5</sub>. Estos resultados mostraron que sólo la leptina presentó un incremento en circulación a la primera y cuarta semana de exposición debido a la exposición combinada del PM<sub>2.5</sub> y la DRF.

### **3.5 Determinación de las concentraciones de insulina, glucosa y la curva de tolerancia a la glucosa (CTG)**

Dentro de los parámetros de monitoreo del buen funcionamiento del metabolismo de los animales, los niveles séricos de Ins y glucosa son de los más empleados. Estos valores permiten conocer de manera sistémica si el transporte y almacenamiento de glucosa se está llevando a cabo de manera adecuada en los organismos. La Figura 8 muestra las concentraciones promedio de Ins (A) y glucosa (B) en las semanas analizadas.



**Figura 5. Determinación de las concentraciones de insulina y glucosa durante varias semanas en los grupos de exposición.**

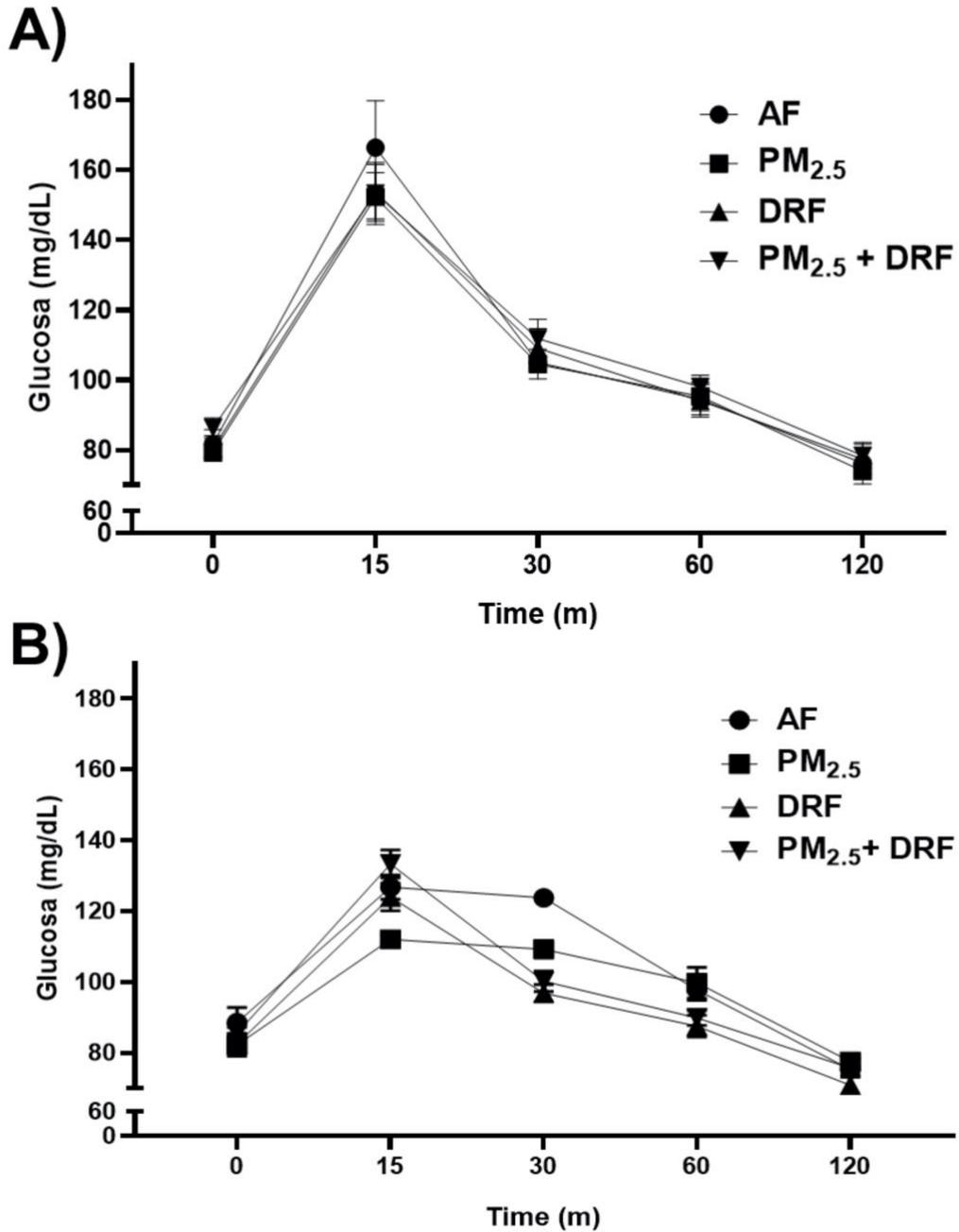
Durante el periodo de experimentación, desde la aclimatación y hasta el término de la exposición se determinaron las concentraciones de Ins y glucosa en el suero de las ratas Sprague Dawley. Las barras muestran el promedio de cada grupo  $\pm$  EEM. Los valores corresponden al menos 6 animales por grupo. Valores significativos de \* $p = 0.05$ , \*\* $p = 0.001$ , o \*\*\* $p = 0.0001$  comparado con el grupo AF;  $^{\alpha}p = 0.05$  comparado con el grupo PM<sub>2.5</sub>. ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.

En el caso de las concentraciones de Ins (Figura 8 A), destaca el grupo de exposición de PM<sub>2.5</sub> + DRF el cual presenta un incremento significativo desde la semana 3 hasta

la semana 8 comparado con el grupo de AF. De igual manera, este grupo presenta una diferencia significativa comparado con el grupo de PM<sub>2.5</sub> en las semanas 3 y 4, y un valor marginal significativo en la semana 8 ( $p = 0.0632$ ). Sólo durante la semana 6 el grupo de DRF presentó diferencia significativa comparado con el control.

Las concentraciones de glucosa (Figura 8 B) mostraron un incremento significativo sólo en las semanas 2 y 4. Durante la semana 2 tanto el grupo de PM<sub>2.5</sub> y el grupo de DRF presentaron un incremento comparado con el grupo AF. En la semana 4, el grupo PM<sub>2.5</sub> + DRF presentó un incremento significativo comparado con el grupo AF, PM<sub>2.5</sub> y un incremento marginal comparado con el grupo DRF ( $p = 0.0766$ ). En esta misma semana, el grupo de DRF presentó un incremento marginal comparado con el grupo de AF ( $p = 0.0633$ ).

De la misma forma, la CTG nos permite identificar si los organismos son capaces de captar y almacenar de manera correcta una concentración específica de glucosa en un lapso de 2 h. La CTG, fue determinada en la semana 0 (Figura 9 A) antes de iniciar la exposición a PM<sub>2.5</sub> y/o la DRF, y al final de esta exposición en la semana 8 (Figura 9 B).



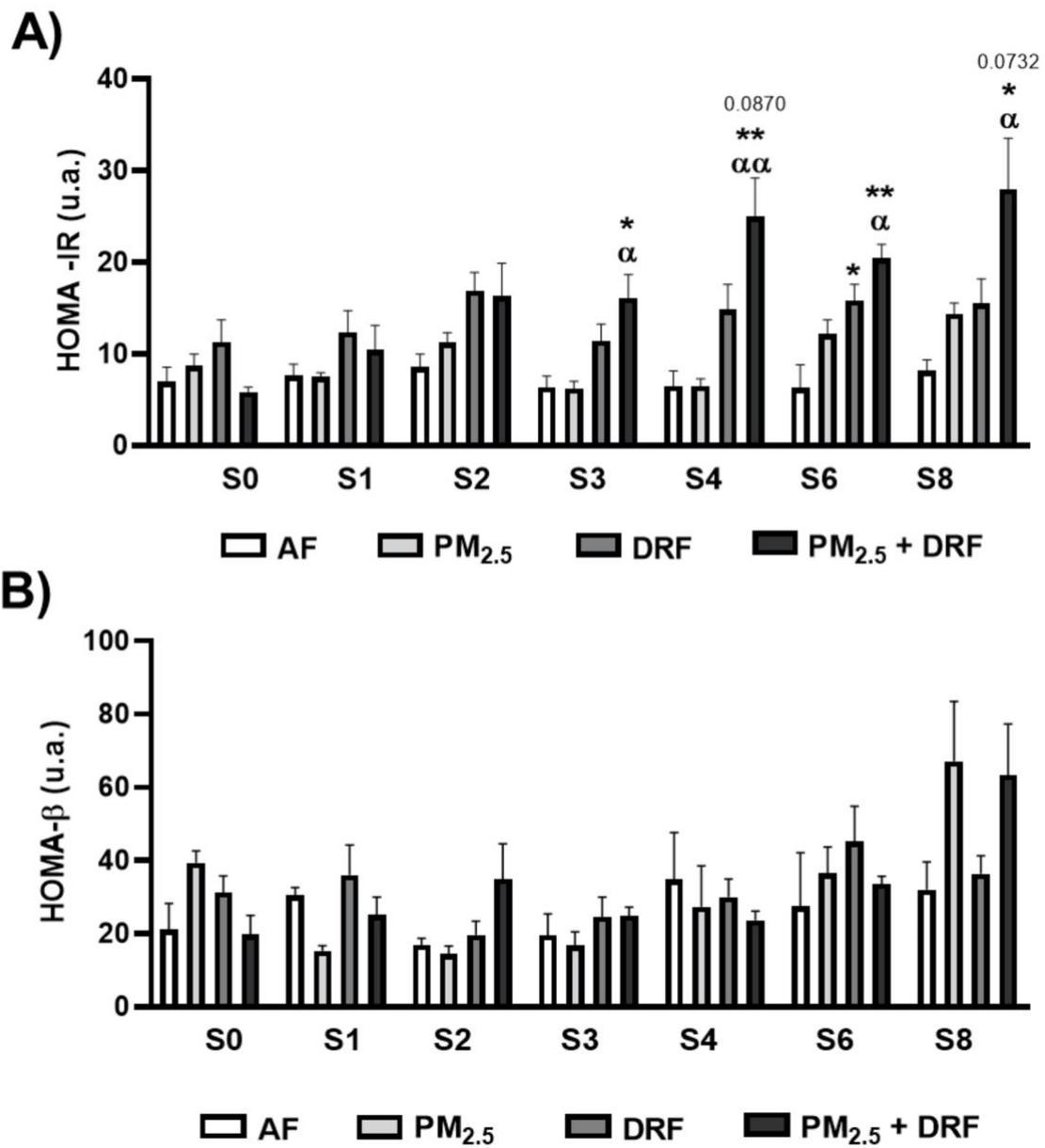
**Figura 6. Determinación de la curva de tolerancia a la glucosa en los grupos de exposición.**

Antes de la exposición al PM<sub>2.5</sub> y/o la DRF y después de 8 semanas de exposición, la determinación de la CTG se llevó a cabo. Cada punto muestra el promedio de cada grupo  $\pm$  EEM. Los valores corresponden al menos 6 animales por grupo. En ambas gráficas no se observaron diferencias significativas. ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.

Los resultados obtenidos tanto en la semana 0 como la semana 8 mostraron que ninguno de los grupos presentaba un cambio significativo en la captación de glucosa (Figura 9 A y B). Tanto las concentraciones de glucosa basal en diferentes semanas, como las concentraciones de la CTG nos muestran que después de 8 semanas de exposición al PM<sub>2.5</sub> y/o la DRF, no existe una alteración sobre la captación de este carbohidrato en las ratas Sprague Dawley. Sin embargo, las concentraciones de Ins obtenidos de estos animales principalmente en el grupo de PM<sub>2.5</sub> + DRF muestran un incremento significativo a partir de la semana 3 de exposición. Este incremento de Ins en los animales denota una hiperinsulinemia en este grupo causada por la exposición combinada de PM<sub>2.5</sub> y la DRF. Un cambio en los valores de insulina puede estar asociado a diferentes cambios dentro del estado metabólico de los organismos, este cambio debe ser investigado de manera sistémica y en los diferentes tejidos sensibles a la Ins.

### **3.6 Cálculo de los índices HOMA-IR y HOMA-β.**

Diferentes índices han sido empleados como herramientas para determinar el estado general de ciertos sistemas y posibles efectos en el organismo. Tal es el caso del HOMA-IR y el HOMA-β, los cuales permiten determinar si los individuos presentan un estado de RI, o si existe algún posible daño en la respuesta de las células β pancreáticas en la secreción de Ins; respectivamente. Por ello, se decidió realizar el cálculo de estos índices tal como se mencionó en el apartado de métodos. La figura 10 nos muestra los valores obtenidos del cálculo del HOMA-IR (A) y el HOMA-β (B) durante varias semanas.



**Figura 7. Cálculo de los valores de HOMA-IR y HOMA-β en los grupos de exposición.**

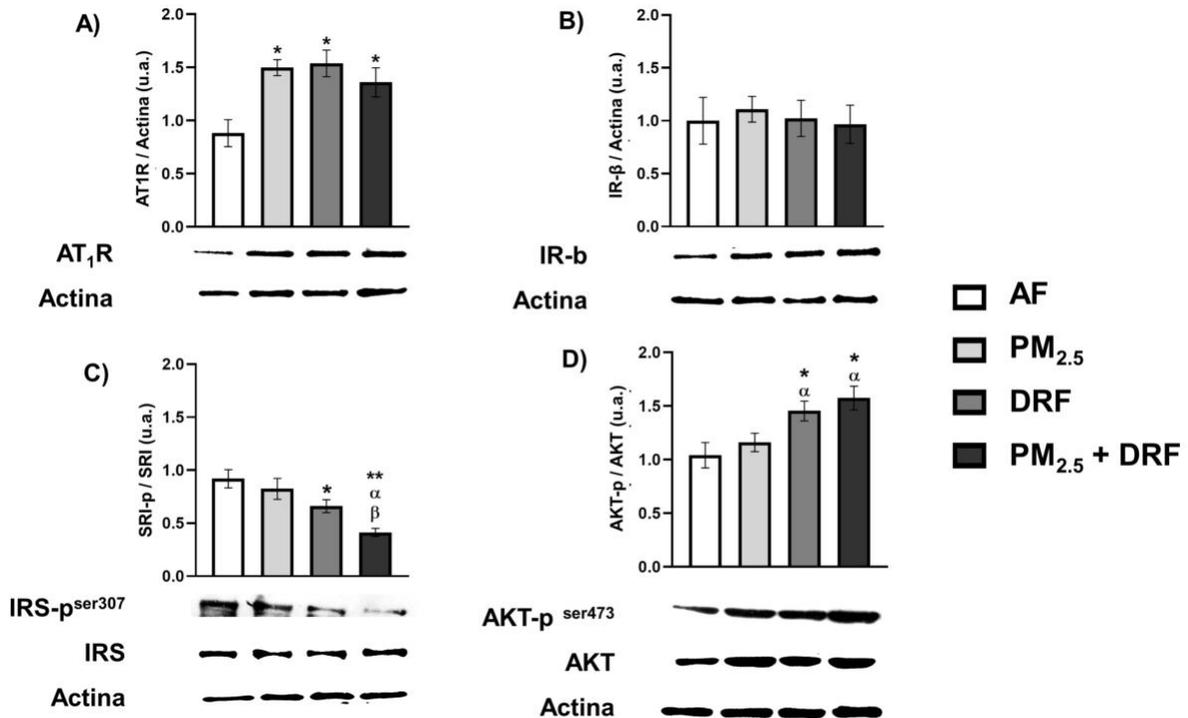
Durante varias semanas los valores de HOMA-IR y HOMA-β fueron determinados para determinar un posible efecto en el metabolismo sistémico de los animales. Cada barra representa el promedio de cada grupo ± EEM. Los valores corresponden al menos 6 animales por grupo. Valores significativos de \*p = 0.05, \*\*p = 0.001 comparado con el grupo AF; <sup>α</sup>p = 0.05, <sup>αα</sup>p = 0.001 comparado con el grupo PM<sub>2.5</sub>. ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.

Los valores obtenidos del HOMA-IR (Figura 10 A) han mostrado que existe un incremento significativo de este índice desde la semana 3 hasta la semana 8 en el grupo de PM<sub>2.5</sub> + DRF comparado con el grupo de AF y de PM<sub>2.5</sub>. Además, un incremento marginal de este grupo comparado con el grupo de DRF se observó en las semanas 4 y 8 ( $p = 0.0870$  y  $p = 0.0732$ , respectivamente). Sólo durante la semana 6 el grupo de DRF presentó un incremento significativo del valor de este índice comparado con el grupo de AF. De los valores obtenidos del HOMA- $\beta$  (Figura 10 B) no fue observado ningún cambio significativo en las semanas analizadas entre los grupos de exposición.

Los resultados obtenidos de los índices HOMA-IR y HOMA- $\beta$  muestran que desde la semana 3 la combinación de la exposición a PM<sub>2.5</sub> y la DRF generó RI en estos animales, la cual se mantuvo hasta el final de la exposición.

### **3.7 Determinación del efecto de hiperinsulinemia sobre la vía de la insulina/AKT en los tejidos sensibles a insulina.**

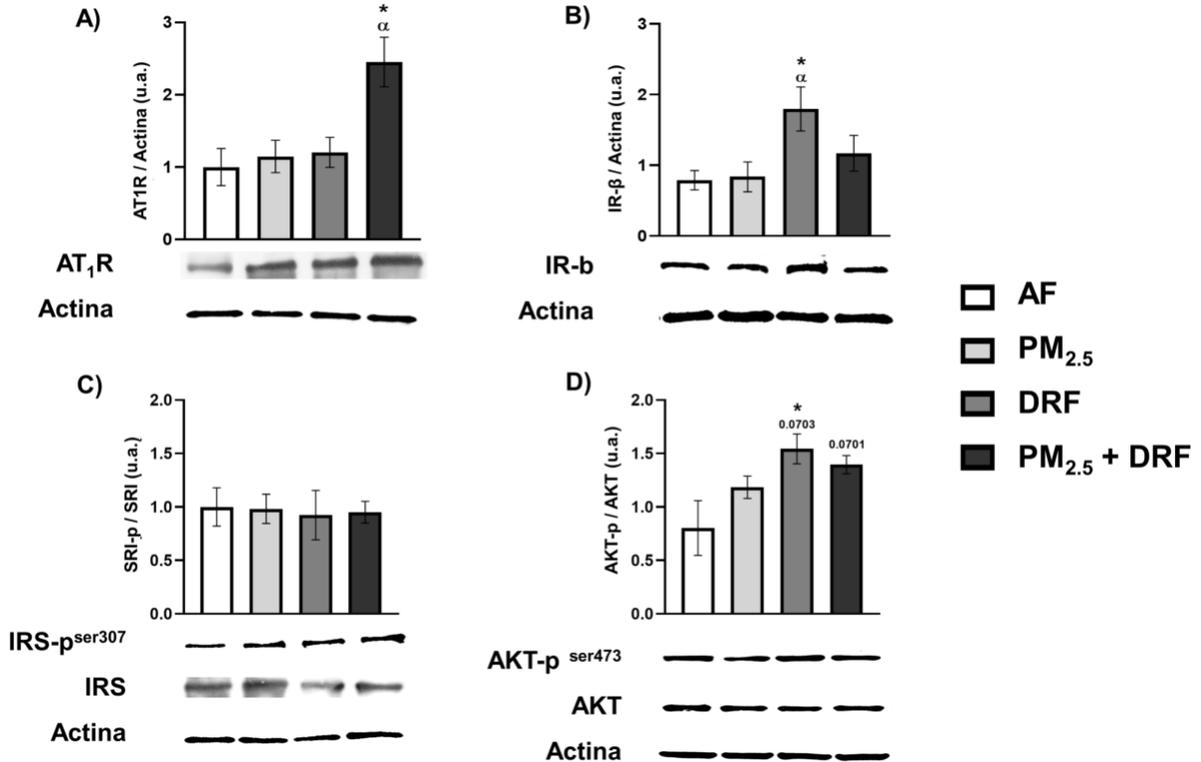
Debido al incremento sistémico de Ins, se decidió analizar el efecto de este incremento en diversos tejidos. Los principales tejidos donde la Ins ejerce su función metabólica son el hígado, el músculo y el tejido graso, puesto que en estos tejidos es posible metabolizar y/o almacenar a la glucosa. Por esta razón, estos tejidos fueron analizados. Cabe destacar que puesto que el pulmón es el tejido de entrada del PM<sub>2.5</sub> y generalmente es el tejido que se puede ver más afectado por este contaminante, el pulmón también fue analizado. Además del efecto sobre la vía de la Ins/AKT sobre estos tejidos, la expresión del receptor AT<sub>1</sub>R fue analizada con la finalidad de determinar su posible participación en la inhibición de la vía de la Ins. Las Figuras 11, 12, 13 y 14 muestran los resultados obtenidos sobre la expresión proteica del AT<sub>1</sub>R, el IR- $\beta$ , el IRS y el AKT al término de la exposición de 8 semanas.



**Figura 8. Evaluación de la alteración de la vía de la insulina/AKT en el pulmón de los grupos de exposición.**

Posterior al tratamiento fueron analizadas las diferentes proteínas. La expresión de AT<sub>1</sub>R (A), IR-β (B), IRS (C) y AKT (D) fueron determinadas. Cada barra representa el promedio de cada grupo ± EEM. Los valores corresponden al menos 6 animales por grupo. Valores significativos de \*p = 0.05, \*\*p = 0.001 comparado con el grupo AF; <sup>α</sup>p = 0.05 comparado con el grupo PM<sub>2.5</sub>; <sup>β</sup>p = 0.05 comparado con el grupo DRF. Análisis estadístico U de Mann Whitney.

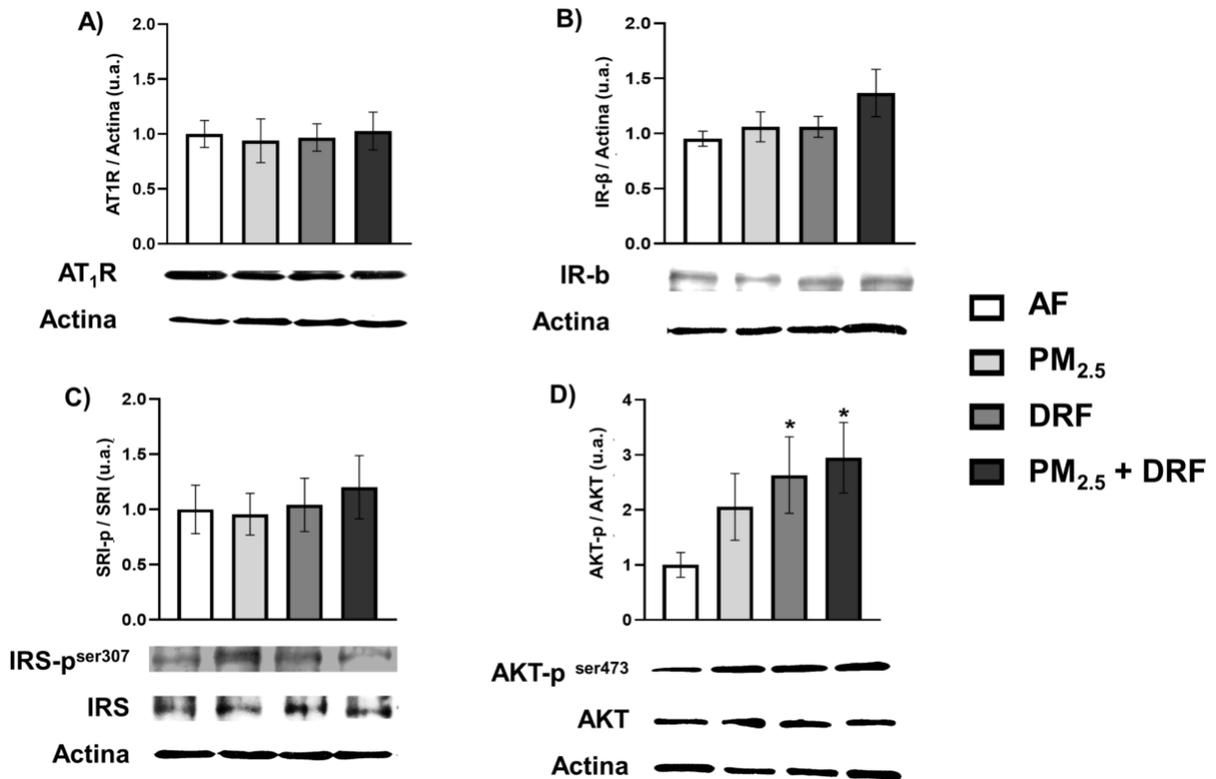
La Figura 11 muestra el efecto de los grupos de exposición sobre la expresión de las proteínas analizadas en pulmón. Se observó el incremento de la expresión del AT<sub>1</sub>R en los grupos de PM<sub>2.5</sub>, DRF y PM<sub>2.5</sub> + DRF comparados con el grupo AF (Figura 11A). También se observó la disminución significativa de la fosforilación del IRS por los grupos DRF comparado con el grupo AF, y la disminución por la exposición a PM<sub>2.5</sub> + DRF comparado con los otros grupos (Figura 11C). Finalmente, se observó el incremento de la fosforilación de AKT por la DRF y la combinación de PM<sub>2.5</sub> + DRF comparados contra el grupo de AF y PM<sub>2.5</sub> (Figura 11D). La expresión de IR-β no presentó un cambio significativo en ningún grupo.



**Figura 9. Evaluación de la alteración de la vía de la insulina/AKT en el hígado de los grupos de exposición.**

Posterior al tratamiento fueron analizadas diferentes proteínas. La expresión de AT<sub>1</sub>R (A), IR-β (B), IRS (C) y AKT (D) fueron determinadas. Cada barra representa el promedio de cada grupo ± EEM. Los valores corresponden al menos 6 animales por grupo. Valores significativos de \*p = 0.05 comparado con el grupo AF; <sup>α</sup>p = 0.05 comparado con el grupo PM<sub>2.5</sub>. Análisis estadístico U de Mann Whitney.

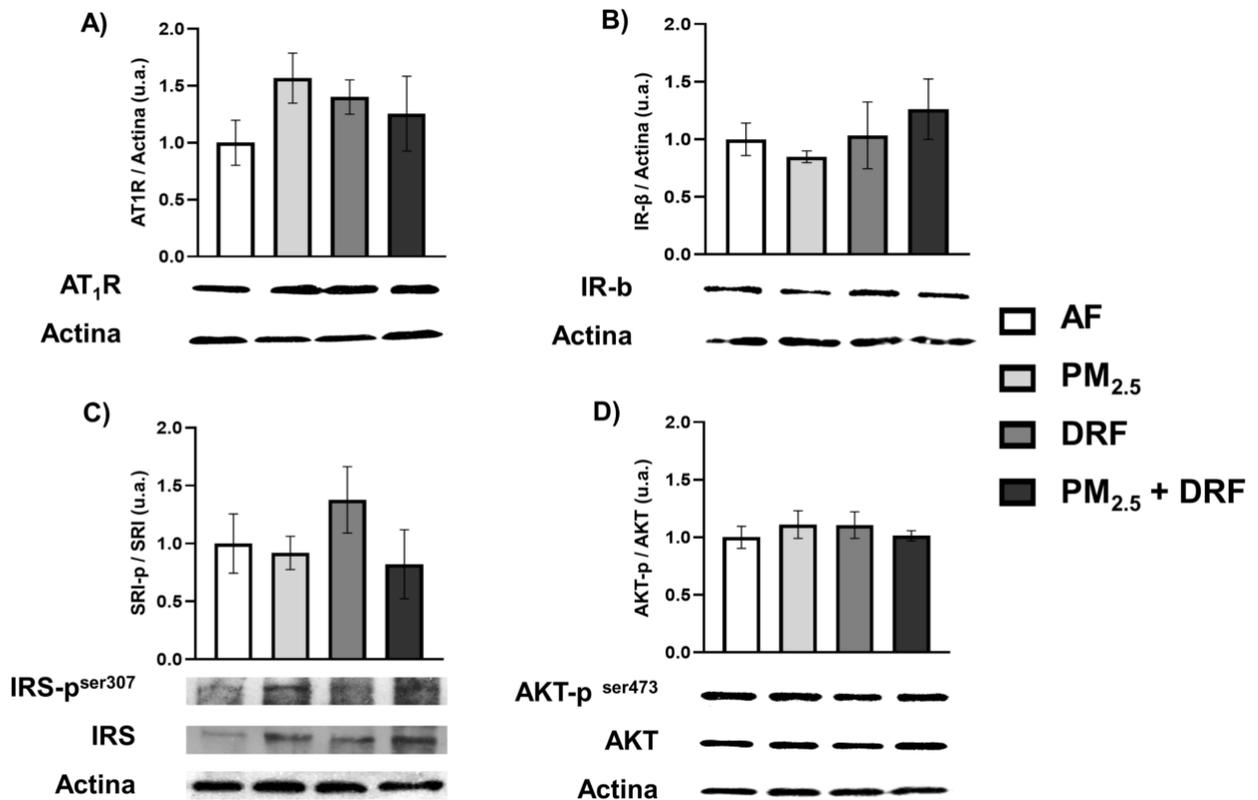
Los resultados de la expresión de AT<sub>1</sub>R (A), IR-β (B), IRS (C) y AKT (D) en el hígado, se muestran en la Figura 12. La expresión de AT<sub>1</sub>R aumentó en el grupo de PM<sub>2.5</sub> + DRF comparado con el grupo de AF y PM<sub>2.5</sub>. En el caso de IR-β, su expresión se vio incrementada en el grupo de DRF comparada con los grupos AF y PM<sub>2.5</sub>. La fosforilación de AKT también aumentó en el grupo de DRF comprada con el grupo AF, y marginalmente comparada contra el grupo de PM<sub>2.5</sub> (p = 0.0703). Esta misma proteína presentó un incremento marginal en el grupo de PM<sub>2.5</sub> + DRF comparada con el grupo de AF (p = 0.0701). La expresión de la fosforilación de IRS no se vio afectada en ninguno de los grupos de exposición.



**Figura 10. Evaluación de la modificación de la vía de la insulina/AKT en el músculo de los grupos de exposición.**

Posterior al tratamiento fueron analizadas diferentes proteínas. La expresión de AT<sub>1</sub>R (A), IR-β (B), IRS (C) y AKT (D) fueron determinadas. Cada barra representa el promedio de cada grupo ± EEM. Los valores corresponden al menos 6 animales por grupo. Valores significativos de \*p = 0.05 comparado con el grupo AF. Análisis estadístico U de Mann Whitney.

En el caso del tejido muscular, la expresión de AT<sub>1</sub>R (A), IR-β (B), IRS (C) y AKT (D) fueron analizadas (Figura 13). Sólo se observó el incremento significativo de la fosforilación de AKT en los grupos de DRF y PM<sub>2.5</sub> + DRF comparados con el grupo de AF.



**Figura 11. Evaluación de la alteración de la vía de la insulina/AKT en el tejido graso de los grupos de exposición.**

Posterior al tratamiento fueron analizadas diferentes proteínas. La expresión de AT<sub>1</sub>R (A), IR-β (B), IRS (C) y AKT (D) fueron determinadas. Cada barra representa el promedio de cada grupo ± EEM. Los valores corresponden al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico U de Mann Whitney.

La Figura 14 muestra la expresión de AT<sub>1</sub>R (A), IR-β (B), IRS (C) y AKT (D). En el tejido graso no se observaron diferencias significativas en la expresión de ninguna de estas proteínas.

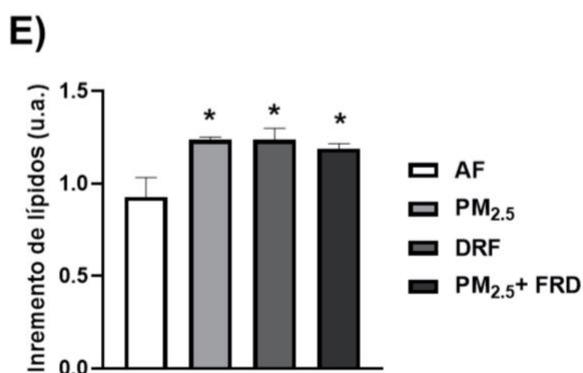
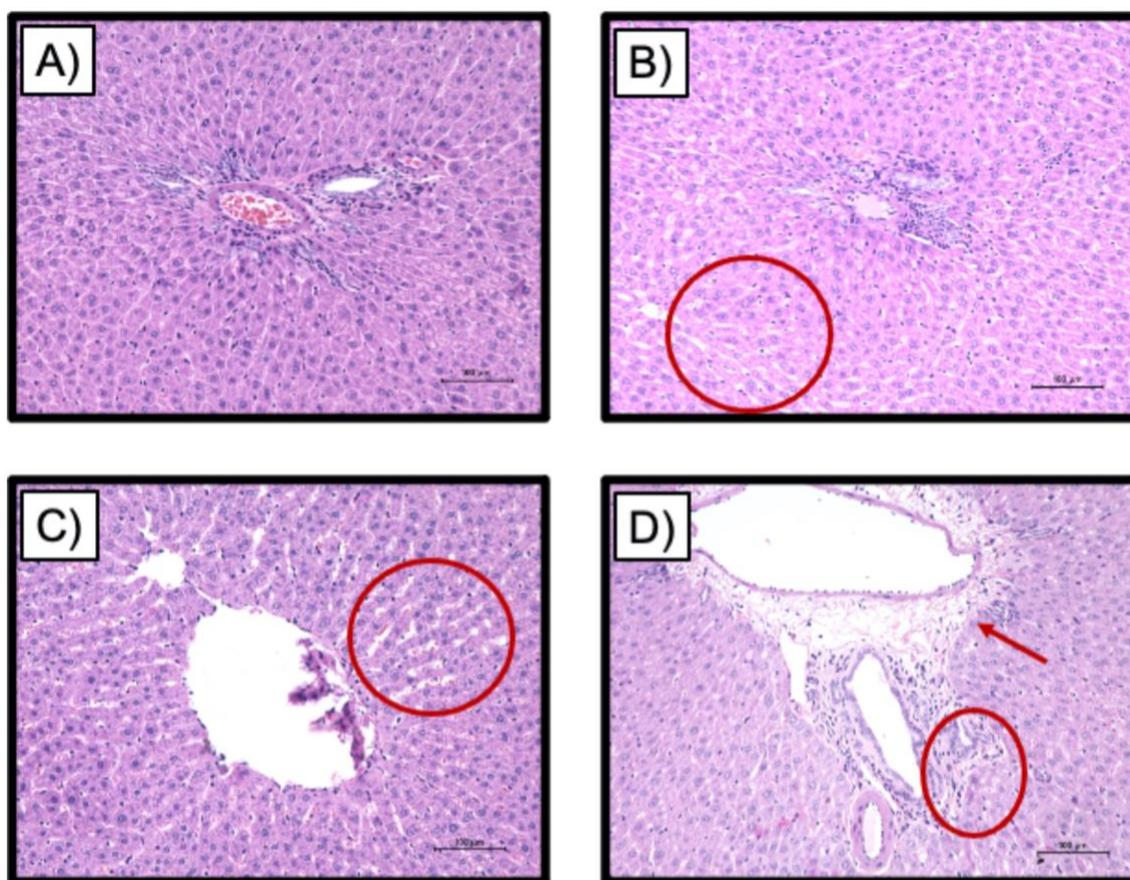
De manera general, el estado sistémico de la RI observado en la exposición conjunta de PM<sub>2.5</sub> y la DRF generó un cambio en la expresión de diversas proteínas de la vía de la Ins/AKT. Donde, se pudo observar que esta disrupción se presentó de manera más evidente sobre las proteínas del pulmón y el hígado, mientras que en músculo esquelético sólo se observó un cambio en la expresión de AKT. No se observaron cambios en la expresión de las proteínas del tejido graso. Además del daño generado

e la vía de la Ins/AKT, es importante determinar el posible efecto que esta exposición combinada pueda llegar a generar sobre la estructura de estos tejidos.

### **3.8 Determinación del daño estructural de los tejidos sensibles a la insulina y el páncreas.**

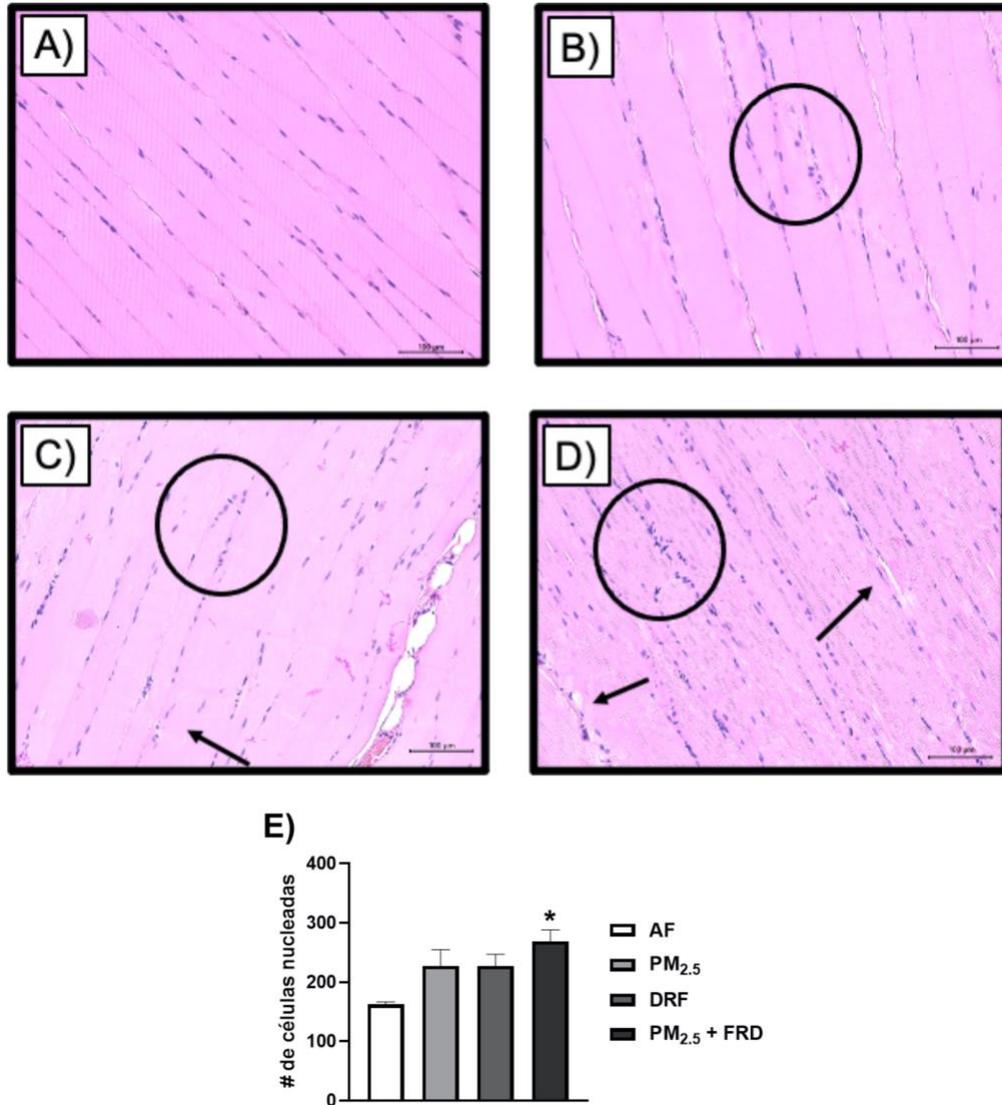
El estado sistémico de la RI, así como el cambio en la expresión de diferentes proteínas en los tejidos sensibles a la Ins pueden generar un cambio y posibles daños en la estructura de estos tejidos. Por ello, se analizó la estructura del hígado, el músculo esquelético y el tejido graso. En este sentido, y dado que el daño sistémico se vio generado por el incremento sistémico de Ins, la estructura del páncreas de los animales también fue analizada. Las Figuras 15, 16, 17, 18 y 19 muestran las imágenes obtenidas de estos tejidos teñidos con los colorantes hematoxilina y eosina. Las imágenes obtenidas del hígado de los animales del grupo de AF mostraron la estructura común del hígado, con las células hepáticas en forma de poliedros interconectados, y la presencia de la triada portal (Figura 15 A). En el caso de los otros grupos PM<sub>2.5</sub> (B), DRF (C) y PM<sub>2.5</sub> + DRF (D) se observan estas mismas estructuras, sin embargo, destaca la presencia de lípidos entre algunas zonas de hepatocitos y cerca de los vasos (zonas marcadas por los círculos rojos). Esta presencia de lípidos fue cuantificada (Figura 15 E) mostrando un incremento significativo de los lípidos en los grupos de PM<sub>2.5</sub>, DRF y PM<sub>2.5</sub> + DRF comparados con el grupo de AF.

La observación al microscopio del tejido musculo esquelético mostró la presencia de las fibras musculares bien arregladas y la presencia de los núcleos eosinófilos de estas fibras en el grupo AF (Figura 16 A). Estas mismas estructuras se encontraron presentes en los otros grupos. Sin embargo, el daño de las fibras musculares en ciertas zonas se observó en los grupos de DRF (C) y PM<sub>2.5</sub> + DRF (denotado por las flechas negras). Además, un incremento en el número de núcleos fue observado (círculos negros). Este posible incremento fue cuantificado, y se observó un incremento significativo del número de núcleos en el grupo de PM<sub>2.5</sub> + DRF comparado con el grupo de AF (Figura 16 E).



**Figura 12. Análisis de la estructura del hígado de los grupos de exposición.**

Posterior al tratamiento fue analizado el hígado de los animales de cada grupo de exposición. Imágenes representativas del grupo de AF (A), PM<sub>2.5</sub> (B), DRF (C) y PM<sub>2.5</sub> + DRF (D) fueron seleccionadas (20x aumento). Los círculos y la flecha roja son indicativo de las zonas con presencia de lípidos. Las zonas lipídicas fueron cuantificadas (E). Al menos 2 animales se analizaron por grupo. Valores significativos de \* $p = 0.05$  comparado con el grupo AF. ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



**Figura 13. Análisis de la estructura del músculo esquelético de los grupos de exposición.**

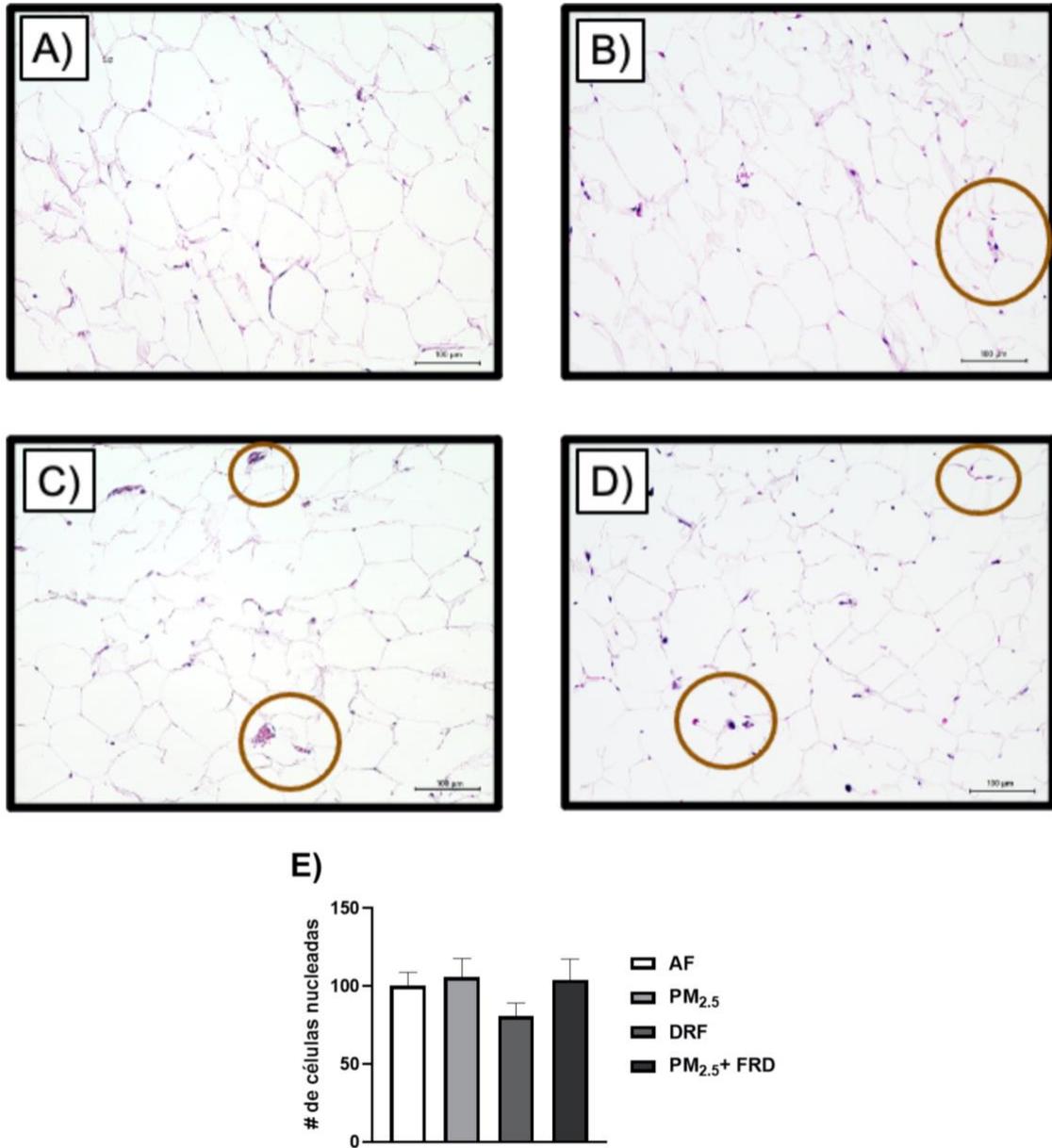
Posterior al tratamiento fue analizado el músculo esquelético de los animales de cada grupo de exposición. Imágenes representativas del grupo de AF (A), PM<sub>2.5</sub> (B), DRF (C) y PM<sub>2.5</sub> + DRF (D) fueron seleccionadas (20x aumento). Los círculos negros seleccionan las áreas con aumento de celularidad, las flechas negras son indicativo de las zonas de daño en el músculo. El número de células nucleadas fue cuantificado (E). Al menos 2 animales se analizaron por grupo. Valores significativos de \* $p = 0.05$  comparado con el grupo AF. ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.

En el caso del tejido graso, y debido a que este en su mayoría está formado por lípidos, solo es posible observar delimitada la membrana de las células lipídicas, así como la

presencia del núcleo a las orillas de cada célula (Figura 17 A) en el grupo de AF. En los grupos expuestos, PM<sub>2.5</sub> (B), DRF (C) y PM<sub>2.5</sub> + DRF fueron observadas las mismas estructuras. En estos grupos la presencia de un mayor número de núcleos fue observado (círculos color café), sin embargo, la cuantificación del número de núcleos no demostró un cambio significativo en el número de núcleos.

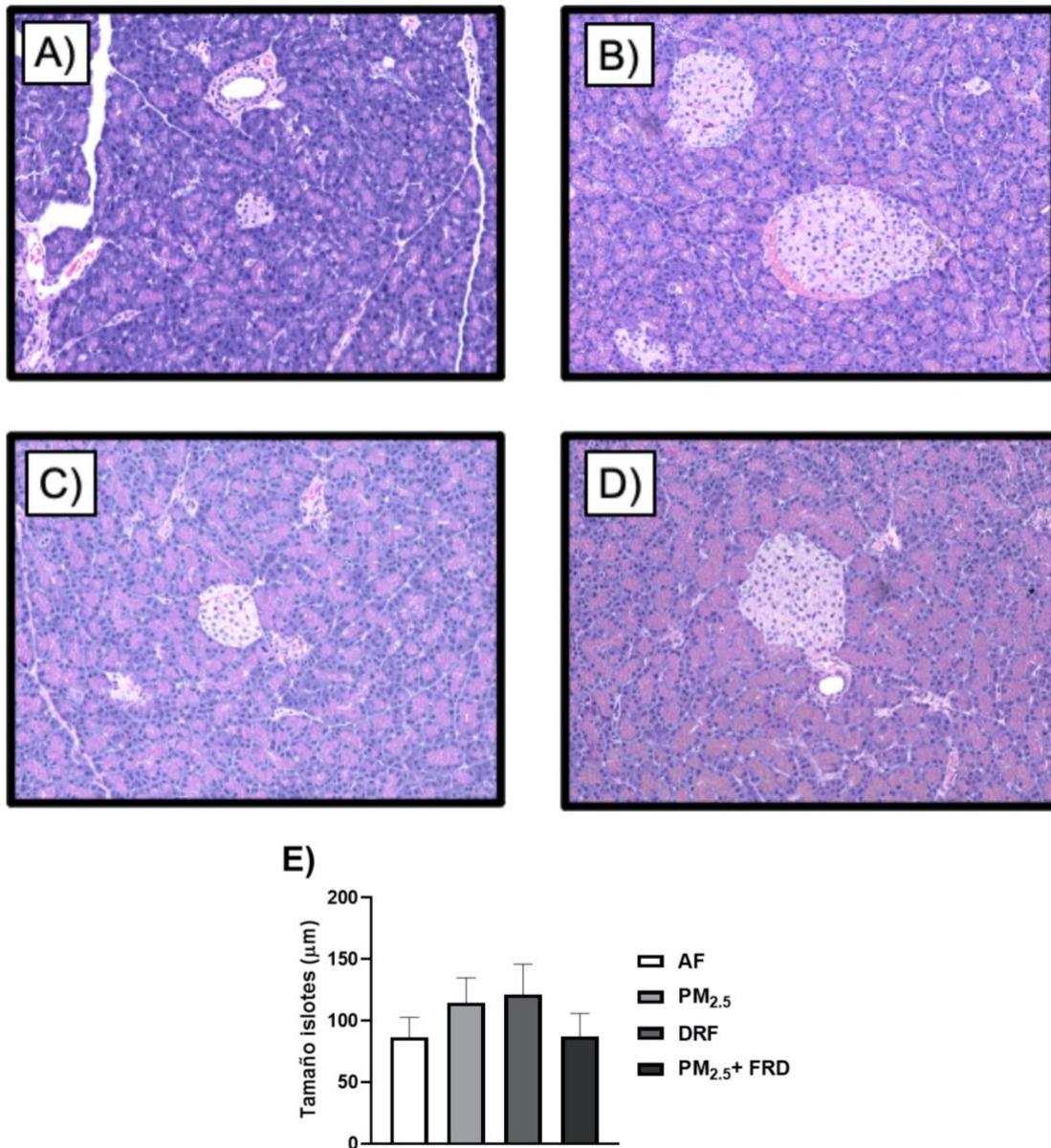
En el caso de las imágenes obtenidas de páncreas se realizaron dos análisis. El primero un análisis macrométrico de la estructura del tejido y sus posibles modificaciones, en conjunto con el tamaño de los islotes de Langerhans. Las imágenes del grupo de AF muestran las estructuras características del páncreas exocrino y el páncreas endócrino (islotes de Langerhans). De manera general, todos los grupos presentaron estas estructuras (Figura 18 B, C, D). Al observar las distintas imágenes de este tejido bajo los diferentes grupos de exposición se observaban diferentes tamaños de los islotes, por lo que se procedió a determinar su tamaño. La Figura 18 E muestra en promedio estas mediciones, en la cuales no se observaron diferencias significativas a pesar de los observado.

Al realizar un acercamiento sobre los islotes se observaron diferencias en las estructuras nucleares, donde fue observada la presencia de pequeños gránulos eosinófilos en los grupos de PM<sub>2.5</sub> (B), DRF (C) y PM<sub>2.5</sub> + DRF (las zonas se denotaron por los círculos rojos, y se hizo una magnificación de estas zonas). Para determinar si existía un efecto sobre el incremento de estos gránulos se llevó a cabo un análisis semicuantitativo. Como la Figura 19 E lo muestra, a pesar de no haber un incremento significativo, el grupo de PM<sub>2.5</sub> presentó un incremento marginalmente significativo comparado con el grupo de AF y la DRF ( $p = 0.0781$  y  $p = 0.0709$ , respectivamente). El grupo de la exposición combinada de PM<sub>2.5</sub> + DRF mostro sólo una tendencia al incremento de esta granularidad.



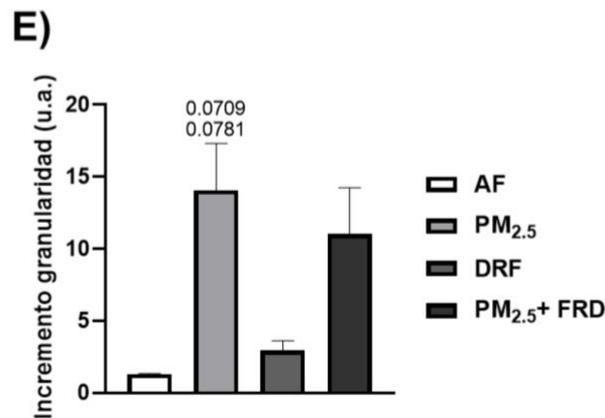
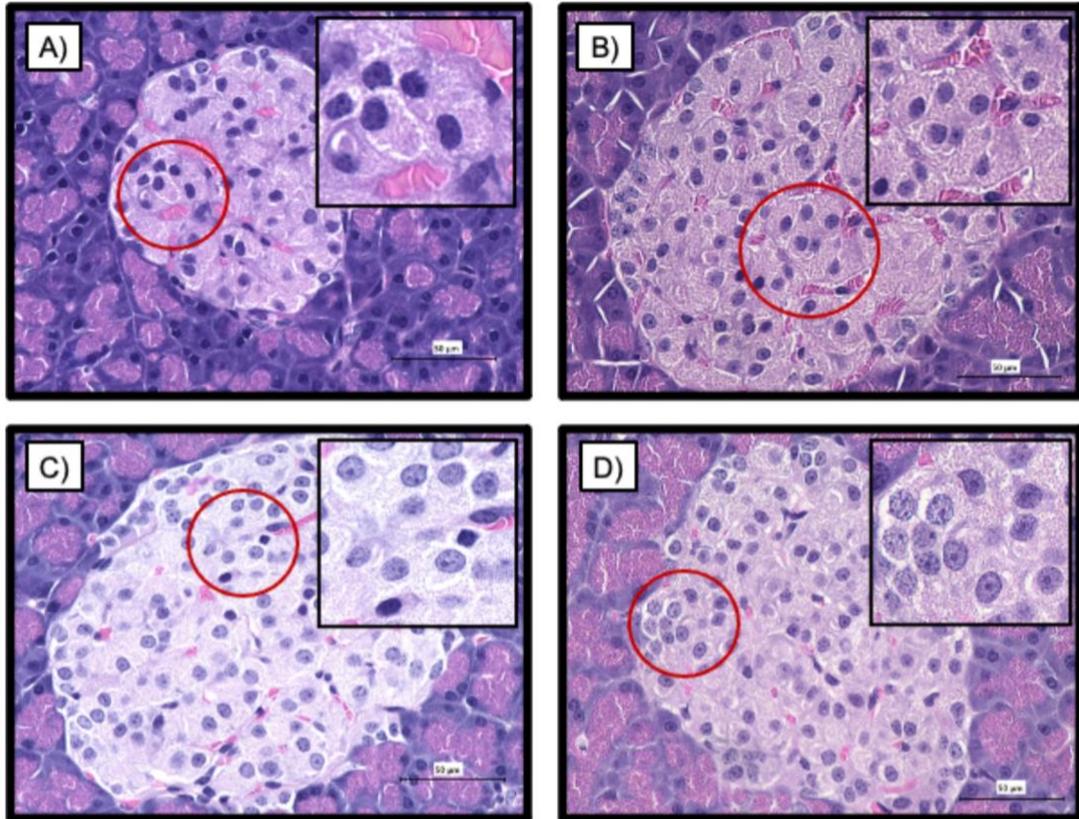
**Figura 14. Análisis de la estructura del tejido graso de los grupos de exposición.**

Posterior al tratamiento fue analizado el tejido graso de los animales de cada grupo de exposición. Imágenes representativas del grupo de AF (A), PM<sub>2.5</sub> (B), DRF (C) y PM<sub>2.5</sub> + DRF (D) fueron seleccionadas (20x aumento). Los círculos color café muestran las áreas con aumento de celularidad. El número de células nucleadas fue cuantificado. Al menos 2 animales se analizaron por grupo. ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



**Figura 15. Análisis de la estructura del páncreas de los grupos de exposición.**

Posterior al tratamiento fue analizado el páncreas de los animales de cada grupo de exposición. Imágenes representativas del grupo de AF (A), PM<sub>2.5</sub> (B), DRF (C) y PM<sub>2.5</sub> + DRF (D) fueron seleccionadas (20x aumento). Los islotes se denotan por una coloración morada menos intensa. El tamaño de estos islotes fue medido (E). Al menos 2 animales se analizaron por grupo. ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.



**Figura 16. Análisis de la estructura de los islotes d Langerhans de los grupos de exposición.**

Posterior al tratamiento fue analizado los islotes te Langerhans de los páncreas de los animales de cada grupo de exposición (60x aumento). Imágenes representativas del grupo de AF (A), PM<sub>2.5</sub> (B), DRF (C) y PM<sub>2.5</sub> + DRF (D) fueron seleccionadas. Los círculos azules representan zonas específicas de los islotes, una magnificación de estos islotes se observa en la esquina superior derecha. El incremento de la granularidad de los núcleos fue medido (E). Al menos 2 animales se analizaron por grupo. ANOVA de una vía, *post hoc* Bonferroni.

Nuestros resultados sugieren que la exposición combinada de PM<sub>2.5</sub> y la DRF mostró la inducción del daño en las estructuras del hígado (incremento de lípidos) y del músculo esquelético (aumento de células nucleadas y desgaste del tejido), estos datos siendo concordantes con los cambios vistos en la sección anterior, donde estos tejidos presentaron modificaciones en la vía de la Ins/AKT.

#### **4. Discusión**

Diferentes investigaciones han mostrado que existe una relación entre la dieta, el estilo de vida y la exposición a PM<sub>2.5</sub>, sin embargo, no todos los mecanismos ni los efectos causados por el PM<sub>2.5</sub> sobre el metabolismo de los organismos ha sido completamente comprendido. En este trabajo, se buscó evaluar el efecto del PM<sub>2.5</sub> sobre la alteración de la vía de la Ins y la alteración de la actividad metabólica *in vivo* en ratas Sprague Dawley expuestas a PM<sub>2.5</sub>, una DRF o la combinación de PM<sub>2.5</sub> + DRF. De manera general, nuestros resultados mostraron que la combinación de PM<sub>2.5</sub> + DRF el provocó el incremento de las concentraciones séricas de leptina e insulina (hiperinsulinemia) en diferentes semanas de exposición. El incremento de la expresión del receptor AT<sub>1</sub>R (pulmón e hígado) y la disrupción de la vía de la Ins/AKT (pulmón, hígado y músculo); así como el daño en la estructura del hígado, el músculo esquelético y el páncreas. Todos estos daños generados por un estado de RI en los animales expuestos a la combinación de PM<sub>2.5</sub> + DRF.

##### **4.1 Caracterización de la composición del PM<sub>2.5</sub>**

La composición y concentración del PM son factores importantes por considerar para determinar los efectos biológicos observados. Como se mencionó en la sección anterior el promedio de exposición semanal ( $337.5 \pm 101.03 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) en los animales fue 10 veces mayor a la concentración encontrada en aire ambiente. Las concentraciones empleadas en nuestro estudio son muy elevadas comparadas con las que comúnmente se reportan en estudios epidemiológicos, estos estudios suelen mostrar un efecto en la salud de los individuos en concentraciones muy bajas. Sin embargo, se debe considerar que estos estudios toman en cuenta a subgrupos considerados como altamente sensibles (niños, personas mayores o individuos con enfermedades pre-existentes). Además, si consideramos que los seres humanos estamos expuestos a estos contaminantes las 24 h del día los 7 días de la semana, las concentraciones de exposición entre los individuos y los animales de este estudio pueden encontrarse en el mismo orden. Si se considera que un ser humano inhala 11,000 L de aire al día, y tomando en cuenta el promedio diario durante las semanas de exposición, un ser humano promedio estuvo expuesto a alrededor de  $337.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$

al día durante este mismo periodo de tiempo. Si se considera la contaminación presente en ciudades altamente pobladas y contaminadas, estas han reportado concentraciones similares a las empleadas en nuestro estudio. Diferentes ciudades y regiones en el mundo han reportado concentraciones altas de PM<sub>2.5</sub>; la región de Beijing-Taijing-Hebei en China, Lucknow en India, o Gaziabad en India han reportado concentraciones máximas mensuales de PM<sub>2.5</sub> en un rango entre 371 – 499 µg/m<sup>3</sup>, 91 – 186 µg/m<sup>3</sup> y 67 – 175 µg/m<sup>3</sup>, respectivamente (Kumar & Dwivedi, 2021; Yang, et al., 2022).

Las fuentes de emisión de los componentes del PM<sub>2.5</sub> pueden ser trazados por la presencia de compuestos específicos. El Benzo[*ghi*]perileno, indeno[*1,2,3-cd*]pireno y el dibenzo[*a,h*]antraceno son compuestos trazables provenientes de la combustión de diesel y gasolina (Amador-Muñoz et al., 2013; Srogi et al., 2007). La presencia de los alcanos con más de 27 carbonos en su estructura ha sido asociada con fuentes de emisión biogénica (generados por abrasión mecánica de hojas de plantas, ceras, residuos de vegetación y erosión del suelo); mientras que, aquellos alcanos con estructuras formadas por menos de 27 carbonos se han asociado a fuentes petrogénicas (siendo el tetracosano y el pentacosano los principales derivados de combustibles fósiles) (Amador-Muñoz et al., 2011). En el caso de los ftalatos, su presencia en el ambiente se asocia con el uso de estos compuestos como plastificantes dentro de la industria de los plásticos, donde podrían dispersarse en el aire, se han encontrado en la actualidad altas concentraciones en zonas urbanas de estos compuestos (Kashyap & Agarwal, 2018). Diferentes metales y metales de transición en el aire están asociados a fuentes de emisión como la minería, plantas de poder, emisiones de diesel, aditivos presentes en el aceite de motor y el desgaste de frenos o neumáticos (Aguilera et al., 2021; Srivastava et al., 2021). Como se muestra en las tablas 4 y 5 la presencia de HAP, alcanos, ftalatos, y metales o de transición se encontraban presentes en diferentes proporciones en el PM<sub>2.5</sub> al que los animales estuvieron expuestos. Estos compuestos además de ser característicos de ciertas fuentes de emisión nos permiten obtener información sobre las fuentes de contaminación más abundantes de la zona norte de la Ciudad de México y para efectos

prácticos de esta investigación nos permiten buscar asociaciones entre estos componentes y los efectos metabólicos que estos compuestos pudieran generar en los animales.

#### **4.2 Efecto en el metabolismo de los componentes del PM<sub>2.5</sub>**

Ya ha sido bien estudiado el poder oxidante de los HAP (por su metabolismo y la formación de quinonas), así como de los metales (reacciones Fenton y Haber-Weiss) en los diferentes modelos biológicos (Lodovici & Bigagli, 2011; Pereira et al., 2012). Este incremento de la respuesta oxidante en los organismos puede llevar a la activación de diferentes vías de señalización y proteínas (NF- $\kappa$ B, MAP cinasa) que son fundamentales para la activación y el desarrollo de la respuesta inflamatoria (Biswas et al., 2016; Wang et al., 2019). Además, los componentes del PM<sub>2.5</sub> han sido relacionados con diferentes efectos metabólicos. La presencia de HAP en humanos ha sido asociada con el incremento de las concentraciones de glucosa, síndrome metabólico y dislipidemias en adolescentes y población adulta (Li et al., 2021; Ma et al., 2019). Los ftalatos y sus metabolitos encontrados en orina se han asociado con el incremento de hemoglobina glucosilada, glucosa e Ins en ayunas así como incremento en los índices de HOMA-IR y HOMA- $\beta$  en una población canadiense (Dales et al., 2018). La exposición a diferentes metales, metaloides y metales de transición han mostrado su participación en el daño metabólico: el arsénico ha mostrado la capacidad de inducir la disrupción de la vía de la Ins/AKT en músculo esquelético, tejido adiposo y páncreas; el cadmio ha incrementado los niveles de glucosa en ayunas en animales; el níquel exacerba el efecto de la RI causado por el PM<sub>2.5</sub> al incrementar las concentraciones de glucosa y el índice HOMA-IR en animales (Chen et al., 2009; Xu et al., 2012). Asimismo, la endotoxina por sí sola puede generar un proceso inflamatorio tejido específico llevando a hiperinsulinemia, concentraciones incrementadas de glucosa y la generación de RI (Cani et al., 2007). En conjunto, los componentes orgánicos, inorgánicos y biológicos presentes en el PM<sub>2.5</sub> pueden contribuir al desarrollo de la RI y el desbalance del metabolismo en los animales.

Se ha reportado que la exposición crónica (17 semanas) al PM<sub>2.5</sub> puede llevar a la generación de RI sistémica en ratones C57BL/6, donde observaron un incremento de lípidos en hígado, niveles anormales de la fosforilación de AKT e infiltrado de macrófagos en tejido adiposo, la reducción del transportador GLUT-4 en músculo esquelético e intolerancia a la glucosa. Otra investigación reportó que la exposición por 12 semanas a PM<sub>2.5</sub> en ratones C57BL/6 llevó a la RI caracterizado por intolerancia a la glucosa, daño hepático, incremento del índice HOMA-IR e inhibición de la vía de la Ins/AKT en el hígado (Xu et al., 2017). Al igual que la exposición a lo componentes del PM<sub>2.5</sub>, este contaminante es capaz de llevar a la RI, pero es importante considerar el tiempo de exposición, la concentración a la que los animales se encontraron expuestos, así como la composición específica de este. En el caso de nuestra investigación, la exposición realizada fue una exposición sub-crónica, donde los resultados del grupo de PM<sub>2.5</sub> mostraron que la exposición por si sola a este contaminante en las condiciones dadas no genera el daño suficiente para llevar a la RI. Sin embargo, es necesario considerar otro factor importante que contribuye al desarrollo de la RI, la dieta y de manera más específica la dieta rica en fructosa.

#### **4.3 Efecto del modelo de dieta rica en fructosa (DRF)**

En la actualidad la presencia y el consumo de fructosa en los seres humanos ha ido en aumento (Lancaster, 2020), llevando a los seres humanos a estar expuestos a otro factor de riesgo que contribuye a la generación de enfermedades degenerativas relacionadas con el metabolismo. En los animales, concentraciones altas de fructosa en la dieta (DRF) ya sea de manera sub-crónica o crónica pueden generar diversos daños en los tejidos sensibles a Ins. El metabolismo de la fructosa en el hígado lleva a la generación de ácido úrico y al incremento en la síntesis de novo de lípidos como subproductos de este metabolismo. Ambos productos son capaces de incrementar el estrés oxidante y la inflamación en tejidos, la acumulación de lípidos, el desbalance metabólico de glucosa y de los lípidos y RI en el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo blanco. Estos efectos sobre el metabolismo de manera sistémica pueden llevar a la generación de RI y al desarrollo de enfermedades como la diabetes, obesidad y el síndrome metabólico (Crescenzo et al., 2018; De Stefanis et al., 2017;

Pan & Kong, 2018; Roeb & Weiskirchen, 2021). En el presente trabajo el grupo con DRF al 20% en agua de bebida se empleó con la finalidad de determinar los cambios metabólicos que este carbohidrato genera en los animales. A pesar de que durante el tiempo de exposición a la DRF (8 semanas) no se observó la generación de la RI, los resultados mostraron la modificación de algunas de las proteínas de la vía de la Ins/AKT y cambios en el tejido hepático y muscular de estos animales; cambios que se pueden asociar con el desbalance metabólico. Es importante considerar además al tiempo de exposición y la concentración de fructosa empleada en este estudio son factores que pueden afectar el desarrollo de la RI en los animales. Diversas investigaciones han determinado que este tipo de dieta (DRF) es capaz de generar RI en algunos días o después de varias semanas, utilizando concentraciones de fructosa que van desde el 10 al 60 % (Roeb & Weiskirchen, 2021), sin embargo, no existe un parámetro específico que pueda definir la concentración ni el momento exacto en el cual se pueda presentar esta condición metabólica.

De manera general, tanto la DRF como el PM<sub>2.5</sub> son dos componentes de la vida diaria de los seres humanos que contribuyen a la generación de la RI. Como ya se mencionó, los seres humanos podemos encontrarnos expuestos a ambos componentes, sin embargo, los efectos generados por la exposición combinada a estos aún no se entienden en su totalidad. Por lo anterior, el dilucidar sus efectos moleculares, sistémicos y fisiológicos en los diversos tejidos que se involucran en el metabolismo son de suma importancia.

#### **4.4 Efecto de la exposición combinada de PM<sub>2.5</sub> + DRF sobre los parámetros morfométricos**

Diferentes cambios en la fisiología de los humanos (aumento de peso, incremento de grasa visceral) han sido asociadas como posible riesgo a enfermedades metabólicas (Mokdad et al., 2001). De estos cambios y de la medición de ciertos parámetros antropométricos algunos índices (índice de masa corporal, índice de Lee, entre otros) se han calculado con la finalidad de mantener un control en los cambios metabólicos en humanos; y a su vez han sido empleados en los modelos animales con la misma finalidad (Kivimäki et al., 2022). En nuestro trabajo, la medición de distintos

parámetros morfométricos no mostró ningún cambio significativo entre los cuatro grupos experimentales. De esta misma forma, al determinar el IMC y el índice de Lee que se relacionan con obesidad y diabetes, no se encontraron cambios significativos. En ratas Wistar, el incremento del IMC, el índice de Lee y la ganancia de peso se han asociado con obesidad generada con dietas ricas en carbohidratos (Novelli et al., 2007). A pesar de que ha sido demostrado que la DRF o en carbohidratos es capaz de generar obesidad y diabetes en animales, generando un incremento en los índices relacionados con el metabolismo, nuestro trabajo no mostró este mismo efecto. En el caso de los parámetros morfométricos, estos no presentaron un incremento mayor a los del grupo considerado control (AF), por ende, tampoco presentando un cambio significativo en los índices relacionados con el metabolismo en estos animales. Por lo anterior, en los animales de nuestro estudio estos índices indicaron que los animales de los cuatro grupos de exposición no presentaron obesidad, un posible factor de riesgo para el desarrollo de la diabetes.

#### **4.5 Efecto de la exposición combinada de PM<sub>2.5</sub> + DRF sobre la respuesta inflamatoria**

La respuesta inflamatoria ha sido asociada tanto a la exposición a PM<sub>2.5</sub> como a uno de los principales efectos de la fructosa que pueden llevar a la RI (puesto que la inflamación contribuye en la generación del daño metabólico). El incremento de diferentes marcadores pro-inflamatorios como la leptina, IL-6, IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  han sido relacionados con el desarrollo de la RI y diabetes (Jager et al., 2007; Rehman & Akash, 2016). Ya ha sido demostrado que diferentes marcadores inflamatorios producidos por la exposición a PM<sub>2.5</sub> contribuyen a los efectos diabetogénicos participando como potenciadores de la RI en los tejidos sensibles a la Ins (Long et al., 2020b). La leptina participa en la homeostasis de la glucosa, la sensibilidad de la insulina en el hígado, la ingesta de glucosa en los tejidos periféricos y actúa como un mediador de inflamación que es liberado por los adipocitos (Amitani et al., 2013; Chen, Chen et al., 2015). La investigación de Campolim et al. (2020) quienes expusieron ratones a PM<sub>2.5</sub> (600  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  por día) durante 12 semanas, mostró el incremento de leptina sérica, la Ins y el índice HOMA-IR. Dentro de estos marcadores, aquel que presentó un incremento a nivel

sistémico en la exposición combinada a  $PM_{2.5}$  + DRF fue solo la leptina, sin cambios significativos en los otros marcadores. La elevación de la leptina puede sugerir el desarrollo de una inflamación en grado bajo durante las primeras semanas de exposición; pero también es importante considerar su función sobre el metabolismo en los tejidos sensibles a la Ins, donde ambas funciones podrían llevar a la modificación de vías metabólicas como la vía de la Ins, contribuyendo en el desarrollo de la RI y de diversas enfermedades metabólicas.

#### **4.6 Efecto de la exposición combinada de $PM_{2.5}$ + DRF sobre las concentraciones de glucosa e insulina**

Ha sido demostrado que la exposición a  $PM_{2.5}$  produce alteraciones sistémicas relacionadas de manera directa con los procesos metabólicos. En nuestra investigación observamos el incremento significativo de las concentraciones de glucosa en ayunas en los grupos de exposición a  $PM_{2.5}$ , DRF o  $PM_{2.5}$  + DRF durante algunas semanas. En un estudio similar realizado en ratones macho C57BL/6 no se observaron alteraciones metabólicas importantes después de 8 semanas de exposición a  $PM_{2.5}$  y una dieta rica en lípidos; sin embargo, este mismo estudio encontró que una exposición de 17 semanas inducía RI sistémica caracterizada por altos niveles de glucosa, incremento del índice HOMA-IR y disminución de la sensibilidad a la Ins y del índice HOMA- $\beta$  (Liu et al., 2014). Otro estudio realizado en ratones macho deficientes de Apo-E expuestos 3 meses a  $PM_{2.5}$  reportó el desarrollo de RI con altas concentraciones de glucosa e incremento del índice HOMA-IR (X. Xu et al., 2012). En este estudio, además de los incrementos en los niveles de glucosa, no se observaron cambios en la CTG después de 8 semanas de exposición, demostrando que en los grupos de exposición el transporte y captación de la glucosa no se vio comprometido. Estos resultados nos sugieren que las alteraciones observadas en el manejo de los niveles de glucosa están relacionadas con el tiempo de exposición al  $PM_{2.5}$ , donde parece ser necesaria una exposición más prolongada de este contaminante para observar un cambio sostenido en el metabolismo de la glucosa.

El incremento de los niveles de Ins en la exposición combinada de PM<sub>2.5</sub> + DRF se presentó desde la semana 3 hasta la semana 8 de exposición, sugiriendo un estado de hiperinsulinemia en los animales de este grupo. Este resultado coincide con lo observado en otra investigación, donde la exposición crónica (12 semanas) a PM<sub>2.5</sub> en ratones generó un estado hiperinsulinémico en conjunto con el desarrollo de RI (Campolim et al., 2020). En humanos, las concentraciones de Ins incrementan para mantener el transporte, captación y el metabolismo de glucosa, este incremento se ve acompañado de la activación de diferencias vías metabólicas, como la vía de la Ins/AKT en los tejidos sensibles a la Ins (Brierley & Semple, 2021). Estos cambios metabólicos generados por el estado de hiperinsulinemia pueden llevar al inicio de la RI (Ormazabal et al., 2018). Además de la hiperinsulinemia como posible indicativo de la RI, es necesario comprobar si la RI ya se ha desarrollado en los animales; para ello el uso de los índices HOMA pueden dar información importante de si la RI se ha generado y como los tejidos sensibles a la Ins se pueden ver afectados.

#### **4.7 Aumento del HOMA-IR por la exposición combinada de PM<sub>2.5</sub> + DRF**

El índice HOMA-IR ha demostrado funcionar como una herramienta robusta para el análisis subrogado de la RI (Gayoso-Diz et al., 2013); mientras que, el HOMA-β está relacionado con la respuesta de las células β y la secreción pancreática de Ins (Vasudha et al., 2016). Los valores de HOMA-IR en la exposición combinada de PM<sub>2.5</sub> + DRF mostraron un incremento desde la semana 3 comparado con los otros grupos. Este incremento comprueba el desarrollo de RI en los animales de este grupo. Sin embargo, los valores del HOMA-β no presentaron un cambio en ninguno de los grupos analizados. Estos resultados en conjunto con la hiperinsulinemia demuestran el desarrollo de la RI caracterizado por un daño metabólico donde el incremento de la Ins es el principal marcador sistémico; sin embargo, este incremento de las concentraciones de la Ins parece no haber generado un daño aparente sobre la función de las células β pancreáticas. Debido al desarrollo de la RI y la hiperinsulinemia sistémica, fue necesario llevar a cabo el análisis de los tejidos sensibles a esta proteína, para determinar si existe un posible cambio molecular y estructural en ellos debido a este daño metabólico.

#### **4.8 Modificación de la vía de la insulina/AKT por la exposición combinada de PM<sub>2.5</sub> + DRF**

Se ha reportado que la modificación de la vía de la insulina/AKT puede estar relacionada con diversas vías activadas por la inflamación. En nuestro laboratorio de investigación se ha reportado que la exposición al PM<sub>2.5</sub> incrementa la expresión del receptor AT<sub>1</sub>R en pulmón acompañado por daño pulmonar, cardiaco y renal por la activación del sistema renina angiotensina aldosterona (RAS) (Aztatzi-Aguilar, et al., 2016; Aztatzi-Aguilar et al., 2015b). El incremento de la expresión de AT<sub>1</sub>R y su vía de señalización rio abajo ha sido asociada con el desarrollo de la RI en los tejidos sensibles a la Ins, dónde la activación de las Rho cinasas inhiben a algunos miembros de la vía de la Ins/AKT como IRS-1 y AKT (Forrester et al., 2018; Kim et al., 2012; Luther & Brown, 2011). En nuestro trabajo se incrementó la expresión del AT<sub>1</sub>R en pulmón por la exposición a PM<sub>2.5</sub>, DRF y PM<sub>2.5</sub> + DRF, mientras que en el hígado, este incremento sólo se presentó en el grupo de PM<sub>2.5</sub> + DRF. Este incremento, como lo menciona la teoría, podría asociarse con la disrupción de la vía de la Ins. Además, la activación del sistema RAS podría contribuir con la inflamación, llevando a la disfunción del hígado y la promoción de esteatosis hepática, la desregulación en la síntesis de lípidos y el desarrollo de RI (Hussain et al., 2017; Pizoñ et al., 2018). Este incremento de AT<sub>1</sub>R en el pulmón y el hígado, como respuesta de la exposición combinada a PM<sub>2.5</sub> + DRF sugiere la contribución del sistema RAS en las concentraciones de insulina y la RI.

Para comprobar la modificación de la vía de la Ins/AKT, fueron determinadas la expresión de IR- $\beta$ , IRS y AKT en el pulmón (por ser el primer tejido de contacto con el PM<sub>2.5</sub>) y los tejidos sensibles a Ins (hígado, músculo esquelético, tejido graso). Se observó el incremento de la expresión de AKT-p y la disminución de IRS-p en pulmón de los animales expuestos a DRF y PM<sub>2.5</sub> + DRF. La activación de AKT y sus vías rio abajo puede estar asociada con las funciones de supervivencia y proliferación celular en el pulmón como consecuencia de daño tisular (Xu et al., 2012). Se ha reportado que la exposición a PM<sub>2.5</sub> (300 g de exposición total por vía intratraqueal) en ratones

ICR mostraron el incremento de la respuesta inflamatoria en los pulmones (infiltración celular y el incremento de la IL-1) mediada por la vía de señalización de Rac1/AKT. Nuestros resultados mostraron que la exposición combinada de PM<sub>2.5</sub> + DRF generó el desbalance en la vía de la insulina/AKT, este cambio podría estar asociado con el daño local y la respuesta inflamatoria del PM<sub>2.5</sub> en el pulmón.

En los tejidos sensibles a Ins, donde la modificación de la vía de AKT esta relacionada con cambios metabólicos, se observaron diferencias en la expresión de las proteínas analizadas en los grupos de DRF y PM<sub>2.5</sub> + DRF. En estos tejidos, el incremento de la fosforilación de AKT se presentó en hígado y músculo esquelético. La activación de la vía de la insulina/AKT en el hígado inhibe la gluconeogénesis e induce la captura de glucosa y la síntesis general de proteínas (Manning & Toker, 2017). El incremento de glucosa en circulación es captado por el músculo esquelético por los procesos generados por la Ins y la activación de la vía de AKT con mayor facilidad comparado con el tejido graso (Jaiswal et al., 2019). En el músculo esquelético un exceso en la captación de glucosa puede promover la contracción fibrilar sostenida llevando al incremento en la síntesis de proteínas y al daño fibrilar (Egerman & Glass, 2014). El incremento de la fosforilación de AKT y su activación, concuerdan con los resultados sistémicos, donde a pesar de no verse un incremento sostenido de la glucosa en sangre, existió un evidente incremento de Ins. Este incremento de Ins llevando a la activación de la vía de AKT en hígado y músculo esquelético permitiendo mantener las concentraciones de glucosa en niveles basales. El daño en la estructura del hígado y del músculo esquelético también pudo ser observado, y de este se hará referencia en la siguiente sección.

#### **4.9 Daño estructural de los tejidos sensibles a insulina y el páncreas por la exposición combinada de PM<sub>2.5</sub> + DRF**

Diferentes alteraciones histopatológicas en los tejidos han sido relacionadas con la respuesta inflamatoria tejido específico. En nuestra investigación, diferentes daños histopatológicos fueron observados en hígado (incremento de lípidos), músculo esquelético (infiltrado celular, desarreglo de las fibras) y el páncreas (incremento de

granularidad de núcleos en los islotes pancreáticos). La exposición por 24 semanas a  $PM_{2.5}$  ( $115 \pm 1.5 \mu g/m^3$  o  $230 \pm 2.5 \mu g/m^3$ ) ha mostrado generar el incremento en la síntesis de lípidos y su acumulación en hígado, este daño metabólico ha sido asociado a los procesos inflamatorios y oxidantes generados en el hígado por el  $PM_{2.5}$  (Xu et al., 2019). La esteatosis hepática se ha relacionado con la respuesta inflamatoria de este tejido y la activación del receptor  $AT_1R$ . Los resultados histológicos del hígado mostraron el incremento de la presencia de lípidos en este tejido después de la exposición combinada a  $PM_{2.5}$  y DRF; en este mismo tejido, el incremento del receptor  $AT_1R$  fue observado, así como el aumento de la leptina sérica en este grupo de exposición. Confirmando, como de manera conjunta los efectos observados en vía sistémica (incremento de leptina e Ins) y a nivel local (incremento de  $AT_1R$ ) pueden contribuir en el daño generado en el hígado.

El incremento sostenido de la respuesta inflamatoria puede inhibir la progresión normal del crecimiento de las células musculares llevando al daño del tejido esquelético (Howard et al., 2020); de esta forma, el daño observado dentro de las fibras del musculo esquelético en los grupos de exposición ( $PM_{2.5}$ , DRF,  $PM_{2.5} + DRF$ ) puede estar asociado por una parte con el incremento de la respuesta inflamatoria en este tejido; hecho que quedó evidenciado por la infiltración significativa de células inmunes en la exposición combinada de  $PM_{2.5} + DRF$ . De igual forma, como se mencionó anteriormente, la fosforilación de AKT (que se observó incrementada en la exposición combinada) contribuye al daño de las fibras musculares por el incremento en la actividad de contracción de este tejido.

A pesar de no existir un daño significativo en el tejido adiposo, de acuerdo con los marcadores que se analizaron en este trabajo, se observó una tendencia al incremento de células nucleadas en este tejido que podría estar asociado a la respuesta inflamatoria generada en él. La leptina es sintetizada en el tejido adiposo y puede reclutar diferentes células inflamatorias en este tejido; además, la leptina se ha asociado con niveles elevados de  $IL-1\beta$  y  $TNF-\alpha$  (Jung & Choi, 2014). De esta forma, aunque no existieron cambios significativos en la vía de Ins/AKT en este tejido, la

exposición combinada al PM<sub>2.5</sub> + DRF puede estar asociado con un incremento en grado bajo de inflamación en el tejido adiposo que, a su vez, contribuyó a la liberación de leptina a la vía sistémica durante las primeras semanas de exposición.

Diversos mecanismos de muerte celular pueden ser activados en las células  $\beta$  pancreáticas durante la RI. La activación de la muerte celular puede ocurrir, en parte, por el incremento de la respuesta inflamatoria y la activación de las vías de señalización río abajo relacionadas con esta; además, la glucotoxicidad y la lipotoxicidad contribuyen al desarrollo de la muerte celular por piroptosis o apoptosis las cuales pueden inducir la fragmentación del ADN (Cnop et al., 2005; Rojas et al., 2018). La fragmentación del ADN de las células  $\beta$  pancreáticas (que constituyen el 70% de las células de los islotes pancreáticos) es evidente en los grupos de exposición; sin embargo, el análisis semi-cuantitativo mostró una tendencia en el incremento de esta fragmentación de los núcleos sólo en el grupo de PM<sub>2.5</sub> y la combinación de PM<sub>2.5</sub> + DRF; estos resultados resaltando que este daño en las células pancreáticas puede ser generado principalmente por el PM<sub>2.5</sub>.

De acuerdo con todos los resultados obtenidos, la exposición combinada de PM<sub>2.5</sub> + DRF llevó al incremento en la síntesis de la Ins mediado por las células pancreáticas; esta hiperinsulinemia generó la modificación de la vía de señalización de la Ins/AKT, daños en la estructura de los tejidos sensibles a la Ins y favoreció el desarrollo de la RI sistémica en ratas macho Sprague Dawley.

## 5. Conclusiones

El análisis de la composición y la concentración del PM<sub>2.5</sub> permitió la identificación de las fuentes de emisión de este contaminante (el tráfico vehicular, fuentes biogénicas, industria de plásticos, la minería, plantas de poder, entre otras). A su vez, el conocimiento de la presencia de algunos de los compuestos y elementos del PM<sub>2.5</sub> permitió realizar una asociación teórica de estos componentes con los efectos biológicos relacionados con el daño metabólico y la RI.

Los parámetros morfométricos en conjunto con los índices de masa corporal y de Lee, no presentaron cambio estadísticamente significativo tras la exposición combinada a PM<sub>2.5</sub> y la DRF. Los animales expuestos no presentaron obesidad, un factor de riesgo para el desarrollo de la diabetes.

La exposición sub-crónica del PM<sub>2.5</sub> y la DRF llevaron al incremento en suero de la leptina, adipocina participante en diferentes procesos relacionados con la saciedad y el metabolismo. Este incremento en la leptina contribuyó durante las primeras semanas de exposición (semana 1 y 4) al daño en los diferentes tejidos sensibles a la Ins de los animales.

Un estado de hiperinsulinemia fue observado desde la semana 3 en las ratas Sprague Dawley por la exposición combinada de PM<sub>2.5</sub> y la DRF. La hiperinsulinemia contribuyó al daño de los tejidos así como al desarrollo de la RI sistémica en los animales.

El cálculo de los índices HOMA-IR y HOMA- $\beta$  permitieron comprobar que los animales expuestos a la combinación de PM<sub>2.5</sub> y la DRF presentaban un estado de RI; donde a pesar del incremento de la Ins sistémica, aun no existía una pérdida de la función de las células  $\beta$  pancreáticas.

Como un posible marcador de inflamación y de activación del sistema RAS, el incremento de la expresión del receptor AT<sub>1</sub>R se observó en pulmón e hígado. Esta

posible activación podría estar relacionada con la modificación de otras vías como la vía de la Ins/AKT y el daño sobre estos tejidos.

Como consecuencia del estado de hiperinsulinemia, la modificación de la vía de señalización de la Ins/AKT fue observada principalmente en pulmón, hígado y músculo esquelético. Esta disrupción de la vía de la Ins/AKT podría estar relacionada con daños dentro de la estructura de los tejidos o pérdida de algunas funciones de estos tejidos.

Los cambios morfológicos en el tejido observados posterior a la exposición combinada del PM<sub>2.5</sub> + DRF del hígado, el músculo esquelético y las células β pancreáticas se asociaron principalmente con una posible respuesta inflamatoria en bajo grado específica de estos tejidos. Es importante considerar la participación de la hiperinsulinemia y la alteración de la vía de la Ins/AKT en estos eventos.

De manera general, todos los datos analizados mostraron que la exposición combinada del PM<sub>2.5</sub> + DRF desarrollaron RI sistémica. Donde las principales manifestaciones fueron la hiperinsulinemia, la disrupción de la vía de la Ins/AKT y el daño de los tejidos sensibles a la Ins, así como daño sobre las células β pancreáticas. La exposición simultánea al PM<sub>2.5</sub> y la DRF puede, de manera significativa, afectar a la salud de los individuos y contribuir al desarrollo de enfermedades metabólicas como la diabetes y el síndrome metabólico.

Es necesario continuar evaluando los efectos del PM<sub>2.5</sub> sobre el metabolismo de los animales, así como considerar nuevos marcadores biológicos que nos permitan dilucidar por completo todos mecanismos causantes de este daño metabólico.

## 6. Perspectivas

Es importante considerar la evaluación de otros factores que pueden contribuir al entendimiento del desarrollo de la RI por la exposición al PM<sub>2.5</sub> + DRF:

El análisis cuantitativo comparativo entre los efectos generados en los animales y la composición del material particulado podría generar un acercamiento más específico en la determinación de los efectos causados por cada uno de los componentes de este contaminante.

La búsqueda de otros marcadores séricos específicos relacionados con la RI como: lípidos específicos en sangre (colesterol, lípidos de baja densidad, lípidos de muy baja densidad y lípidos de alta densidad), grelina, adiponectina entre otros; pueden ayudar en el entendimiento del daño sistémico generado.

De esta misma forma, y dado que la RI puede generar una inflamación en grado bajo en los tejidos, es necesario determinar los niveles de diferentes marcadores pro-inflamatorios (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , entre otros) directamente en los tejidos sensibles a la Ins.

La evaluación de la expresión de diferentes proteínas río debajo de la vía de la Ins/AKT (proteínas FOXO, transportadores GLUT, proteínas PPAR, entre otras) podrían ayudar en el entendimiento del daño molecular causado por la exposición combinada del PM<sub>2.5</sub> + DRF.

Para complementar el entendimiento de los efectos moleculares de la exposición a PM<sub>2.5</sub> + DRF el estudio de otras vías de señalización relacionadas con la disrupción de la vía de la Ins/AKT (vías de señalización como JAK-STAT, la vía de las MAP cinasas) deben ser estudiadas.

Debido a la observación de la fragmentación del ADN en las imágenes de histología en el páncreas, es necesario investigar las vías de señalización relacionadas con la muerte celular en este tejido que podrían estar relacionadas con el efecto de fragmentación nuclear (vía de las caspasas, p53, Bax, Bcl-2). Así como con la muerte celular por apoptosis o necroptosis, que se han visto relacionadas con daño en los islotes pancreáticos.

Estudios recientes han mostrado que la RI puede generar efectos adversos sobre otros órganos y sistemas. Basados en esto, sería importante estudiar el efecto que la RI generada por la exposición a  $PM_{2.5}$  + DRF puede tener sobre otros órganos (cerebro, corazón, bazo, aparato reproductor masculino y femenino).

## 7. Referencias

- Adams, K., Greenbaum, D. S., Shaikh, R., van Erp, A. M., & Russell, A. G. (2015). Particulate matter components, sources, and health: Systematic approaches to testing effects. *Journal of the Air and Waste Management Association*, 65(5), 544–558.
- Aguilera, A., Bautista, F., Gutiérrez-Ruiz, M., Cenicerós-Gómez, A. E., Cejudo, R., & Goguitchaichvili, A. (2021). Heavy metal pollution of street dust in the largest city of Mexico, sources and health risk assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(4). <https://doi.org/10.1007/s10661-021-08993-4>
- Akhtar, U. S., Rastogi, N., McWhinney, R. D., Urch, B., Chow, C. W., Evans, G. J., & Scott, J. A. (2014). The combined effects of physicochemical properties of size-fractionated ambient particulate matter on in vitro toxicity in human A549 lung epithelial cells. *Toxicology Reports*, 1, 145–156. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.05.002>
- Amador-Muñoz, O., Villalobos-Pietrini, R., Miranda, J., & Vera-Avila, L. E. (2011). Organic compounds of PM<sub>2.5</sub> in Mexico Valley: Spatial and temporal patterns, behavior and sources. *Science of the Total Environment*, 409(8), 1453–1465. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.11.026>
- Amador-Muñoz, Omar, Bazán-Torija, S., Villa-Ferreira, S. A., Villalobos-Pietrini, R., Bravo-Cabrera, J. L., Munive-Colín, Z., ... Murillo-Tovar, M. A. (2013). Opposing seasonal trends for polycyclic aromatic hydrocarbons and PM<sub>10</sub>: Health risk and sources in southwest Mexico City. *Atmospheric Research*, 122, 199–212. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2012.10.003>
- Amitani, M., Asakawa, A., Amitani, H., & Inui, A. (2013). The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. *Frontiers in Neuroscience*, 7(7 APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00051>
- Arora, S. (2012). Molecular basis of insulin resistance and its relation to metabolic syndrome. *Insulin Resistance*, 264. <https://doi.org/10.5772/54620>
- Arredondo, A., & De Icaza, E. (2011). Costos de la Diabetes en America Latina: Evidencias del Caso Mexicano. *Value in Health*, 14(5 SUPPL.), S85–S88.

- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Aztatzi-Aguilar, O. G., Uribe-Ramírez, M., Narváez-Morales, J., De Vizcaya-Ruiz, A., & Barbier, O. (2016). Early kidney damage induced by subchronic exposure to PM2.5 in rats. *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0179-8>
- Aztatzi-Aguilar, O G, Valdés, A., Valdés-Arzate, V., Debray-García, Y., Calderó N-Aranda, E. S., Uribe-Ramirez, M., ... De Vizcaya-Ruiz, A. (2018). Exposure to ambient particulate matter induces oxidative stress in lung and aorta in a size- and time-dependent manner in rats Toxicology Research and Application. *Toxicology Research and Application*, 2, 1–15. <https://doi.org/10.1177/2397847318794859>
- Aztatzi-Aguilar, Octavio Gamaliel, Uribe-Ramírez, M., Arias-Montaño, J. A., Barbier, O., & De Vizcaya-Ruiz, A. (2015a). Acute and subchronic exposure to air particulate matter induces expression of angiotensin and bradykinin-related genes in the lungs and heart: Angiotensin-II type-I receptor as a molecular target of particulate matter exposure. *Particle and Fibre Toxicology*, 12(1), 1–18.
- Aztatzi-Aguilar, Octavio Gamaliel, Uribe-Ramírez, M., Arias-Montaño, J. A., Barbier, O., & De Vizcaya-Ruiz, A. (2015b). Acute and subchronic exposure to air particulate matter induces expression of angiotensin and bradykinin-related genes in the lungs and heart: Angiotensin-II type-I receptor as a molecular target of particulate matter exposure. *Particle and Fibre Toxicology*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12989-015-0094-4>
- Biswas, S. (2016). Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 17–19. <https://doi.org/10.1155/2016/5698931>
- Bowe, B., Xie, Y., Li, T., Yan, Y., Xian, H., & Al-Aly, Z. (2018). The 2016 global and national burden of diabetes mellitus attributable to PM 2.5 air pollution. *The Lancet Planetary Health*, 2(7), e301–e312. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(18\)30140-2](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30140-2)
- Brierley, G. V., & Semple, R. K. (2021). Insulin at 100 years – is rebalancing its action

- key to fighting obesity-related disease ?, 1–7. <https://doi.org/10.1242/dmm.049340>
- Caliceti, C., Calabria, D., Roda, A., & Cicero, A. F. G. (2017). Fructose intake, serum uric acid, and cardiometabolic disorders: A critical review. *Nutrients*, *9*(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu9040395>
- Campolim, C. M., Weissmann, L., Ferreira, C. K. de O., Zordão, O. P., Dornellas, A. P. S., de Castro, G., ... Prada, P. O. (2020). Short-term exposure to air pollution (PM<sub>2.5</sub>) induces hypothalamic inflammation, and long-term leads to leptin resistance and obesity via Tlr4/Ikbke in mice. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67040-3>
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., ... Alessi, M. C. (2007). Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*, *56*(July), 1761–1772. <https://doi.org/10.2337/db06-1491>.P.D.C.
- Chan, A. M. L., Ng, A. M. H., Mohd Yunus, M. H., Idrus, R. B. H., Law, J. X., Yazid, M. D., ... Lokanathan, Y. (2021). Recent developments in rodent models of high-fructose diet-induced metabolic syndrome: A systematic review. *Nutrients*, *13*(8), 1–21. <https://doi.org/10.3390/nu13082497>
- Chen, L., Chen, R., Wang, H., & Liang, F. (2015). Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *International Journal of Endocrinology*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/508409>
- Chen, Y., Luo, X. S., Zhao, Z., Chen, Q., Wu, D., Sun, X., ... Jin, L. (2018). Summer–winter differences of PM<sub>2.5</sub> toxicity to human alveolar epithelial cells (A549) and the roles of transition metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *165*(June), 505–509.
- Chen, Y. W., Yang, C. Y., Huang, C. F., Hung, D. Z., Leung, Y. M., & Liu, S. H. (2009). Heavy metals, islet function and diabetes development. *Islets*, *1*(3), 169–176. <https://doi.org/10.4161/isl.1.3.9262>
- Chuang, K. J., Yan, Y. H., Chiu, S. Y., & Cheng, T. J. (2011). Long-term air pollution exposure and risk factors for cardiovascular diseases among the elderly in Taiwan. *Occupational and Environmental Medicine*, *68*(1), 64–68.
- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J., Jo, A., & Lenzen, S. (2005). Mechanisms of pancreatic b-cell death in type 1 and type 2 diabetes Many Differences, Few Similarities.

- American Diabetes Association*, (6), 97–107.  
[https://doi.org/10.2337/diabetes.54.suppl\\_2.s97](https://doi.org/10.2337/diabetes.54.suppl_2.s97)
- Cohen, A. J., Brauer, M., Burnett, R., Anderson, H. R., Frostad, J., Estep, K., ... Forouzanfar, M. H. (2017). Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. *The Lancet*, 389(10082), 1907–1918.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30505-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30505-6)
- Coogan, P. F., White, L. F., Jerrett, M., Brook, R. D., Su, J. G., Seto, E., ... Rosenberg, L. (2012). Air pollution and incidence of hypertension and diabetes mellitus in black women living in Los Angeles. *Circulation*, 125(6), 767–772.
- Crescenzo, R., Cigliano, L., Mazzoli, A., Cancelliere, R., Carotenuto, R., Tussellino, M., ... Iossa, S. (2018). Early effects of a low fat, fructose-rich diet on liver metabolism, insulin signaling, and oxidative stress in young and adult rats. *Frontiers in Physiology*, 9(APR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00411>
- Dales, R. E., Kauri, L. M., & Cakmak, S. (2018). The associations between phthalate exposure and insulin resistance,  $\beta$ -cell function and blood glucose control in a population-based sample. *Science of the Total Environment*, 612, 1287–1292.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.009>
- De Stefanis, D., Mastrocola, R., Nigro, D., Costelli, P., & Aragno, M. (2017). Effects of chronic sugar consumption on lipid accumulation and autophagy in the skeletal muscle. *European Journal of Nutrition*, 56(1), 363–373.  
<https://doi.org/10.1007/s00394-015-1086-8>
- Diabetes, D. O. F. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.2337/dc10-S062>
- Egerman, M. A., & Glass, D. J. (2014). Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(1), 59–68.  
<https://doi.org/10.3109/10409238.2013.857291>
- Elder, A., Vidyasagar, S., & Delouise, L. (2009). Physicochemical factors that affect metal and metal oxide nanoparticle passage across epithelial barriers. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(4), 434–450.
- Elsabahy, M., & Wooley, K. L. (2013). Cytokines as biomarkers of nanoparticle

- immunotoxicity. *Chemical Society Reviews*, 42(12), 5552.
- ENSANUT 2021. (2021). Retrieved from <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanutcontinua2021/index.php>
- FEDERATION, I. D. (2021). *International Diabetes Federation. Diabetes Research and Clinical Practice* (Vol. 102). <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.10.013>
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(5), 4986–4988. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
- Forrester, S. J., Booz, G. W., Sigmund, C. D., Coffman, T. M., Kawai, T., Rizzo, V., ... Eguchi, S. (2018). Angiotensin II signal transduction: An update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 98(3), 1627–1738. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2017>
- Freeman, A. M., & Pennings, N. (2020). Insulin Resistance.
- Gayoso-Diz, P., Otero-González, A., Rodríguez-Alvarez, M. X., Gude, F., García, F., De Francisco, A., & Quintela, A. G. (2013). Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: Effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. *BMC Endocrine Disorders*, 13(Cvd). <https://doi.org/10.1186/1472-6823-13-47>
- Geiser, M., & Kreyling, W. G. (2010). Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(i), 2–19.
- Guthrie, G. P. (1995). Angiotensin receptors: Physiology and pharmacology. *Clinical Cardiology*, 18(3 S), 29–34.
- Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., & Olivares-Reyes, J. A. (2017). Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update. *Gaceta Medica de Mexico*, 153(2), 214–228.
- Herman, D. A., Wingen, L. M., Johnson, R. M., Keebaugh, A. J., Rensch, S. R., Hasen, I., ... Kleinman, M. T. (2020). Seasonal effects of ambient PM<sub>2.5</sub> on the cardiovascular system of hyperlipidemic mice. *Journal of the Air and Waste Management Association*. <https://doi.org/10.1080/10962247.2020.1717674>
- Hill, B. G., Rood, B., Ribble, A., & Haberzettl, P. (2021). Fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) inhalation-induced alterations in the plasma lipidome as promoters of vascular

- inflammation and insulin resistance. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00881.2020>
- Howard, E. E., Pasiakos, S. M., Blesso, C. N., Fussell, M. A., & Rodriguez, N. R. (2020). Divergent Roles of Inflammation in Skeletal Muscle Recovery From Injury. *Frontiers in Physiology*, 11(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00087>
- Hussain, S. A., Utba, R. M., & Assumaidae, A. M. (2017). Effects of Azilsartan, Aliskiren or their Combination on High Fat Diet-induced Non-alcoholic Liver Disease Model in Rats. *Medical Archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)*, 71(4), 251–255. <https://doi.org/10.5455/medarh.2017.71.251-255>
- Iwanaga, S. (2007). Biochemical principle of Limulus test for detecting bacterial endotoxins. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 83(4), 110–119. <https://doi.org/10.2183/pjab.83.110>
- Jager, J., Grémeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., & Tanti, J. F. (2007). Interleukin-1 $\beta$ -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*, 148(1), 241–251. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0692>
- Jaiswal, N., Gavin, M. G., Iii, W. J. Q., Luongo, T. S., Gelfer, R. G., Baur, J. A., & Titchenell, P. M. (2019). The role of skeletal muscle Akt in the regulation of muscle mass and glucose homeostasis. *Molecular Metabolism*, 28(August), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.08.001>
- Jung, U. J., & Choi, M. S. (2014). Obesity and its metabolic complications: The role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), 6184–6223. <https://doi.org/10.3390/ijms15046184>
- Kashyap, D., & Agarwal, T. (2018). Concentration and factors affecting the distribution of phthalates in the air and dust: A global scenario. *Science of the Total Environment*, 635, 817–827. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.158>
- Kelishadi, R. (2012). Environmental pollution: Health effects and operational implications for pollutants removal. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012(2), 2012–2014.
- Kelishadi, R., & Poursafa, P. (2010). Air pollution and non-respiratory health hazards

- for children. *Archives of Medical Science*, 6(4), 483–495.
- Kim, J. A., Jang, H. J., Martinez-Lemus, L. A., & Sowers, J. R. (2012). Activation of mTOR/p70S6 kinase by ANG II inhibits insulin-stimulated endothelial nitric oxide synthase and vasodilation. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 302(2), 201–208. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00497.2011>
- Kivimäki, M., Strandberg, T., Pentti, J., Nyberg, S. T., Frank, P., Jokela, M., ... Ferrie, J. E. (2022). Body-mass index and risk of obesity-related complex multimorbidity: an observational multicohort study. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 10(4), 253–263. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(22\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00033-X)
- Kobos, L., & Shannahan, J. (2021). Minireview Particulate matter inhalation and the exacerbation of cardiopulmonary toxicity due to metabolic disease. *Experimental Biology and Medicine*, 246, 822–834. <https://doi.org/10.1177/1535370220983275>
- Kruger, N. J. (1996). The Bradford Method for Protein Quantitation. *The Protein Protocols Handbook*, 15–20.
- Kruse, J. A. (1990). Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 264(21), 2808. <https://doi.org/10.1001/jama.1990.03450210108045>
- Kumar, S., & Dwivedi, S. K. (2021). Impact on particulate matters in India's most polluted cities due to long-term restriction on anthropogenic activities. *Environmental Research*, 200, 111754. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2021.111754>
- Lancaster, K. (2020). Current Intake and Demographic Disparities in the Association of Fructose-Rich Foods and Metabolic Syndrome Kristie. *Nutrition, Obesity and Exercise*, 3(7), 2020–2022. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.10224>
- Li, K., Yin, R., Wang, Y., & Zhao, D. (2021). Associations between exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and metabolic syndrome in U.S. adolescents: Cross-sectional results from the National Health and Nutrition Examination Survey (2003–2016) data. *Environmental Research*, 202, 111747. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111747>
- Li, N., Xia, T., & Nel, A. E. (2008). The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered

- nanoparticles. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.028>
- Li, R., Sun, Q., Lam, S. M., Chen, R., Zhu, J., Gu, W., ... Liu, C. (2020). Sex-dependent effects of ambient PM<sub>2.5</sub> pollution on insulin sensitivity and hepatic lipid metabolism in mice. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00343-5>
- Liu, C., Xu, X., Bai, Y., Wang, T. Y., Rao, X., Wang, A., ... Rajagopalan, S. (2014). Air pollution-mediated susceptibility to inflammation and insulin resistance: Influence of CCR2 pathways in mice. *Environmental Health Perspectives*. <https://doi.org/10.1289/ehp.1306841>
- Lodovici, M., & Bigagli, E. (2011). Oxidative Stress and Air Pollution Exposure. *Journal of Toxicology*, 2011, 487074. <https://doi.org/10.1155/2011/487074>
- Long, M. hui, Zhang, C., Xu, D. qun, Fu, W. liang, Gan, X. dong, Li, F., ... Xu, D. gang. (2020a). PM<sub>2.5</sub> aggravates diabetes via the systemically activated IL-6-mediated STAT3/SOCS3 pathway in rats' liver. *Environmental Pollution*, 256, 113342. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.113342>
- Long, M. hui, Zhang, C., Xu, D. qun, Fu, W. liang, Gan, X. dong, Li, F., ... Xu, D. gang. (2020b). PM<sub>2.5</sub> aggravates diabetes via the systemically activated IL-6-mediated STAT3/SOCS3 pathway in rats' liver. *Environmental Pollution*, 256, 113342. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113342>
- Luther, J. M., & Brown, N. J. (2011). The renin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(12), 734–739. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.07.006>
- Ma, J., Zhou, Y., Liu, Y., Xiao, L., Cen, X., Li, W., ... Chen, W. (2019). Association between urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and dyslipidemias in the Chinese general population: A cross-sectional study. *Environmental Pollution*, 245, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.134>
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434.
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169(3), 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>

- Miller, C. A. (2006). *Air Pollution Control Technologies. Mechanical Engineers' Handbook: Energy and Power: Third Edition* (Vol. 4).
- Mokdad, A. H., Ford, E. S., & Bowman, B. A. (2001). Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors. *Journal of the American Medical Association*, 289(1), 76–79.
- Morales-Rubio, R. A., Alvarado-Cruz, I., Manzano-León, N., Andrade-Oliva, M. D. L. A., Uribe-Ramirez, M., Quintanilla-Vega, B., ... De Vizcaya-Ruiz, A. (2019). In utero exposure to ultrafine particles promotes placental stress-induced programming of renin-angiotensin system-related elements in the offspring results in altered blood pressure in adult mice. *Particle and Fibre Toxicology*, 16(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0289-1>
- Muralikrishna, I., & Manickam, V. (2017). Air pollution control technologies. In *Environmental Management* (1st ed., pp. 337–397). Elsevier Inc.
- Najjar, S. (2003). Insulin Action: Molecular Basis of Diabetes. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001402>
- Nandkumar, M. A., Ashna, U., Thomas, L. V., & Nair, P. D. (2015). Pulmonary surfactant expression analysis-Role of cell-cell interactions and 3-D tissue-like architecture. *Cell Biology International*, 39(3), 272–282.
- Novelli, E. L. B., Diniz, Y. S., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M. X., Rodrigues, H. G., Mani, F., ... Novelli Filho, J. L. V. B. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*, 41(1), 111–119. <https://doi.org/10.1258/002367707779399518>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823–839.
- Ochs, M., & O'Brodvich, H. (2012). The Structural and Physiologic Basis of Respiratory Disease. *Kendig and Chernick's Disorders of the Respiratory Tract in Children*, (C), 35–74.
- Olivares-Reyes, J. A., & Arellano, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), 9–18.
- Ormazabal, V., Nair, S., Elfeky, O., Aguayo, C., Salomon, C., & Zuñiga, F. A. (2018).

- Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0762-4>
- Pan, Y., & Kong, L. D. (2018). High fructose diet-induced metabolic syndrome: Pathophysiological mechanism and treatment by traditional Chinese medicine. *Pharmacological Research*, 130, 438–450. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.02.020>
- Pereira, M. C., Oliveira, L. C. A., & Murad, E. (2012). Iron oxide catalysts: Fenton and Fentonlike reactions – a review. *Clay Minerals*, 47(3), 285–302. <https://doi.org/10.1180/claymin.2012.047.3.01>
- Pizoń, T., Rajzer, M., Wojciechowska, W., Wach-Pizoń, M., Drożdż, T., Wróbel, K., ... Czarnecka, D. (2018). The relationship between plasma renin activity and serum lipid profiles in patients with primary arterial hypertension. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 19(4). <https://doi.org/10.1177/1470320318810022>
- Popek, R., Gawrońska, H., & Gawroński, S. W. (2015). The Level of Particulate Matter on Foliage Depends on the Distance from the Source of Emission. *International Journal of Phytoremediation*, 17(12), 1262–1268. <https://doi.org/10.1080/15226514.2014.989312>
- Qvarfordt, M., Anderson, M., Sanchez-Crespo, A., Diakopoulou, M., & Svartengren, M. (2022). Pulmonary translocation of ultrafine carbon particles in COPD and IPF patients. *Inhalation Toxicology*, 34(1–2), 14–23. <https://doi.org/10.1080/08958378.2021.2019859>
- Rai, P. (2016a). Adverse health impacts of particulate matter. In *Biomagnetic monitoring of particulate matter* (1st ed., pp. 15–29). Elsevier Inc.
- Rai, P. (2016b). Particulate matter and its size fractionation. In *Biomagnetic monitoring of particulate matter* (1st ed., pp. 1–14). Elsevier Inc.
- Ramli, N. A., Md Yusof, N. F. F., Shith, S., & Suroto, A. (2020). Chemical and Biological Compositions Associated with Ambient Respirable Particulate Matter: a Review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 231(3). <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04490-5>

- Rehman, K., & Akash, M. (2016). Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance : how are they interlinked ? *Journal of Biomedical Science*, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0303-y>
- Reyes-Caballero, H., Rao, X., Sun, Q., Warmoes, M. O., Penghui, L., Sussan, T. E., ... Biswal, S. (2019). Air pollution-derived particulate matter dysregulates hepatic Krebs cycle, glucose and lipid metabolism in mice. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53716-y>
- Roeb, E., & Weiskirchen, R. (2021). Fructose and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Frontiers in Pharmacology*, 12(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.634344>
- Rogers, K. (2011). *Respiratory System*. Britannica Educational Publishing.
- Rojas, J., Bermudez, V., Palmar, J., Sofía Martínez, M., Carlos Olivar, L., Nava, M., ... Velasco, M. (2018). Review Article Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy. <https://doi.org/10.1155/2018/9601801>
- Sánchez-Guijo, A., Hartmann, M. F., & W., S. A. (2006). Introduction to Gas Chromatography-Mass Spectrometry Hormone assays in biological fluids, 1065, 27–43. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-616-0>
- Sang, S., Chu, C., Zhang, T., Chen, H., & Yang, X. (2022). The global burden of disease attributable to ambient fine particulate matter in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 238(May). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113588>
- Schraufnagel, D. E., Balmes, J. R., Cowl, C. T., De Matteis, S., Jung, S. H., Mortimer, K., ... Wuebbles, D. J. (2019a). Air Pollution and Noncommunicable Diseases: A Review by the Forum of International Respiratory Societies' Environmental Committee, Part 1: The Damaging Effects of Air Pollution. *Chest*, 155(2), 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.10.042>
- Schraufnagel, D. E., Balmes, J. R., Cowl, C. T., De Matteis, S., Jung, S. H., Mortimer, K., ... Wuebbles, D. J. (2019b). Air Pollution and Noncommunicable Diseases: A Review by the Forum of International Respiratory Societies' Environmental Committee, Part 2: Air Pollution and Organ Systems. *Chest*, 155(2), 417–426.

- <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.10.041>
- SEMARNAT. (2021). *Programa de gestión para mejorar la calidad del aire de la zona metropolitana del valle de México*.
- Sowers, J. (2004). Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Health Circ Physiol*, 286, H1597–H1602.
- Srivastava, A., Dutta, S., Ahuja, S., & Sharma, R. K. (2021). *Green chemistry: key to reducing waste and improving water quality. Handbook of Water Purity and Quality*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821057-4.00010-0>
- Srogi, K. (2007). Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 5(4), 169–195. <https://doi.org/10.1007/s10311-007-0095-0>
- Trejo-González, A. G., Riojas-Rodriguez, H., Texcalac-Sangrador, J. L., Guerrero-López, C. M., Cervantes-Martínez, K., Hurtado-Díaz, M., ... Zuñiga-Bello, P. E. (2019). Quantifying health impacts and economic costs of PM<sub>2.5</sub> exposure in Mexican cities of the National Urban System. *International Journal of Public Health*, 64(4), 561–572. <https://doi.org/10.1007/s00038-019-01216-1>
- Vasudha, A., Takashi, K., Evans, R. W., Aya, K., Tomonori, O., Samar, R. E. K., ... Sekikawa, A. (2016). Comparison of HOMA-IR, HOMA-β<sub>2</sub> and disposition index.pdf, 58(2), 265–271. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3414-6>. Comparison
- Wan, Q., Liu, Z., Yang, M., & Wu, J. (2019). Acceleratory effects of ambient fine particulate matter on the development and progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by down-regulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Toxicology Letters*, 316, 27–34. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2019.09.005>
- Wang, G., Zheng, X., Duan, H., Dai, Y., Niu, Y., Gao, J., ... Zheng, Y. (2019). High-content analysis of particulate matters-induced oxidative stress and organelle dysfunction in vitro. *Toxicology in Vitro*, 59(April), 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.04.026>
- WHO. (2018). World Health Organization. Retrieved from <http://www.who.int/es>
- WHO. (2022). Retrieved March 8, 2022, from <https://www.who.int/news-room/fact->

sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health#:~:text=Particulate matter (PM),-Definition and principal&text=It affects more people than,substances suspended in the air.

- Wilcox, G. (2007). Insulin and insulin resistance. *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society*, 11(2), 19–39.
- Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R. (2019). Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clinical Biochemist Reviews*, 40(3), 115–133. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00024>
- Wolf, K., Popp, A., Schneider, A., Breitner, S., Hampel, R., Rathmann, W., ... Peters, A. (2016). Association Between Long-term Exposure to Air Pollution and Biomarkers Related to Insulin Resistance, Subclinical Inflammation, and Adipokines. *Diabetes*, 65(11), 3314–3326. <https://doi.org/10.2337/DB15-1567>
- Wong, W.-Y., & Brown, L. (2014). Induction of Metabolic Syndrome by Excess Fructose Consumption. In B. Turan & N. S. Dhalla (Eds.), *Diabetic Cardiomyopathy: Biochemical and Molecular Mechanisms* (pp. 41–63). New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9317-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9317-4_3)
- Xu, J., Zhang, W., Lu, Z., Zhang, F., & Ding, W. (2017). Airborne PM<sub>2.5</sub>-induced hepatic insulin resistance by Nrf2/JNK-mediated signaling pathway. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/ijerph14070787>
- Xu, M. X., Ge, C. X., Qin, Y. T., Gu, T. T., Lou, D. S., Li, Q., ... Tan, J. (2019). Prolonged PM<sub>2.5</sub> exposure elevates risk of oxidative stress-driven nonalcoholic fatty liver disease by triggering increase of dyslipidemia. *Free Radical Biology and Medicine*, 130, 542–556. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.11.016>
- Xu, N., Lao, Y., Zhang, Y., & Gillespie, D. A. (2012). Akt: A double-edged sword in cell proliferation and genome stability. *Journal of Oncology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/951724>
- Xu, X., Rao, X., Wang, T., Jiang, S. Y., Ying, Z., Liu, C., ... Sun, Q. (2012). Effect of co-exposure to nickel and particulate matter on insulin resistance and mitochondrial dysfunction in a mouse model, 1–12.
- Yang, W., Dall, T. M., Beronjia, K., Lin, J., Semilla, A. P., Chakrabarti, R., ... Petersen,

- M. P. (2018). Economic costs of diabetes in the U.S. in 2017. *Diabetes Care*, 41(5), 917–928. <https://doi.org/10.2337/dci18-0007>
- Yang, X., Xiao, D., Bai, H., Tang, J., & Wang, W. (2022). Spatiotemporal Distributions of PM2.5 Concentrations in the Beijing–Tianjin–Hebei Region From 2013 to 2020. *Frontiers in Environmental Science*, 10, 57. <https://doi.org/10.3389/FENVS.2022.842237/BIBTEX>
- Zhang, Y., Li, Y., Shi, Z., Wu, J., Yang, X., Feng, L., ... Sun, Z. (2018). Metabolic impact induced by total, water soluble and insoluble components of PM2.5 acute exposure in mice. *Chemosphere*, 207, 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.098>
- Zheng, J., Feng, Q., Zhang, Q., Wang, T., & Xiao, X. (2016). Early life fructose exposure and its implications for long-term cardiometabolic health in offspring. *Nutrients*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/nu8110685>