

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

---



Facultad de Ciencias Químicas – Instituto de Ciencias

Posgrado En Ciencias Químicas

Tesis doctoral:

“Papel de la inflamación y el estrés oxidativo promovido por la exposición a cadmio sobre el desarrollo de resistencia hepática a insulina”

Presenta:

M.C. Victor Enrique Sarmiento Ortega

Directores de Tesis

D.C. Eduardo Brambila Colombres

D.C. Samuel Treviño Mora

Junio 2021

## Índice

.....	0
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>3</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>6</b>
<b>Lista de Tablas.....</b>	<b>7</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
<b>Marco teórico.....</b>	<b>10</b>
Resistencia a insulina .....	10
Inflamación y resistencia a insulina.....	12
Estrés oxidativo y resistencia a insulina .....	16
Cadmio, inflamación y estrés oxidativo. ....	18
Generalidades y toxicidad por cadmio.....	18
Cadmio y estrés oxidativo .....	20
Cadmio e inflamación.....	23
Cadmio y resistencia a insulina .....	25
<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>29</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>29</b>
<b>Objetivo General .....</b>	<b>30</b>
<b>Objetivos particulares.....</b>	<b>30</b>
<b>Diseño experimental 1.....</b>	<b>31</b>
<b>Diseño experimental 2.....</b>	<b>32</b>
<b>Diseño experimental 3.....</b>	<b>32</b>
<b>Diseño experimental 4.....</b>	<b>33</b>
<b>Diseño experimental 5.....</b>	<b>33</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>34</b>
<b>Análisis Estadístico .....</b>	<b>43</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>44</b>
Efecto de la exposición de cadmio sobre el estrés oxidativo, inflamación y resistencia a insulina. .....	44
Curva dosis respuesta Curcumina-Resistencia a insulina y estrés oxidativo. ....	53
Efecto de la Curcumina sobre la resistencia a insulina y estrés oxidativo. ....	56
Curva dosis respuesta Prednisona-RI e inflamación. ....	64
Efecto de la Prednisona sobre la resistencia a insulina y la inflamación. ....	67

<b>Discusión de Resultados</b> .....	72
Efecto de la exposición de cadmio sobre el estrés oxidativo, inflamación y resistencia a insulina. .....	72
Efecto de la Curcumina sobre el estrés oxidativo y la resistencia a insulina. ....	87
Efecto de la Prednisona sobre la inflamación y la resistencia a insulina. ....	91
<b>Conclusiones:</b> .....	97
<b>Bibliografía</b> .....	98

## Lista de abreviaturas

<b>.OH</b>	<b>Radical Hidroxilo</b>
<b>4-HDA</b>	<b>4-Hidroxialquenes</b>
<b>AGE</b>	<b>Productos finales de glicación avanzada</b>
<b>AGL</b>	<b>Ácidos grasos libres</b>
<b>Akt</b>	<b>Proteína cinasa B (PKB)</b>
<b>ALT</b>	<b>Alanina amino transferasa</b>
<b>AP-1</b>	<b>Proteína activadora 1</b>
<b>ARE</b>	<b>Elemento de respuesta antioxidante</b>
<b>AST</b>	<b>Aspartato amino transferasa</b>
<b>ATP</b>	<b>Adenosin trifosfato</b>
<b>ATSDR</b>	<b>Agencia de sustancias tóxicas y registro de enfermedades</b>
<b>AUC</b>	<b>Area bajo la curva</b>
<b>Ca</b>	<b>Calcio</b>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>Cloruro de Calcio</b>
<b>CAT</b>	<b>Catalasa</b>
<b>Cat</b>	<b>catalasa () y</b>
<b>Cd</b>	<b>Cadmio</b>
<b>DNL</b>	<b>Lipogénesis de <i>novo</i></b>
<b>ER</b>	<b>Estrés reticular</b>
<b>ERK</b>	<b>Cinasa regulada por señales extracelulares</b>
<b>Glut-2</b>	<b>Transportador de Glucosa tipo 2</b>
<b>Glut-4</b>	<b>Transportador de Glucosa tipo 4</b>
<b>GPK</b>	<b>Glucogeno fosforilasa cinasa</b>
<b>GPx</b>	<b>Glutación peroxidasa</b>
<b>Gq</b>	<b>Proteína G que activa a PLC</b>
<b>GR</b>	<b>glutación reductasa ()</b>
<b>GS</b>	<b>Glucógeno sintasa GSH Glutación GSH Glutación reducido</b>
<b>GSH</b>	<b>Glutación reducido</b>
<b>GSK3</b>	<b>Glucogeno cinasa sintasa GSSG Glutación oxidado</b>
<b>GSSG</b>	<b>Glutación oxidado</b>

<b>HO•</b>	radical hidroxilo (•),
<b>HOMA-IR</b>	Modelo de evaluación de la homeostasis de Resistencia a Insulina
<b>IKKB</b>	Inhibidor del factor nuclear kappa-B quinasa $\beta$
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-14</b>	Interleucina 14
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IRS-1</b>	Sustrato del receptor de insulina tipo 1
<b>LIRI</b>	Índice de resistencia a insulina en hígado
<b>LPO</b>	Lipoperoxidación
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>Jnk</b>	Cinasa C-Jun N-terminal
<b>LOAEL</b>	Nivel más bajo de efecto adverso observado
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógeno
<b>MCP-1</b>	Proteína quimio atrayente de monocitos 1
<b>MDA</b>	Malondialdehido
<b>Redox</b>	Óxido Reducción
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>JNK</b>	Cinasa Jun N-terminal
<b>MTF-1</b>	Factor de transcripción regulado por metales
<b>mTOR</b>	Diana de rapamicina en células de mamífero
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear kappa de cadena ligera potenciador de células B activadas
<b>NO</b>	Óxido nítrico NOO- Peroxinitrito
<b>NOAEL</b>	Nivel de efecto adverso no observado
<b>NOX</b>	NADPH oxidasa
<b>Nrf2</b>	Factor nuclear eritroide 2 como 2
<b>pH</b>	Potencial hidroxilo

<b>PI3K</b>	<b>Cinasa de Fosfatidil inositol 3</b>
<b>PI3K</b>	<b>Fosfatidilinositol 3-cinasa</b>
<b>RAGE</b>	<b>Receptor para productos finales de glicación avanzada</b>
<b>RI</b>	<b>Resistencia a insulina</b>
<b>RNS</b>	<b>especies reactivas de nitrógeno</b>
<b>RO•</b>	<b>Radicales peroxilo</b>
<b>ROO•</b>	<b>Alcoxilo</b>
<b>ROS</b>	<b>Especies reactivas de oxígeno</b>
<b>TGF-β</b>	<b>Factor de crecimiento transformante tipo beta</b>
<b>TNF-α</b>	<b>Factor de necrosis tumoral alpha</b>
<b>GSSG-R</b>	<b>Glutación reductasa</b>
<b>GST</b>	<b>Glutación S-Transferasa</b>
<b>H2-DCF-DA</b>	<b>Dihidrodiclorofluoresceina diacetato</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Peróxido de hidrógeno</b>
<b>•O<sub>2</sub></b>	<b>Anión superóxido</b>
<b>O<sub>2</sub>-</b>	<b>aniones superóxido (),</b>
<b>PKD-1</b>	<b>Proteína cinasa D1</b>

## Lista de Figuras.

**Figura 1.** Vía de señalización del receptor de insulina.

**Figura 2.** Interacción directa de la señalización de la insulina y las vías inflamatorias.

**Figura 3.** Especies reactivas de oxígeno y resistencia a insulina.

**Figura 4.** Mecanismos generales y vías moleculares específicas de toxicidad por cadmio.

**Figura 5.** Vías de generación de especies reactivas de oxígeno inducidas por Cd.

**Figura 6.** Efectos proinflamatorios de la exposición al cadmio en neutrófilos y macrófagos.

**Figura 7.** Papel del cadmio (Cd) en la resistencia a la insulina y la tolerancia a la glucosa / metabolismo alterado de la glucosa en varios órganos.

**Figura 8.** Tolerancia a la glucosa y Resistencia a la Insulina después de 30 días de exposición.

**Figura 9.** Comportamiento de proteínas de la vía de señalización de insulina después de la exposición a Cd

**Figura 10.** Comportamiento de proteínas de la vía de señalización de insulina después de la exposición a Cd.

**Figura 11.** Concentración de Cadmio en hígado después de 30 días de exposición.

Figura 12. Estrés Oxidante después de 30 días de exposición.

**Figura 13.** Estatus sérico inflamatorio después de 30 días de exposición

**Figura 14.** NF- $\kappa$ B a 30 días de los grupos experimentales

**Figura 15.** Estatus tisular inflamatorio después de 30 días de exposición.

**Figura 16.** Cinasas p38 y JNK a los 30 días de exposición con cadmio.

**Figura 17.** Efecto de diferentes dosis de curcumina sobre la concentración de cadmio hepático y ROS después de 30 días de exposición a cadmio

**Figura 18.** Efecto de diferentes dosis de curcumina sobre índices de resistencia a insulina después de 30 días de exposición a cadmio.

**Figura 19.** Efecto de diferentes dosis de curcumina sobre marcadores de daño hepático y renal.

**Figura 20.** Comportamiento de p38 y JNK después de la exposición a Cd y tratamiento con curcumina.

**Figura 21.** Comportamiento de la fosforilación en treonina y tirosina del receptor a insulina después de la exposición a Cd y tratamiento con curcumina.

**Figura 22.** Comportamiento de la fosforilación del IRS y mTOR después de la exposición a Cd y tratamiento con curcumina.

**Figura 23.** Comportamiento de la S6K después de la exposición a Cd y tratamiento con curcumina

**Figura 24.** Tolerancia a la glucosa y su respuesta de insulina a 30 días de la exposición a Cd y tratamiento con curcumina

**Figura 25.** Índices de Resistencia a insulina a 30 días de la exposición a Cd y tratamiento con curcumina.

**Figura 26.** Efecto de diferentes dosis de Prednisona sobre la inflamación asociada a la exposición a cadmio

**Figura 27.** Efecto de diferentes dosis de Prednisona sobre índices de resistencia a insulina después exposición a cadmio

**Figura 28.** Efecto de diferentes dosis de Prednisona sobre marcadores de daño hepático y renal después de exposición a cadmio

**Figura 29.** Estatus sérico inflamatorio a 30 días de los grupos experimentales y su tratamiento con Prednisona.

**Figura 30.** NF- $\kappa$ B de los grupos experimentales y su tratamiento con Prednisona.

**Figura 31.** Estatus tisular inflamatorio a 30 días de los grupos experimentales y su tratamiento con Prednisona.

**Figura 32.** Cinasas p38 y JNK en los grupos experimentales y su tratamiento con Prednisona

**Figura 33.** Tolerancia a la glucosa y respuesta de insulina de los grupos experimentales y su tratamiento con Prednisona.

**Figura 34.-** Índices de Resistencia a insulina de los grupos experimentales y su tratamiento con Prednisona.

**FIGURA 35.** Mecanismo propuesto de hepatotoxicidad a inducida por cadmio.

**FIGURA 36.** Interdependencia del estrés oxidativo y la inflamación inducida por cadmio.

**FIGURA 37.** Tautomerismo ceto-enol de curcumina.

**FIGURA 38.** Posible mecanismo de acción de los efectos celulares por la exposición a cadmio (flechas negras) y el posible efecto del tratamiento de curcumina (Flechas rojas), sobre vía de señalización de insulina.

**FIGURA 39.** Comparación de la estructura del cortisol el corticoesteroide endógeno más importante con prednisona un antiinflamatorio esteroideo.

**Figura 40.** Posible mecanismo de acción de los efectos celulares por la exposición a cadmio (flechas negras) y el posible efecto del tratamiento de prednisona (Flechas rojas), sobre la inflamación y el desarrollo de resistencia a insulina.

**Figura 41.** Resumen de los eventos implicados en el desarrollo de resistencia a insulina por exposición a cadmio.

## Lista de Tablas.

**Tabla 1.** Defensa Antioxidante después de 30 días de exposición.

**Tabla 2.** Estrés Oxidante después de 30 días de los grupos experimentales más tratamiento con curcumina.

**Tabla 3.** Defensa Antioxidante a 30 días de los grupos experimentales más tratamiento con curcumina.

## Introducción

El cadmio (Cd) es un metal tóxico, y ha sido considerado como uno de los 7 mayores contaminantes por la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades Ambientales (ATSDR 2021). Su incremento y distribución en el ambiente está potenciado tanto por la erosión natural, como por la actividad humana. La población en general se encuentra expuesta al metal por consumo de agua y alimentos contaminados, así como por la inhalación de contaminantes y gases provenientes de exhalaciones volcánicas y quema de combustibles fósiles. Sin embargo, la principal fuente no ocupacional de exposición al metal es el consumo de cigarro que incrementa significativamente la cantidad de metal presente en el organismo (Rahimzadeh et al. 2017). Exposiciones en modelos animales, como en el humano han mostrado tener efectos adversos o tóxicos en diferentes órganos y tejidos. Dentro de los más afectados se encuentran el hígado, riñón, pulmones, intestino, sistema nervioso central, ovarios, testículo y páncreas (Thévenod and Lee 2013).

Este xenobiótico inflige daño en los órganos antes mencionados según la dosis, la vía de exposición y la duración de la exposición. Las diversas patologías vinculadas a Cd mencionadas en la literatura se han asociado con la inducción de estrés oxidativo, que en sinergia con la respuesta inflamatoria se vislumbran como el mecanismo directo o indirecto de daño. Se han mencionado dos pasos clave que involucran la activación de NF- $\kappa$ B y la liberación de citocinas. Los estudios realizados sobre el tema apoyan la idea de que el Cd está asociado al desarrollo de estrés oxidativo y la inflamación, mismos que se han mencionado como críticos en el desarrollo de patologías metabólicas. Particularmente, nuestro trabajo soporta la hipótesis de que la inflamación y el estrés oxidativo asociados a una exposición a cadmio tienen una relación directa con el desarrollo de resistencia a insulina.

Sin embargo, no existe información certera acerca del papel del metal sobre la vía de señalización de insulina y su relación con dichos factores, puntualmente en el tejido hepático, que pudieran estar promoviendo el estado de resistencia a la

hormona. Por lo que en el presente trabajo nos enfocamos a estudiar dicha hipótesis.

# Marco teórico

## Resistencia a insulina

La insulina es una hormona pleiotrópica que estimula el transporte de nutrientes a las células y regula la expresión génica de diferentes vías metabólicas. La acción de la insulina es consecuencia de la unión de la insulina a su receptor en la membrana plasmática y se transmite a través de una serie de interacciones proteína-proteína desencadenando vías de señalización lo que permite la captación de glucosa y la obtención energética (Cone 2005; de Luca and Olefsky 2006).

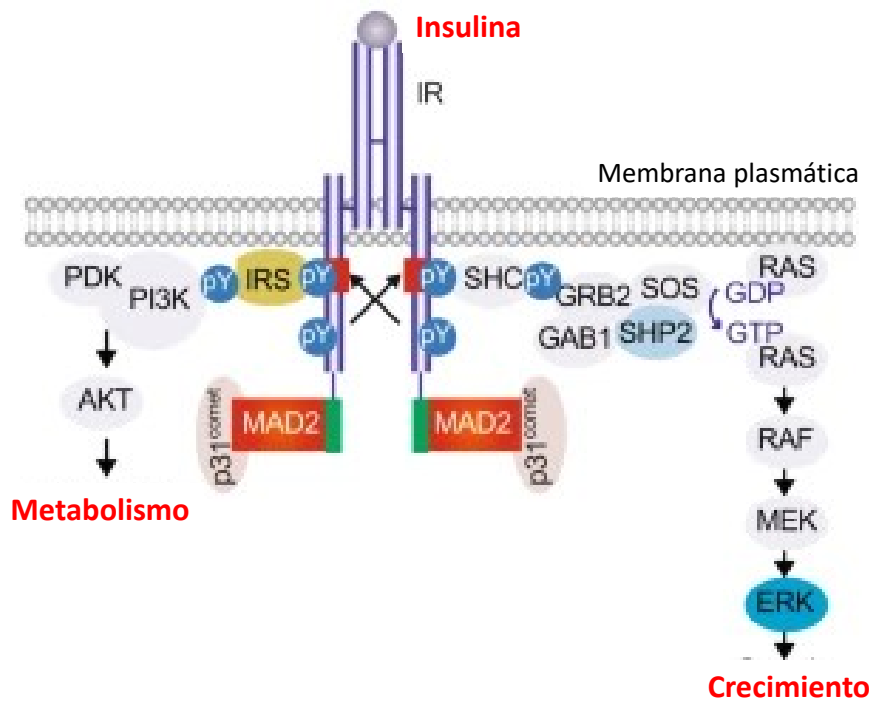


Figura 1. Vía de señalización del receptor de insulina. Tomado y modificado de Hall 2020.

Dos cascadas principales de vías de señalización median la acción de la insulina (**Figura 1**): una vía está involucrada en la regulación del metabolismo intermedio como la captación de glucosa, la lipogénesis y la supresión de la gluconeogénesis. vía del fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)-Akt (proteína quinasa B (PKB)). Mientras que la otra juega un papel en el control de los procesos de crecimiento y la mitosis, vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). La regulación de estas dos vías distintas puede dissociarse. De hecho,

algunos datos sugieren que la vía que regula el metabolismo intermedio sufre cambios, mientras que la regulación de los procesos de crecimiento y las mitosis es normal (Hall, Yu, and Choi 2020; Petersen and Shulman 2018; Samuel and Shulman 2016).

En la vía del metabolismo intermedio, la insulina aumenta la captación y utilización de glucosa en diferentes tejidos como músculo y tejido adiposo. A nivel hepático, la insulina además de la regulación del metabolismo de los carbohidratos también tiene efecto sobre el metabolismo de lípidos. Bajo condiciones fisiológicas, la ingesta de glucosa produce la liberación de insulina en el páncreas, que a su vez suprime la producción de glucosa hepática e induce lipogénesis de *novo* (DNL, por sus siglas en inglés), lo que regula la concentración plasmática de glucosa. Sin embargo, en estados de resistencia a la insulina (RI), la hormona no es capaz de suprimir la producción de glucosa, mientras que, paradójicamente la lipogénesis hepática es sostenida, contribuyendo tanto a estados hiperglucémicos como hiperlipémicos (Haas et al. 2012; Yecies et al. 2011). Asimismo, el aumento de DNL, induce una mayor RI, convirtiéndose en un ciclo vicioso (Williams et al, 2013).

La RI se define como un estado en el que la concentración fisiológicamente normal de insulina genera una respuesta biológica inferior a la normal, principalmente en hígado, músculo y el tejido adiposo. La definición clínica de RI es difícil de establecer, ya que no existe una prueba aceptada (estándar de oro) para su diagnóstico. Sin embargo, esta se reconoce a través de las alteraciones metabólicas asociadas, con una serie de parámetros clínicamente útiles que incluyen al modelo de evaluación de la homeostasis de resistencia a insulina (HOMA-IR), glicemia en ayuno y postprandial, insulina en ayuno y su respuesta ante una carga estándar de glucosa, conocida como prueba de tolerancia oral a glucosa (Courtney and Olefsky 2007).

Molecularmente, la activación del receptor de la insulina en la vía de señalización de PI3K conduce a la fosforilación de tirosina del sustrato del receptor de insulina (IRS1) iniciando de este modo la transducción de señales. Cuando IRS

es fosforilado en serina 307, su capacidad de señalización disminuye, lo que conduce a RI (Aguirre et al. 2002; Youngren 2007).

La etiología de la resistencia a la insulina se puede dividir en adquirida, hereditaria y mixta. La gran mayoría de las personas con RI pertenecen a las categoría adquirida, como el envejecimiento, sedentarismo, obesidad, consumo de alcohol, tabaquismo y algunos fármacos; sin embargo, en los últimos años se ha vinculado a la exposición de metales pesados (Ozougwu, Obimba, and Unakalamba 2013). Recientemente, nuestro laboratorio ha puesto en evidencia que, ratas expuestas a Cd en una dosis de nivel más bajo de efecto adverso observado (LOAEL) desarrollan RI en múltiples tejidos, incluido el hígado (Treviño et al. 2015).

A pesar de que, la fisiopatología de la RI involucra a tres tejidos principales, como son el músculo, el hígado y el tejido adiposo. Se postula que la RI comienza en el tejido muscular asociada a un cambio inflamatorio inmunomediado y excesos de ácidos grasos libres (AGL), lo que provoca la deposición de lípidos en este y otros tejidos. El músculo en condiciones fisiológicas representa hasta el 70% del consumo de glucosa. Por lo que, una absorción muscular deficiente, el exceso de glucosa regresa al hígado aumentando la DNL y los ácidos grasos libres circulantes, lo que contribuye a una mayor deposición ectópica de grasa, y por ende a RI en otros tejidos. En el hígado, la fisiopatología de la RI se centra en el papel que tiene la deposición de lípidos, incluyendo a los diacil gliceroles; sin embargo, el desarrollo de inflamación y estrés oxidativo tiene mayor relevancia (Petersen and Shulman 2018; Samuel and Shulman 2012, 2016).

## Inflamación y resistencia a insulina

Desde 1950, se ha presentado evidencia epidemiológica que sugiere una correlación entre la RI y la inflamación. En la década pasada, se hizo cada vez más evidente que la obesidad y el desarrollo concomitante de inflamación son los principales componentes de la RI (de Luca and Olefsky 2008). La inflamación se

describe como una interacción compleja en tejidos conectivos vascularizados como respuesta a estímulos exógenos y endógenos, con el objetivo de eliminar tanto la causa inicial de la lesión celular y las consecuencias de la lesión. Cuando una respuesta inflamatoria es activada por estímulos nocivos, se desencadena a través de dos etapas, aguda y crónica. Cada etapa está mediada por una cascada diferente de señalización (Das and Al-Naemi 2019).

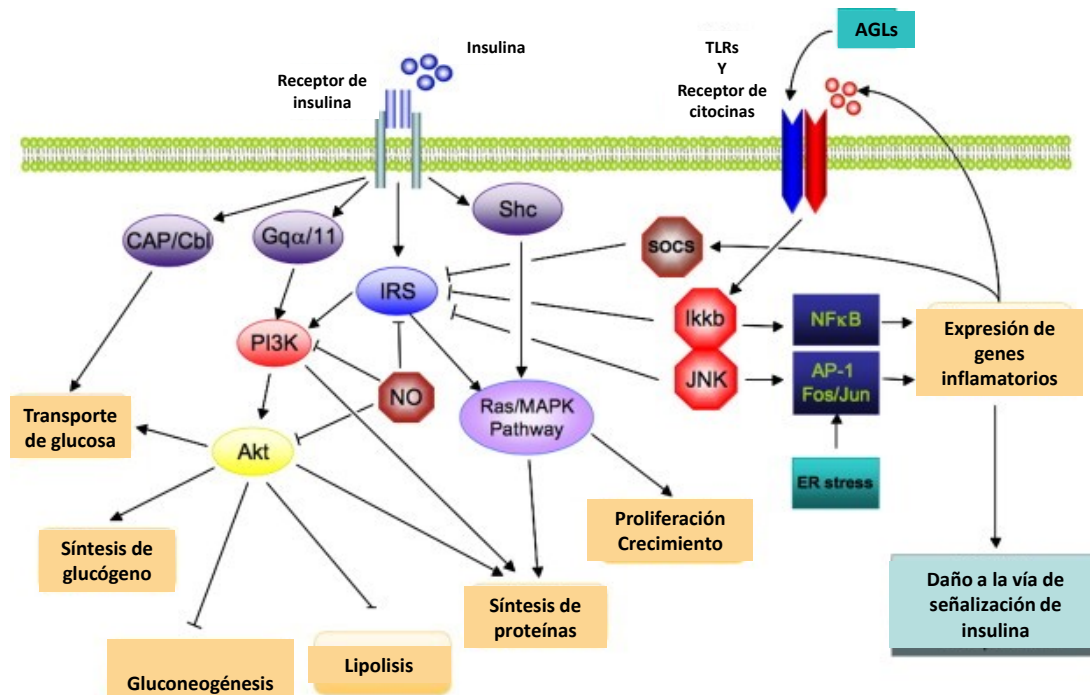
La inflamación aguda tiene una evolución diferenciada, que implican aumento de la permeabilidad vascular y reclutamiento de glóbulos blancos. Los eventos celulares están mediados por moléculas de adhesión celular e integrinas expresadas en células endoteliales y glóbulos blancos, respectivamente. Las células reclutadas producen citocinas (por ejemplo, interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8)). En dependencia del estímulo, se puede amplificar la señal, que generaría una mayor cantidad y diversidad de citocinas, y promueven la migración y activación de leucocitos al sitio de la lesión. La falla en la resolución exitosa del agente incitante del sistema desplaza la respuesta aguda hacia un proceso más complejo que conduce a la respuesta crónica (Fougère et al. 2017; Nathan and Ding 2010).

La inflamación crónica se caracteriza por la infiltración de células mononucleares como monocitos y linfocitos, proliferación de fibroblastos, formación de tejido conectivo y presencia de fibras de colágeno. La inflamación crónica está mediada por interleucina 12 (IL-12), interleucina 4 (IL-4) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), que regulan la activación y diferenciación de los linfocitos T. La presencia de linfocitos T y linfocitos B es un indicador de alta probabilidad de la persistencia de un agente incitante. Con la inflamación crónica, el reclutamiento continuo y desregulado de células inflamatorias se inflige daño tisular mediado por especies de nitrógeno, proteasas y especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) liberadas por las células inflamatorias (Nathan and Ding 2010; Fougère et al. 2017).

Particularmente, la inflamación crónica inducida por la obesidad es un componente clave en la patogénesis de la RI y el síndrome metabólico. Las citocinas

proinflamatorias pueden causar RI en el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado al inhibir la transducción de señales de insulina. Las fuentes de citocinas en estado de RI son los propios tejidos diana a la hormona, mediado por macrófagos residentes de cada tejido. Este fenómeno se observa en el tejido adiposo y el hígado, por lo que resultan tejidos fuertemente afectados. Si bien los factores iniciadores de esta respuesta inflamatoria aún no se han determinado completamente, la inflamación crónica en estos tejidos podría causar RI localizada o selectiva a través de la señalización de citocinas autocrinas/paracrinas. Y además RI sistémica a través de la señalización de citoquinas endocrinas, que en conjunto contribuye al estado metabólico anormal (de Luca and Olefsky 2008). Niveles elevados de factor de TNF- $\alpha$ , IL-6 y la interleucina IL-8 han sido reportados en RI y diabetes (Hotamisligil et al. 1995; Hotamisligil and Spiegelman 1994; Roytblat et al. 2000; Straczkowski et al. 2002).

Las investigaciones actuales se centran en las vías de transducción de señal activadas por la inflamación, en lugar de las citocinas individuales, ayudando a reestructurar el marco para pensar en RI y su vínculo con la inflamación (**Figura 2**). Muchos de los estímulos proinflamatorios típicos activan simultáneamente las vías JNK e IKK $\beta$ , incluidas las citocinas y los receptores tipo toll (TLR). Por lo que, la inhibición genética o química de JNK o IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B puede mejorar la RI. Las citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  activan JNK e IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B a través de mecanismos clásicos mediados por receptores que han sido bien caracterizados (Shoelson, Lee, and Goldfine 2006).



**Figura 2. Interacción directa de la señalización de la insulina y las vías inflamatorias.** La cascada de señalización de la insulina se ramifica en dos vías principales. La vía PI3K/AKT media la acción de la insulina sobre el metabolismo de los nutrientes, incluida la absorción de glucosa. La vía Ras/MAPK media el efecto de la insulina sobre la expresión génica, pero también interactúa con la vía PI3K-AKT para controlar el crecimiento y la diferenciación celular. La activación del receptor de insulina conduce a la fosforilación de tirosina de IRS1 iniciando así la transducción de señales. La estimulación de las vías inflamatorias NFκB y AP-1 Fos/Jun da como resultado la activación de las serina cinasas, IκB y Jnk1, que reducen la capacidad de señalización de IRS1. Los reguladores negativos adicionales relacionados con la inflamación de las proteínas IRS incluyen las proteínas Socs y NO, que se inducen en la inflamación y promueven la degradación del IRS. El NO también reduce la actividad de PI3K/Akt por s-nitrosilación de Akt.

JNK e IKKβ/NF-κB también se activan mediante receptores de reconocimiento de patrones, definidos como proteínas de superficie que reconocen sustancias extrañas. Estos incluyen los TLR y el receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE). Muchos ligandos de TLR son productos microbianos, incluidos el lipopolisacárido (LPS) y lipopéptidos derivados de bacterias. El hecho de que los TLR reconozcan los conjugados de lípidos microbianos ha llevado a la especulación de que los lípidos endógenos o los conjugados de lípidos también podrían activar uno o más de los TLR en la obesidad, una posibilidad respaldada por experimentos que muestran que los ácidos grasos saturados se unen y activan el TLR4. Asimismo, RAGE se une a una variedad de ligandos, incluidos los productos finales de glicación avanzada (AGE) endógenos y un conjunto distinto de productos microbianos. Los AGE son aductos no enzimáticos que se forman entre la glucosa y las proteínas diana, particularmente aquellas con tasas lentas de

recambio. La hiperglucemia prolongada y la producción concomitante de cantidades excesivas de AGE pueden activar NF- $\kappa$ B (de Luca and Olefsky 2008; Shoelson, Lee, and Goldfine 2006).

Por otro lado, la inflamación del tejido adiposo promueve elevadas concentraciones circulantes de AGL (Petersen and Shulman 2018; Samuel and Shulman 2012), que pueden activar directamente la respuesta pro-inflamatoria en células endoteliales vasculares y hepáticas (Kim et al. 2005). La inflamación hepática también puede ocurrir como resultado de la esteatosis y/o aumento de la respuesta de tensión en las células hepáticas, dando lugar a la inflamación de los hepatocitos. Las células de Kupffer también pueden liberar citoquinas que actúan localmente, lo que agrava aún más la inflamación y la resistencia hepática a la insulina (de Luca and Olefsky 2008).

Además de las citocinas proinflamatorias y los receptores de reconocimiento de patrones, el estrés celular activa JNK y NF- $\kappa$ B, incluido las ROS y el estrés reticular (ER). Los marcadores sistémicos de estrés oxidativo aumentan con la adiposidad, y por ende, se desarrolla RI inducida por la obesidad. Un mecanismo potencial es a través de la activación de NADPH oxidasa por acumulación de lípidos en el adipocito, lo que aumenta la producción de ROS. Se demostró que este mecanismo aumenta la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 y a la proteína quimio atrayente de monocitos 1 (MCP-1). De acuerdo con esto, el antioxidante *N*- acetilcisteína puede reducir las ROS y mejorar la RI en modelos de hiperglucemia (Shoelson, Lee, and Goldfine 2006; Tangvarasittichai 2015).

## Estrés oxidativo y resistencia a insulina

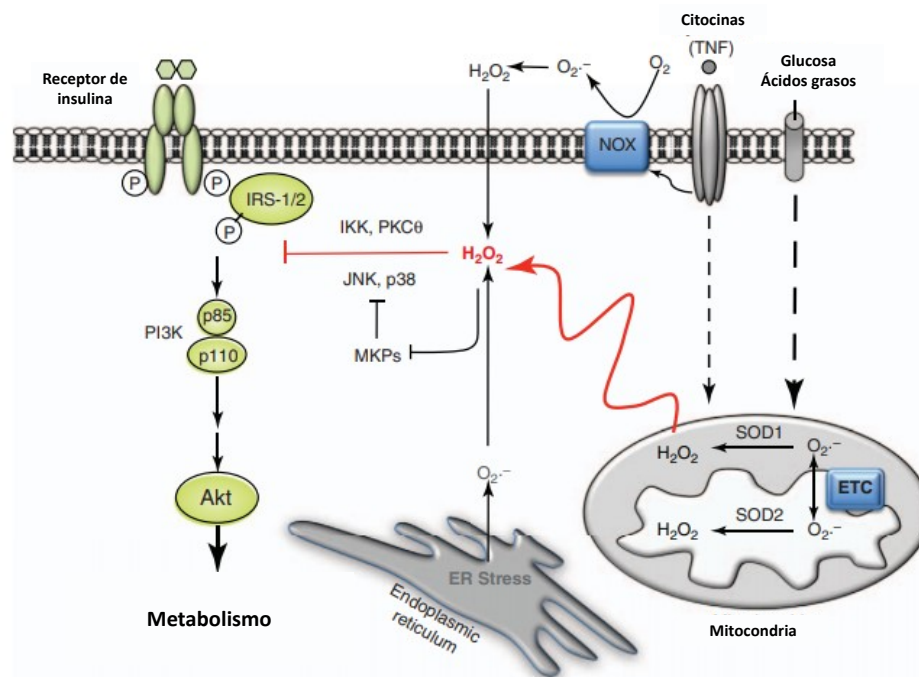
Recientemente se ha hecho evidente que las vías de señalización proinflamatorias pueden activarse por tensiones metabólicas procedentes del interior celular, así como por moléculas de señalización extracelulares como las ROS (Morgan and Liu 2011; Thévenod 2009).

El estrés oxidativo se ha reconocido recientemente como un mecanismo clave en la RI. El estrés oxidativo se define por el exceso de especies oxidativas endógenas, que dañan las células y alteran vías de señalización. Las especies reactivas, especialmente el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $HO\bullet$ ), aniones superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radicales peroxilo ( $RO\bullet$ ) y alcoxilo ( $ROO\bullet$ ) se producen a niveles fisiológicos bajos principalmente en las mitocondrias y peroxisomas. Asimismo, las ROS se producen de forma endógena y tienen importancia fisiológica a niveles bajos, especialmente en las vías de señalización, aunque estos mecanismos aún no están claros debido al doble papel que desempeñan las ROS como señal y como agente dañino. Entre las funciones de señalización se encuentran el control transcripcional y la regulación del ciclo celular. El peróxido de hidrógeno, se ha investigado específicamente como un "interruptor redox" que puede conducir a círculos viciosos de estimulación redox. Se acepta con frecuencia que las ROS se vuelven dañinas cuando superan los niveles fisiológicos. Estudios recientes han concluido que el daño por las ROS tiene un papel directo en el desarrollo y progresión de muchas enfermedades crónicas, incluida la patogénesis de la RI y diabetes tipo 2 (Houstis, Rosen, and Lander 2006; Ingram, Diotallevi, and Brighton 2017).

Las mitocondrias contribuyen al estado oxidativo celular debido a ambientes ricos en nutrientes. Debido a un mayor suministro dietario de glucosa en la dieta, las mitocondrias tienen más sustrato disponible para producir ATP. Por tanto, las mitocondrias son hiperactivas y producen más de su subproducto natural, ROS. El aumento de ROS daña las subestructuras celulares e induce respuestas de estrés. Las ROS estimulan directamente NF- $\kappa$ B, JNK y p38 MAPK dando como resultado respuestas de estrés inducidas por las mitocondrias (Tiganis 2011).

El oxígeno producido en las mitocondrias, que se dismuta en  $H_2O_2$  por acción de la superóxido dismutasa (SOD1) (espacio intermembrana mitocondrial) y SOD2 (matriz mitocondrial), difunde entre membranas y promueve la activación de las proteínas quinasas Ser/Thr como IKK $\beta$ , PKC $\alpha$  y las MAPK's JNK y p38 [cuya activación podría estar parcialmente mediada peroxidación e inactivación de MAPK

fosfatasa (MKP)], que fosforilan el IRS-1/2, inhibiendo la asociación del IRS-1/2 con el IR, y promueven su degradación, además de suprimir el reclutamiento y la activación de PI3K. Las citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  promueven la generación de ROS mitocondriales y activan las enzimas NADPH oxidasa (NOX) en la membrana para contribuir al desarrollo de la RI (**Figura 3**) (Tiganis 2011).



**Figura 3. Especies reactivas de oxígeno y resistencia a insulina.** Tomado y modificado de (Tiganis 2011).

## Cadmio, inflamación y estrés oxidativo.

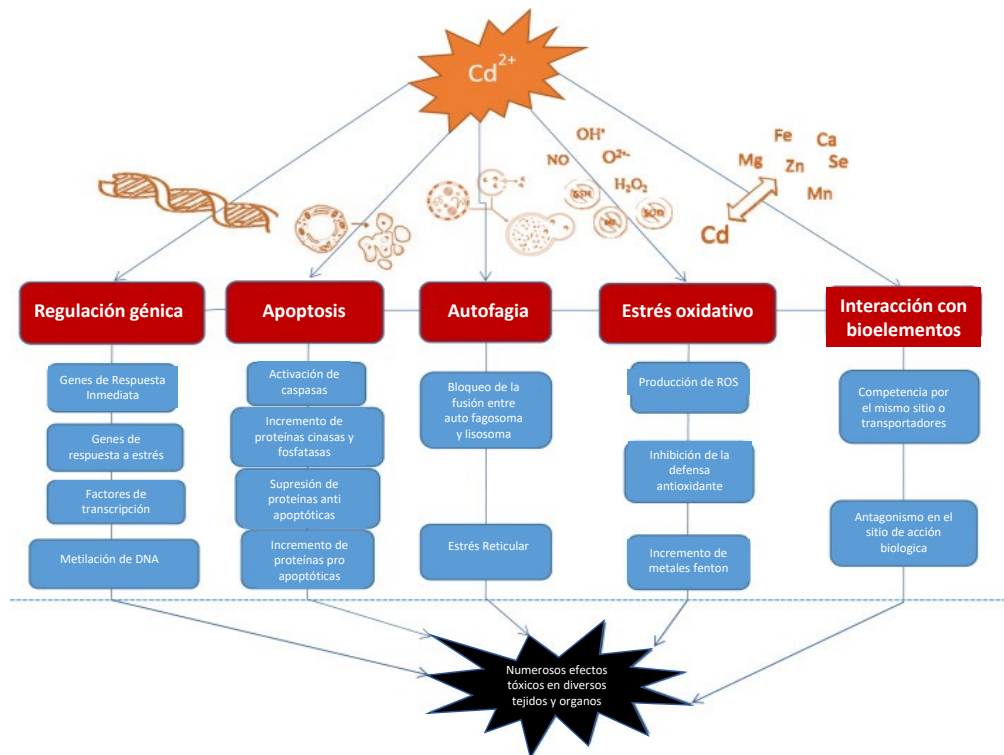
La idea central que llevo a realizar el presente trabajo parte en la hipótesis de que la RI por exposición a cadmio puede tener un trasfondo molecular asociado al estrés oxidativo e inflamación.

### Generalidades y toxicidad por cadmio.

El Cd, es un metal pesado que no tiene una función fisiológica y a menudo se considera tóxico. Se han demostrado muchas formas diferentes de exposición al

cadmio durante el siglo pasado, estando presente en el medio ambiente como resultado de actividades humanas. Las fuentes constantes de contaminación por Cd están relacionadas con su aplicación en la industria como reactivo corrosivo, estabilizador en productos de PVC, pigmentos de color y baterías de Ni-Cd. Las fuentes antropogénicas de Cd en el medio ambiente provienen de la fundición y refinación de cobre y níquel, la combustión de combustibles fósiles y el uso de fertilizantes fosfatados. El Cd también está presente como contaminante en las fundiciones de metales no ferrosos y el reciclaje de desechos electrónicos. La actividad volcánica, el proceso gradual de erosión, abrasión de rocas y suelos, y de incendios forestales aumentando las concentraciones de Cd en la atmósfera, suelo y agua. Incluso las minas de zinc, plomo y cobre contribuyen a la liberación de este metal a la atmósfera, lo que resulta en la contaminación del suelo y agua (Genchi et al. 2020; Rahimzadeh et al. 2017).

La exposición a Cd se produce principalmente por la ingestión de agua y alimentos contaminados y en gran medida, por la inhalación y el tabaquismo. El metal se acumula en plantas y animales con una vida media prolongada de unos 25 a 30 años. Los datos epidemiológicos sugieren que la exposición ocupacional y ambiental puede estar relacionada con varios tipos de cáncer, incluidos los de mama, pulmón, próstata, nasofaringe, páncreas y riñón (Genchi et al. 2020; Rahimzadeh et al. 2017). También se ha demostrado que el metal ambiental puede ser un factor de riesgo de osteoporosis. El hígado y los riñones son extremadamente sensibles a los efectos tóxicos del Cd. En los seres humanos, la exposición al xenobiótico puede provocar una variedad de efectos adversos, como disfunción renal y hepática, edema pulmonar, daño testicular, osteomalacia y daño a las glándulas suprarrenales y al sistema hematopoyético. Además de sus efectos citotóxicos que podrían conducir a eventos apoptóticos o necróticos, es un carcinógeno humano probado (grupo I de la clasificación de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer).



**Figura 4. Mecanismos generales y vías moleculares específicas de toxicidad por cadmio.** La figura muestra los mecanismos generales (regulación génica, apoptosis, autofagia, estrés oxidativo e interacción con bioelementos) junto con las vías moleculares específicas de la toxicidad del Cd. Aunque se presenta jerárquicamente, no se puede favorecer ninguno de los mecanismos presentados. La autofagia depende de la expresión génica, así como de la inducción o inhibición de la apoptosis por autofagia. Tanto la apoptosis como la autofagia son inducidas por ROS, mientras que la inducción de ROS ocurre por la interacción del Cd con bioelementos. La figura presenta cómo se entrelazan estos mecanismos y vías específicas de toxicidad. Tomado y modificado de Đukić-Čosić et al. 2020.

Las acciones tóxicas del Cd en el organismo se han investigado ampliamente, pero aún no se han aclarado por completo, porque pueden cambiar con la dosis, tiempo y vía de exposición. Los mecanismos más críticos de la toxicidad del Cd (**Figura 4**) se enfocan en cambios en la expresión génica y reparación del ADN, interferencia con las vías de autofagia y apoptosis, inducción de estrés oxidativo, interacción con bioelementos y modificaciones epigenéticas. Estos mecanismos subyacen al posible papel del Cd como disruptor metabólico (Đukić-Čosić et al. 2020).

### Cadmio y estrés oxidativo

Las patologías de la intoxicación por Cd se han asociado con la promoción del estrés oxidativo. Se ha discutido que el desequilibrio producción de oxidantes y

antioxidantes de un organismo, puede ser el resultado de la sobreproducción de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) o una eliminación alterada dada por la defensa oxidante. Las especies reactivas de oxígeno incluyen al  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{O}^{2-}$ ,  $\text{RO}\cdot$  y  $\text{ROO}\cdot$ , mientras que las RNS incluyen el radical óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), el radical dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2\cdot$ ) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Das and Al-Naemi 2019; Nemmiche 2016).

La homeostasis redox está mediada por antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas y la correcta activación de factores de transcripcionales como el Nrf2 y NF- $\kappa$ B. Las enzimas del sistema antioxidante que protegen contra las ROS son la SOD, la catalasa (Cat) y la glutatión peroxidasa (GPx). Otra enzima involucrada en el sistema de defensa antioxidante es la glutatión reductasa (GR) que reduce glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). Tanto GPx como GR trabajan juntos en las células para mantener un estado estable en la proporción de GSH a GSSG (Das and Al-Naemi 2019; Nemmiche 2016).

En respuesta al Cd, dependiendo de la ruta de exposición, se activan diversos mecanismos de defensa celular para superar sus efectos tóxicos. Entre los principales mecanismos de defensa se encuentran la inducción de metalotioneína (MT) principalmente en el riñón y el hígado, incremento en la concentración del glutatión y la activación del factor de transcripción Nrf2. Estos mecanismos no son "excluyentes entre sí", por lo que pueden trabajar en conjunto, y de manera cohesiva para resistir al estrés oxidativo inducido por Cd. El Cd que ingresa al torrente sanguíneo, se distribuye a través de eritrocitos o albúmina, y en el hígado forma complejos con MT (Cd-MT), que puede ser redistribuido a riñón y otros tejidos. En los diferentes tejidos, puede coexistir como Cd libre, el cual puede inducir la generación de ROS, cuando los metales Fenton (como el hierro y el cobre) son desplazados por el xenobiótico o por agotamiento de GSH (Das and Al-Naemi 2019; Sabolić et al. 2010).

El GSH es un objetivo de los iones de Cd ( $\text{Cd}^{2+}$ ). El agotamiento de la reserva de GSH conduce a la interrupción del equilibrio redox y a un entorno oxidativo. Por lo tanto, se considera que el daño oxidativo inducido por Cd es un mecanismo de

toxicidad importante que debilita el balance redox tisular. Como es conocido cada tejido u órgano tiene umbrales redox diferentes, por lo que el Cd, presenta efecto tóxico en dependencia de dicho umbral (Das and Al-Naemi 2019; J. Liu, Qu, and Kadiiska 2009; López et al. 2006; Matović et al. 2011; Nemmiche 2016).

El Cd no induce la producción de ROS directamente, sin embargo, genera radicales libres indirectamente, como se ha descrito previamente. La respuesta resultante al estrés oxidativo depende de la duración de la exposición, aguda o crónica. En el caso de exposiciones agudas, se generan radicales libres que incluyen anión superóxido, peróxido de hidrógeno, y productos de lipoperoxidación. Esta generación de radicales libres inducida por Cd está mediada por mecanismos indirectos como el agotamiento del glutatión, la activación de las células de Kupffer, la inflamación y la participación del hierro en las reacciones de Fenton. Sin embargo, en la exposición crónica a dosis bajas ambientalmente relevantes, se plantea la hipótesis de que se activan mecanismos adaptativos para superar las ROS y el estrés oxidativo, de manera que, cuando la generación de ROS sobrecarga el sistema de defensa antioxidante, comienza la peroxidación lipídica y el daño oxidativo (Arroyo et al. 2013; Das and Al-Naemi 2019; J. Liu, Qu, and Kadiiska 2009; López et al. 2006; Nemmiche 2016).

El metal además, es capaz de producir un daño mitocondrial y por lo tanto aumenta la formación de ROS mitocondrial, y la formación de ROS mediante la activación de las enzimas NOX, como se ha descrito para el hígado. El daño oxidativo a las macromoléculas por el incremento de ROS, incluyen a los hidratos de carbono, proteínas, lípidos y ADN, produciendo modificaciones irreversibles en las macromoléculas. Los biomarcadores de estrés oxidativo comúnmente empleados para su identificación incluyen el malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-alquenes (4HDA) y productos de oxidación de proteínas y lípidos (Matović et al. 2011; Tangvarasittichai 2015).

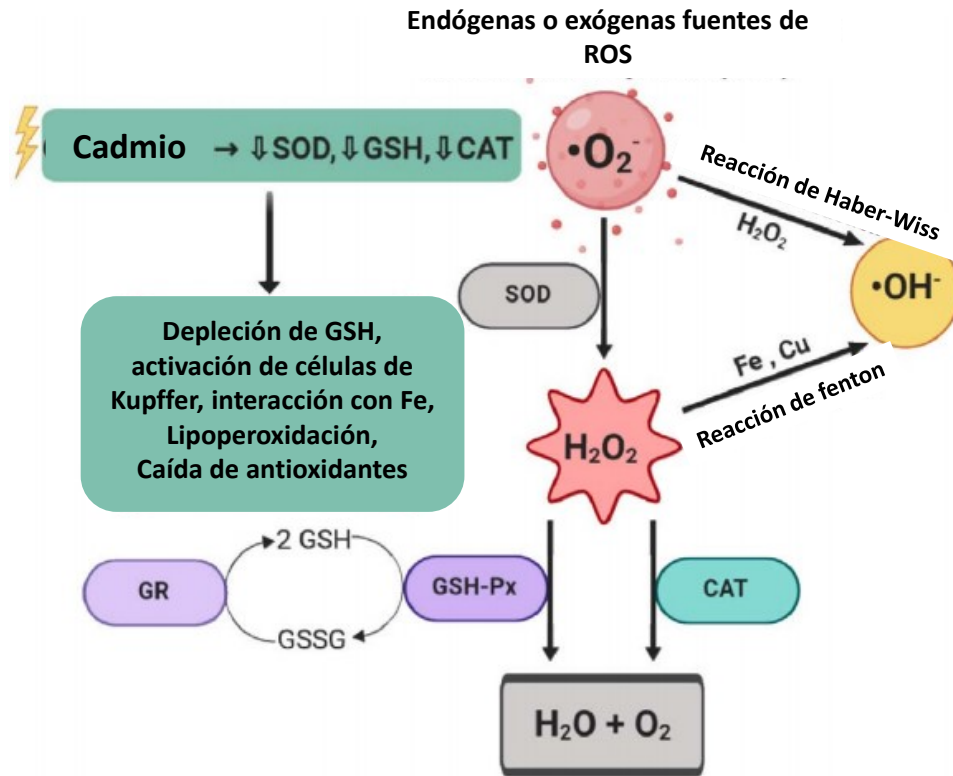


Figura 5. Vías de generación de especies reactivas de oxígeno inducidas por Cd. Tomado y modificado de (Das and Al-Naemi 2019)

## Cadmio e inflamación

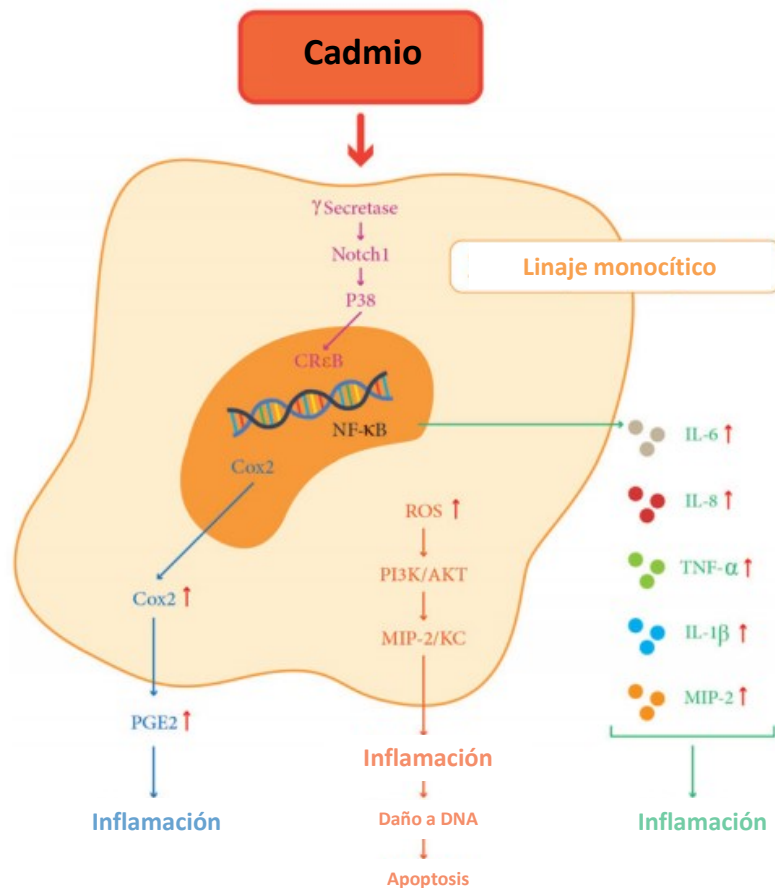
Fisiopatológicamente, la inflamación y el estrés oxidativo están estrechamente relacionados, ya que uno puede ser inducido por el otro. Con la inflamación crónica, el reclutamiento continuo de células inflamatorias que se desregula inflige daño tisular mediado por especies de nitrógeno, proteasas y ROS liberadas por las células inflamatorias. En el sitio de la inflamación, las células inflamatorias liberan especies reactivas que conducen a un estrés oxidativo exagerado. Además, las ROS pueden ser generadas indirectamente por las células inflamatorias, y en conjunto pueden inducir y amplificar cascadas de señalización que redundan sobre la expresión de genes proinflamatorios (Das and Al-Naemi 2019; Hossein-Khannazer et al. 2020; Maccarrone and Brüne 2009).

La participación de diversos factores de transcripción (NF- $\kappa$ B, AP-1), moléculas de adhesión (ICAM-1, PECAM-1, VCAM-1), secreción de varias quimiocinas (IL-8 y MCP-1), enzimas (MPO, iNOS, MMP, COX-2), especies reactivas (ROS, RNS) y mediadores químicos (NO, componentes del complemento) han sido implicados en el proceso de infiltración celular inflamatoria, induciendo así daño tisular y estrés oxidativo. Por lo que es posible que, tanto el estrés oxidativo como la inflamación están implicados simultáneamente en la patogenia por exposición a Cd (Blaser et al. 2016; T. Liu et al. 2017).

Una cantidad considerable de literatura publicada sobre el efecto proinflamatorio del Cd ha informado de la producción y regulación positiva de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  *in vivo* e *in vitro*. IL-6 es un marcador tradicional de inflamación, que promueve la inducción de proteínas de fase aguda y también puede mediar en la transición de la inflamación aguda a la crónica. El TNF- $\alpha$  es una citocina producida por macrófagos activados en respuesta a estímulos dañinos. La IL-1  $\beta$  se expresa en una amplia gama de células que desempeñan un papel en la activación de la cascada de NF- $\kappa$ B y, por tanto, en la inducción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (Arroyo et al. 2013; Das and Al-Naemi 2019; Hossein-Khannazer et al. 2020; Maccarrone and Brüne 2009; Olszowski et al. 2012; Rennolds et al. 2012). La producción de estas citocinas podría desempeñar un papel en la amplificación del proceso inflamatorio y estrés oxidativo, en los tejidos blanco de Cd (**Figura 6**).

Curiosamente, conforme se presentan un mayor número de informes sobre los efectos proinflamatorios del Cd, también hay una contradicción en las evidencias con respecto a su efecto inmunomodulador. Un punto clave de los efectos diferenciales del Cd es el uso de diferentes dosis y sistemas biológicos que pueden mostrar diferentes mecanismos de respuesta para superar la carga de Cd. Los estudios presentados hasta ahora demuestran que la exposición al Cd en diferentes dosis que van desde 0.44 mg / kg hasta 200 mg / kg de peso corporal, y se dirigen a múltiples sistemas orgánicos al inducir estrés oxidativo e inflamación sistémica y, en consecuencia, daño tisular. La extensión del daño al tejido (como arquitectura

histológica alterada, fibrosis, necrosis, apoptosis) como resultado de la exposición al Cd depende de la dosis y la duración de la exposición (Hossein-Khannazer et al. 2020).



**Figura 6. Efectos proinflamatorios de la exposición al cadmio en neutrófilos y macrófagos.** El cadmio aumenta las citocinas y quimiocinas inflamatorias, la inducción del reclutamiento de neutrófilos y macrófagos y el daño tisular. El Cd regula al alza la caspasa 3 y causa apoptosis celular. Tomado y modificado de (Hossein-Khannazer et al. 2020).

## Cadmio y resistencia a insulina

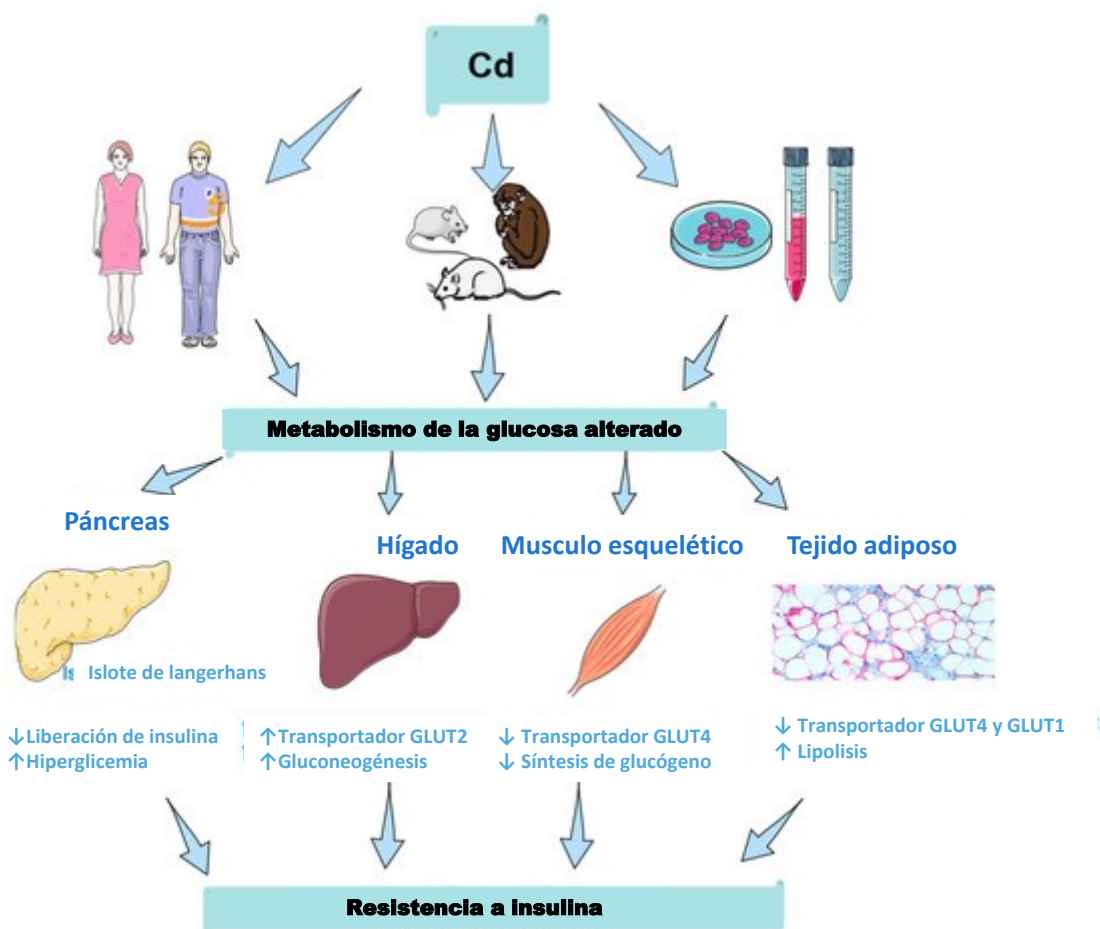
Hace más de cincuenta años, se ha expuesto evidencia que sugiere que ciertos elementos inorgánicos pueden alterar la utilización de glucosa en los tejidos por la oxidación de grupos sulfhidrilo. Desde la década de 1970, ha habido una

creciente evidencia que apoya la participación de estos elementos en varios trastornos metabólicos asociados con la función alterada de las células  $\beta$ . Diferentes elementos inorgánicos pueden influir en la regulación adecuada de la homeostasis insulina/glucosa (Buha et al. 2020). Nuestro interés se centra en las acciones del Cd, alterando numerosos sistemas de células y órganos como ya se describió en párrafos anteriores. Uno de los primeros informes sobre Cd y diabetes apareció hace casi cuatro décadas, cuando en 1980 Merali y Singhal relataron que la exposición neonatal al Cd resulta en el desarrollo de diabetes en ratas (Merali and Singhal 1980).

A pesar de que existen estudios en humanos que investigan el vínculo entre la exposición al Cd y la IR, son limitados y han arrojado datos contradictorios. Aunque se ha evidenciado o sugerido el papel dañino del Cd sobre la homeostasis de la glucosa, el debate continúa sobre la importancia de la toxicidad del Cd en la creciente incidencia de diabetes. El daño biológico del Cd se ha documentado desde trabajos en cultivos celulares hasta en poblaciones humanas (Buha et al. 2020; J. Edwards and Ackerman 2016; J. R. Edwards and Prozialeck 2009; Tinkov et al. 2017). Sin embargo, la literatura sobre la toxicidad del metal cubre una variedad de condiciones y formatos experimentales (dosis, tiempo y vía de exposición), por lo que es difícil sacar conclusiones convincentes y sólidas a partir de los datos disponibles. Lo que ha complicado la interpretación de la hiperglucemia mediada por Cd, a tal punto que Jacquet y cols. proporcionó una revisión exhaustiva de estos informes contradictorios en una revisión de 2016, donde categorizaron los efectos del Cd como tener “asociaciones”, “no asociación” o “potenciación” en la diabetes (Jacquet et al. 2016).

A pesar de esto, se ha tratado de explicar la asociación toxicológica de cadmio sobre diversos tejidos metabólicamente importantes (**Figura 7**). En páncreas, se respaldan por un patrón de acumulación dependiente de la dosis, principalmente en las células  $\beta$  productoras de insulina, lo que provoca una disminución en la liberación de insulina y un aumento de la glucosa en sangre. Además se ha informado afección del transporte de glucosa en tejidos

insulinodependientes (hígado) y dependientes de insulina (músculo esquelético y tejido adiposo) (Buha et al. 2020; J. Edwards and Ackerman 2016; J. R. Edwards and Prozialeck 2009; Tinkov et al. 2017).



**Figura 7. Papel del cadmio (Cd) en la resistencia a la insulina y la tolerancia a la glucosa / metabolismo alterado de la glucosa en varios órganos:** resumen de los resultados obtenidos de estudios en humanos, animales y células. Tomado y modificado de (Buha et al. 2020).

En el tejido adiposo, especialmente en adipocitos blancos, la insulina suprime la lipólisis y aumenta el transporte de glucosa y la lipogénesis. Por tanto, la RI en tejido adiposo es la incapacidad de la insulina para activar el transporte de glucosa adiposa, promover la captación de lípidos y suprimir la lipólisis. Se han propuesto varios mecanismos para contribuir a los efectos adversos del Cd en la fisiopatología del tejido adiposo y, posteriormente, aumentar la RI, como la alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT) en ratas, reducción de la proteína GLUT4 y los niveles de ARNm de GLUT4. Además, el estado de IR en el tejido adiposo favorece las vías lipolíticas, lo que resulta en una elevación de los ácidos grasos libres (FFA), que

además contribuye a la secreción alterada de insulina cuando se libera en el plasma (Buha et al. 2020; Tinkov et al. 2017).

Por último, teniendo en cuenta los efectos nefrotóxicos del Cd, y el papel de este tejido en la homeostasis de la glucosa, la cual se logra mediante los procesos de gluconeogénesis, filtración, reabsorción y consumo de glucosa, se podría presumir que, el efecto tóxico del Cd en los riñones contribuyen al desarrollo de diabetes hasta cierto punto (Buha et al. 2020; J. Edwards and Ackerman 2016; J. R. Edwards and Prozialeck 2009).

A pesar de todos los hallazgos descritos, los mecanismos moleculares que vinculan la exposición al Cd con el desarrollo de RI aún deben estudiarse. Si bien se describen los efectos celulares y tisulares individuales del Cd, es probable que no estén involucrados mecanismos únicos, sino que existen múltiples mecanismos que actúen de manera sinérgica.

En este sentido en nuestro grupo de trabajo, hemos evaluado la vía de señalización de insulina a nivel hepático después de la exposición de Cd en ratas, evidenciado el desarrollo de RI caracterizada por cambios en la fosforilación del receptor a insulina; incrementando fosforilaciones atípicas en treonina y disminuyendo la fosforilación en residuos de tirosina. Asimismo, el incremento en la expresión de ERK1/2 (Sarmiento-Ortega 2017). Esta proteína es clave en la vía de las MAPKs, pero con un papel poco estudiado en el metabolismo. Estos datos sugieren que el incremento de ERK1/2 podría suceder independientemente de la vía de señalización de insulina. Particularmente este último hallazgo abre la posibilidad de que la vía de señalización de insulina en la exposición a Cd pueda alterarse por la mediación de vías de señalización secundarias a la exposición al metal, como la inflamación y el estrés oxidativo que son de las principales condicionantes fisiopatológicas para el desarrollo de RI.

La exposición a Cd vincula a vías de señalización secundarias del estrés oxidativo y la inflamación en las que pudieran verse inmiscuidas proteínas propias de la cascada de fosforilación de insulina. Por lo que, los resultados de nuestro

trabajo podrían proporcionar un enlace mecanicista plausible entre la inflamación, el estrés oxidativo y la RI por exposición a Cd.

## Planteamiento del problema

La RI es uno de los primeros eventos involucrados en patologías crónico-degenerativas como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Se presenta en el 23.7% de la población mundial; esta puede variar ampliamente en diferentes poblaciones, en la población México-Americana puede ser de hasta en un 58.3%. Por lo que, se han asociado diversos factores de riesgo en el curso temporal del desarrollo de la RI, en donde la exposición a contaminantes ambientales como el Cd es poco estudiada, comprendida y contemplada por los organismos internacionales.

Los principales mecanismos propuestos en la fisiopatología del desarrollo de RI es el incremento de estrés oxidativo y la inflamación, que a su vez pueden ser potencializados por la exposición de Cd. Sin embargo, se desconoce si existe una relación entre las vías de señalización de estrés oxidativo y la inflamación que produzcan estados de RI después de una exposición oral y crónica al metal.

## Justificación

La sociedad se enfrenta a la creciente prevalencia de enfermedades asociadas con la obesidad, incluyendo el síndrome metabólico, enfermedad de hígado graso no alcohólico, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, las cuales cobran una enorme factura en la sociedad por la pérdida de la salud, calidad de vida de manera “silenciosa”, dichas patologías comparten a la resistencia a insulina como la principal condición de deterioro crónico.

Siendo el Cd uno de los principales metales a los que se expone nuestra sociedad, es importante establecer su participación como un factor de riesgo para el desarrollo de resistencia a insulina, por lo que es de suma importancia conocer

los mecanismos moleculares que conllevan a su patogénesis. Principalmente proponemos a la inflamación y al estrés oxidativo, por lo que, al conocer su participación en estos mecanismos moleculares, se podría establecer terapias dirigidas ante exposiciones orales y crónicas al metal.

## Objetivo General

Conocer el papel de la inflamación y el estrés oxidativo promovido por la exposición a cadmio sobre el desarrollo de resistencia hepática a insulina

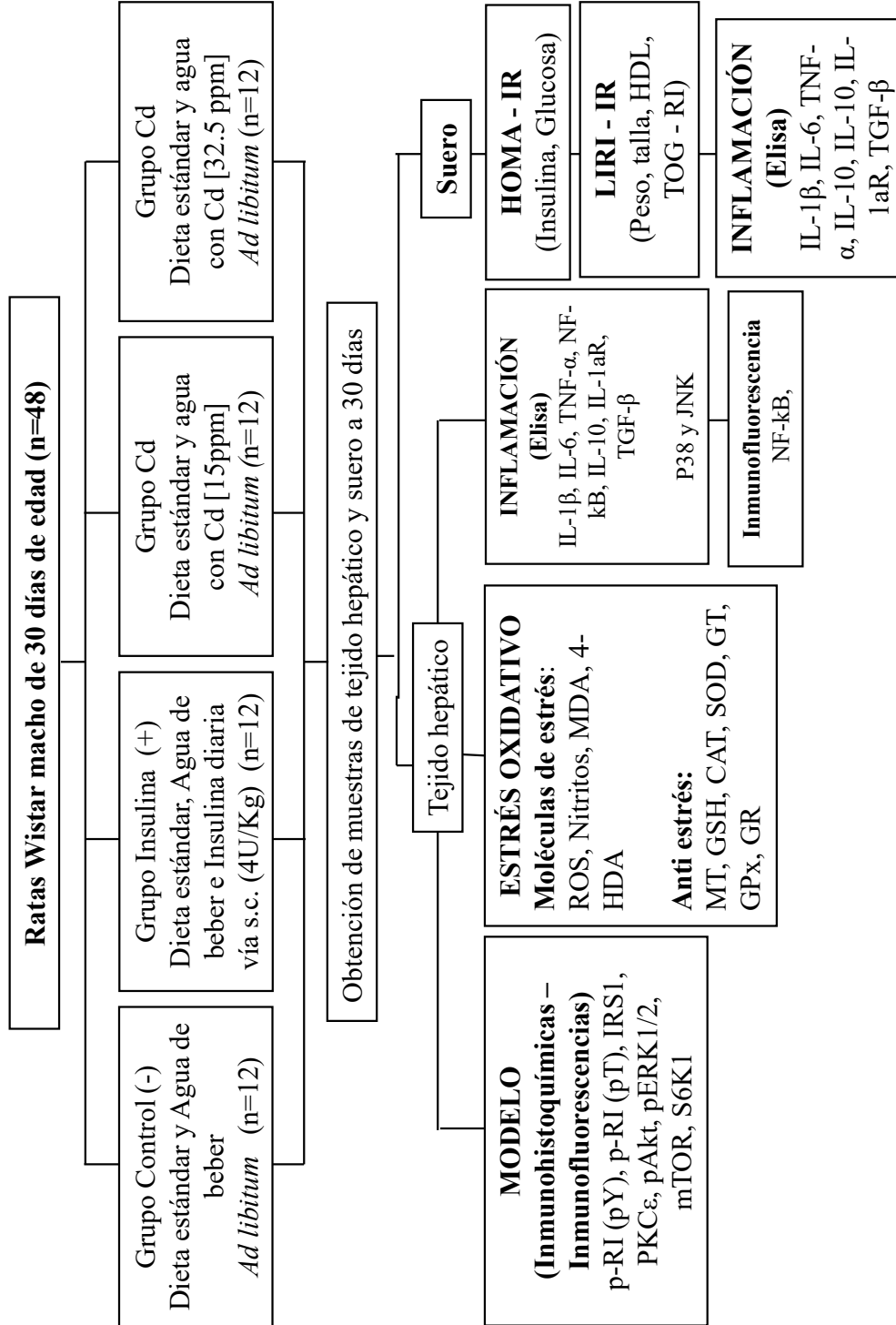
## Objetivos particulares

Con base en el papel pro-oxidante e inflamatorio del cadmio después de una exposición crónica:

- Evaluar la vía de señalización de resistencia hepática a insulina
- Determinar el papel del estrés oxidativo sobre el desarrollo de resistencia hepática a insulina
- Conocer el papel que juega la inflamación sobre el desarrollo de resistencia hepática a insulina.
- Evaluar el efecto de Curcumina sobre el desarrollo de resistencia hepática a insulina.
- Evaluar el efecto de Prednisona sobre el desarrollo de resistencia hepática a insulina.

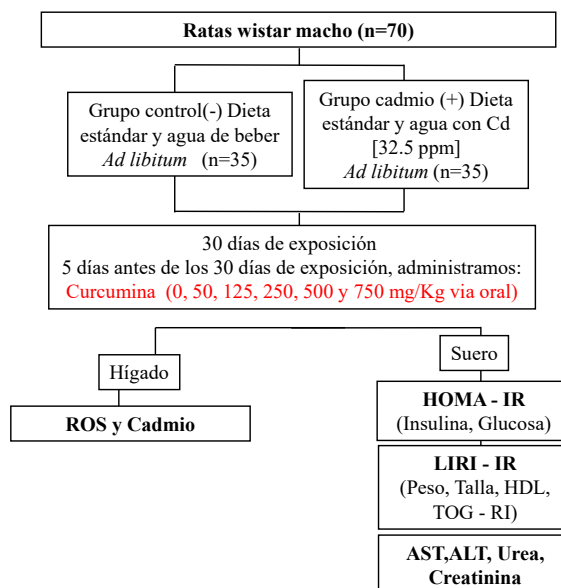
# Diseño experimental 1.

Efecto de la exposición de cadmio sobre el estrés oxidativo, inflamación y resistencia a insulina.



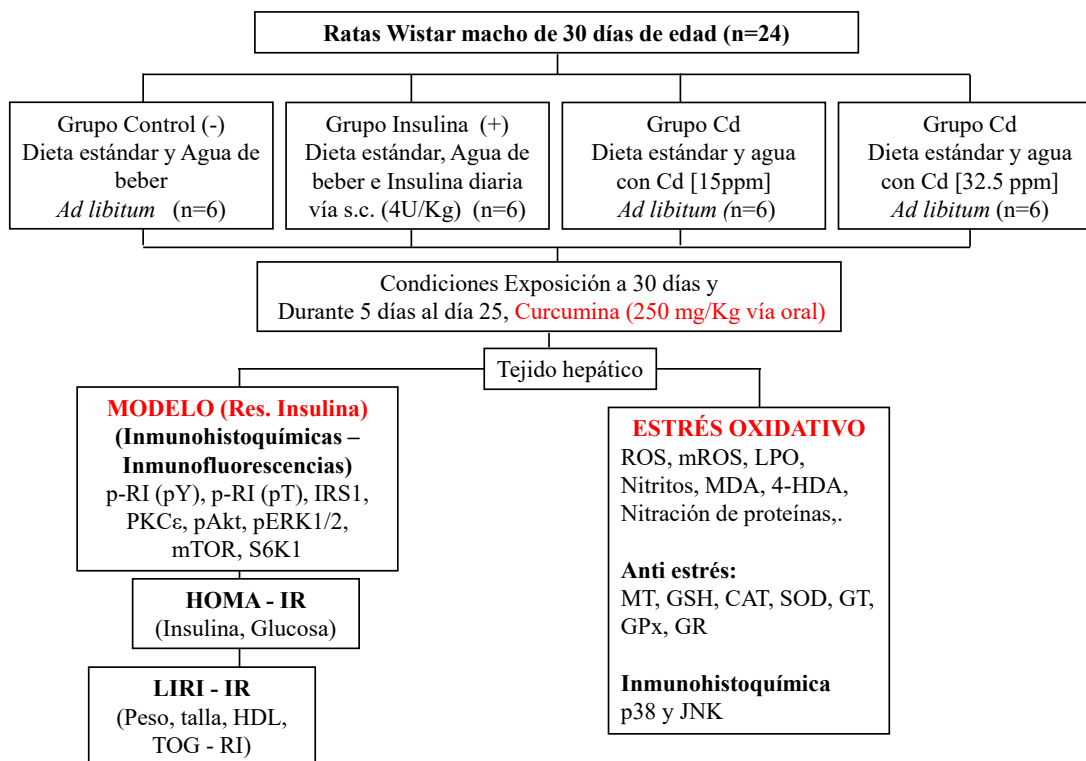
## Diseño experimental 2.

Curva dosis respuesta Curcumina-Resistencia a insulina y estrés oxidativo.



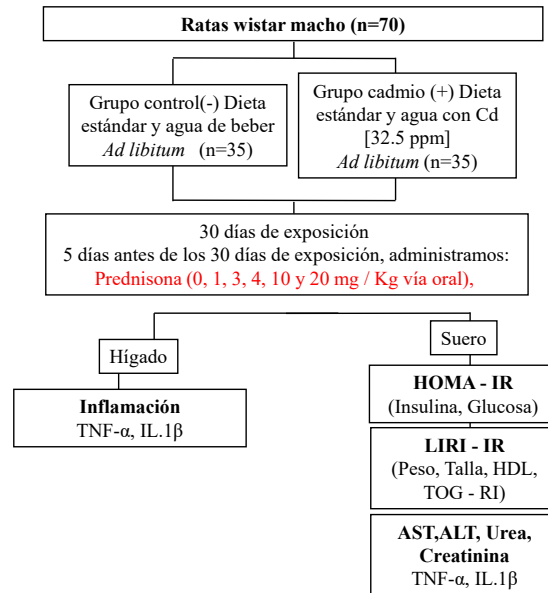
## Diseño experimental 3.

Efecto de la Curcumina sobre la resistencia a insulina y estrés oxidativo.



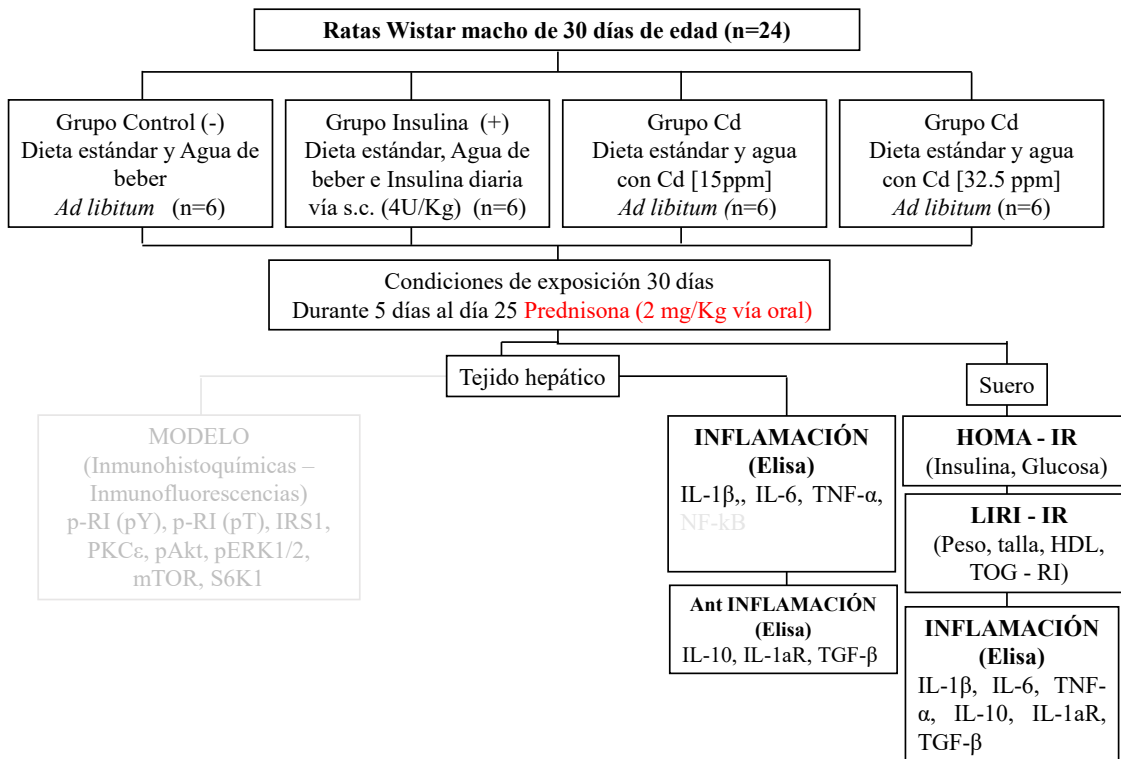
## Diseño experimental 4.

Curva dosis respuesta Prednisona-Resistencia a insulina e inflamación.



## Diseño experimental 5.

Efecto de la Prednisona sobre la resistencia a insulina e inflamación.



# Metodología

## **Diseño experimental 1.**

### Animales

Se emplearon 48 ratas de la cepa Wistar obtenidas del Bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 48 ratas fueron separadas aleatoriamente en los siguientes grupos; un grupo control (n=12), un grupo expuesto a CdCl<sub>2</sub> en agua de consumo a una concentración de 15 ppm (n=12), un grupo expuesto a CdCl<sub>2</sub> en agua de consumo con una concentración de 32.5 ppm de Cd (n=12) y por último un cuarto grupo "insulina" (n=12), al cual se les aplico diariamente 4U/kg de peso por vía subcutánea de insulina de la marca "Glargina" que es un análogo de una insulina humana de larga duración. Estas condiciones fueron continuas durante 30 días después del periodo de acondicionamiento.

### **Obtención de las muestras**

#### Curva de tolerancia oral a la glucosa

Un total de 12 animales de cada subgrupo fueron sacrificados a los 30 días después de los diferentes grupos de exposición. Un día antes de terminar la exposición, bajo condiciones de ayuno (4-5h) las ratas recibieron una carga oral de glucosa equivalente a 1,75 g-glucosa/kg de peso. Las ratas se anestesiaron por vía intraperitoneal con ketamina+xilazina (0.2 ml/100g). Bajo anestesia, se extrajo sangre (200 µl) a través de punción cardíaca a los 0, 30, 60 y 90 min, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos, el suero se separó y fue congelado a -70°C hasta su análisis. Los animales se dejaron recuperar por dos días.

#### Obtención de muestras

Un día después de haber terminado la exposición, se suspendió el alimento de 4 a 5 horas, posteriormente los animales se anestesiaron con ketamina+xilazina

(0.2 ml/100g) vía intraperitoneal, bajo anestesia se obtuvieron 5 mL de sangre por medio de punción cardíaca y se recolectaron en tubos con pro-coagulante, centrifugando los tubos a 8,000 r.p.m. durante 10 minutos. El suero fue separado y almacenado a -70°C hasta su análisis. Inmediatamente después de la obtención de la muestra sanguínea, se realizó una perfusión cardíaca para lavar los tejidos con solución salina isotónica y se procedió a realizar la biopsia de tejido hepático, el cual fue guardado a -70°C.

### Ensayos séricos

La cuantificación de glucosa fue analizada en un espectrofotómetro automatizado AutoKemII con reactivos de la marca Spinreact, según las indicaciones del productor. La concentración de insulina sérica fue determinada por inmunoensayo de ELISA (Diagnóstica Internacional, Mex), el complejo antígeno anticuerpo se midió a una longitud de onda de 415 nm en un lector automatizado Stat fax 2600 (Winerlab, Arg), la concentración de insulina fue obtenida a partir de una curva estándar con un rango 0 – 20 µU/mL. Tanto glucosa como insulina fueron cuantificadas a los tiempos 0 minutos (ayuno de 6 horas de los animales de experimentación), 30, 60 y 90 min post carga de glucosa anhidra de 1.75 g-glucosa /kg, con la finalidad de conocer la tolerancia oral al carbohidrato y la liberación de insulina.

### Modelos Matemáticos de resistencia a insulina.

#### Resistencia a insulina periférica.

El efecto de la exposición a cadmio en relación a la resistencia a insulina fue valorado por los índices HOMA-IR (Cacho et al., 2008) y fue obtenido por la siguiente formula:

$$HOMA - IR = \frac{\text{glucosa basal } \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}}\right) * \text{insulina basal } \left(\frac{\mu\text{U}}{\text{mL}}\right)}{2430}$$

#### Resistencia a hepática a insulina.

La resistencia a insulina es independiente en cada tejido; por lo que el efecto crónico de la exposición a Cd fue estudiado en el tejido hepático, estudiado por modelos matemáticos específicos. En hígado se analizó la resistencia por el índice de insulino resistencia hepática (LIRI por Vangipurapu et al., 2011) calculado por la siguiente formula:

$$\text{LIRI} = -0.091 + \left[ \left( \log \text{ AUC Insulina } 0 - 90 \text{ min } \left( \frac{\mu\text{U}}{\text{mL}} \right) * 0.4 \right) + [\log \text{ índice de Lee } * 0.346] - \left[ \log \text{ HDLc } \left( \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) * 0.408 \right] + [\log \text{ IMC } * 0.435] \right]$$

## Ensayos tisulares para el balance redox hepático

### Malondialdehído y 4-hidroxi-alquenos

Los niveles de MDA y 4HDA fueron cuantificados por el método de Esterbauer & Zollner, 1989. A 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante se le adicione 650  $\mu\text{L}$  de la solución 1 (compuesta de 1-metil-2-6 fenil-indol a una concentración 10.3 mM en acetonitrilo y metanol) más 150  $\mu\text{L}$  de ácido metanosulfónico. Las muestras se agitaron y se incubaron por una hora a 45° en baño María, después de la incubación se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min y en el sobrenadante se midió la absorbancia con un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda EZ-150) a 586 nm. La concentración de MDA y 4HDA fue determinada interpolando la absorbancia de las muestras en la curva estándar patrón de MDA, 1, 1, 3,3 tetrametoxipropano (0.5 a 5  $\mu\text{M}$ ), la cual fue determinada paralelamente en cada ensayo.

### Nitritos (Método de Griess)

La producción de óxido nítrico fue estimada a través del contenido de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) en los sobrenadantes de hígado utilizando el método de Griess ((Chao et al. 1992)). Las condiciones se dan mediante la adición de dihidrocloruro de n-1-naftiletildiamino y sulfanilamida en ácido acético. La reacción colorimétrica fue llevada a cabo por la adición de reactivo de Griess, el producto de reacción fue leído en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda EZ-150) a 540 nm. La concentración de  $\text{NO}_2^-$  fue determinada interpolando la absorbancia de las muestras en una curva estándar de  $\text{NaNO}_2$ , la cual fue determinada paralelamente en cada ensayo.

## ROS totales

Los niveles de ROS intracelulares fueron medidos por fluorimetría. Los tejidos fueron sensibilizados con dihidroclorofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>-DCF-DA) 30 minutos, durante este periodo las esterasas celulares reaccionan con el compuesto para formar dihidroclorofluoresceína (DCFH), el cual se hace reaccionar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para dar una molécula fluorescente que es usada para medir las concentraciones de ROS intracelular. La reacción se lleva a cabo a 37°C por 30 min, posteriormente es homogenizado el tejido y buferado con HEPES (25 mM), 0.7 g NaCl (120 mM), 40 mg KCl (5.4 mM), 26.5 mg CaCl<sub>2</sub> (1.8 mM), 0.21 g NaHCO<sub>3</sub> (25 mM), 0.27 g Glucosa (15 mM) ajustado a pH 7.4 con NaOH. Posteriormente se llevó a un lector de placas para fluorescencia "Multi-well Plate Reader" y se leyó a 485 nm de excitación y 530 de emisión. La absorbancia fue registrada y se traslapó a la curva estándar construida a partir de DCFH con concentraciones conocidas de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## Metalotioneínas totales

La determinación de la concentración y la estimación de la cantidad total de MTs en los tejidos animales se realizó mediante el método de saturación con <sup>109</sup>Cd, de acuerdo con el protocolo establecido por Eaton & Cherian, 1991.

## GSH y GSSG

El contenido de glutatión total fue determinado mediante la técnica de reciclaje enzimático basada en el uso de la enzima glutatión reductasa. El glutatión es oxidado por el ácido 5,5'-2-nitrobenzoico (DTNB) (Rahman, Kode, and Biswas 2006) y reducido por NADPH en presencia de glutatión reductasa. La formación del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico es monitoreada a 412 nm y la concentración de glutatión presente se determina por la comparación del resultado con la curva estándar. El procedimiento es específico para GSSG cuando se usa 2-vinilpiridina o 4-vinilpiridina para enmascarar GSH, que no inhiben a glutatión reductasa (Griffith, 1980). Para el cálculo de la concentración de GSH, se realizó la siguiente operación:

GSH = glutatión total – GSSG. Para el cálculo del índice redox se utilizó la siguiente operación Índice Redox =  $2\text{GSH}/\text{GSSG}$ .

#### Actividad de Glutatión Peroxidasa

La actividad de Glutatión Peroxidasa (GPx) fue cuantificada de acuerdo a lo descrito por Flohé & Günzler, 1984. La GPx presente en el sobrenadante reduce los hidroperóxidos al sustrato de tert-butil peróxido de hidrógeno y la enzima se oxida. La GPx oxidada es regenerada por el GSH, el cual se oxida a GSSG. El GSSG regresa a GSH por la donación de un electrón proveniente del NADPH vía glutatión reductasa (GR). La tasa de decremento de NADPH es directamente proporcional a la actividad de GPx y ésta se determina espectrofotométricamente a 340 nm (Perkin Elmer Lambda EZ-150).

#### Actividad de Glutatión Transferasa

La actividad de Glutatión S-Transferasa (GST) fue determinada usando el método descrito por Habig et al. La reacción consiste en mezclar buffer Hepes pH 7.5, GSH, 1-cloro-2-dinitrobenzenu (CDNB) y agua. La conjugación de GSH con CDNB en presencia de la GST es una medida de su actividad, la cual se puede seguir espectrofotométricamente a 340 nm durante 3 min.

#### Actividad de Glutatión Reductasa

La actividad de Glutatión Reductasa (GSSG-R) fue determinada monitoreando la oxidación de NADPH en presencia de GSSG de acuerdo al método de Smith, Vierheller, & Thorne, 1988. El GSH formado reacciona con 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) mostrando un incremento en la absorbancia la cual se midió a 412 nm.

#### Actividad de Superóxido Dismutasa

La actividad de superóxido dismutasa (SOD) fue analizada mediante el método del pirogalol; en el que el pirogalol en medio básico se auto-oxida generado en el medio de reacción radicales superóxido, de esta forma la reacción radicalaria se propaga, acelerando la auto-oxidación absorbiendo el paso de luz a 420 nm. La

presencia de SOD inhibe la autoxidación al evitar las reacciones de propagación. Por convenio se toma 1 U de SOD como la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la reacción de auto-oxidación del Pirogalol a 25°C y pH 8.2.

#### Cuantificación de la Actividad de Catalasa

La cuantificación de la actividad de catalasa (CAT), se realizó mediante el uso de luz ultravioleta, según lo establecido por (Nelson and Kiesow 1972). La reacción se lleva a cabo en 2.0 mL de buffer compuesto por fosfato de potasio (50 mM a pH 7.0), 0.05 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3) M y 0.05 mL del homogenado. Los cambios en la absorbancia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se siguieron por 60 segundos a 240 nm. La actividad de catalasa se calcula como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína que es igual a U/mg de proteína.

#### **Ensayos tisulares para evaluar la inflamación y la vía de señalización hepática de insulina.**

##### Inmunofluorescencia

El hígado post-perfusión se retiró y se fijó en una solución regulada de paraformaldehído al 4%, posteriormente y se incluyó en parafina, cortes de 5 $\mu\text{m}$  del tejido fueron realizados en microtomo (Leica, U.S.A) y colocados en laminillas previamente xilanizadas, se desparafinaron y se rehidrataron mediante métodos estándar. Se procedió a la recuperación antigénica, la cual se realizó con una solución Diva Decloaker de BioCare dilución 1:10 a 60°C por 30 min y se dejó enfriar. Los sitios de unión no específicos se bloquearon mediante incubación en albúmina de suero bovino libre de IgG al 2% a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se incubaron con 0,2% de Triton X-100. Las secciones se incubaron durante la noche a 4–8 °C con anticuerpo primario y se identificaron utilizando anticuerpos secundarios marcados con FITC. Las laminillas se contrastaron con VectaShield con DAPI, para la tinción de núcleos (canal azul). Este protocolo se aplicó NF- $\kappa$ B, p-RI (pY), p-RI (pT), IRS1, PKC $\epsilon$ , pAkt, pERK1/2, mTOR, S6K1. Las fotografías obtenidas fueron analizadas por el programa ImageJ.

##### Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NF-kB, IL-1ra, TGF $\beta$ , IL-10, p38 y JNK se cuantificaron por el método de ELISA en homogenados de hígado y en suero como se describe en Leon Chavez et al., 2001. El contenido de proteína se determinó por el método por el Lowry. Alícuotas de 5  $\mu$ g de proteína se colocaron en pocillos de placas de ELISA. Un volumen de 100  $\mu$ L de buffer de carbonato 0.1 M se añade a cada pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante 18 h. Para bloquear los sitios de unión no específicos, 200  $\mu$ L de albúmina de suero bovino al 0.5% fueron añadidos a cada pocillo a temperatura ambiente. Después de 30 min de incubación, los pocillos se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 (0.1%). Anticuerpos IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NF-kB, IL-1ra, TGF $\beta$ , IL-10, p38 y JNK se añaden en cada pocillo y se incubaron durante 2h a TA. Después de tres lavados con PBS, un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano se añade a los pocillos y se incuban durante 2 h a temperatura ambiente. El complejo anticuerpo-antígeno se reveló mediante la adición de 100  $\mu$ L 3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) en cada pocillo, Después de 15 min se finalizó la reacción al agregarle ácido sulfúrico 2M, la densidad óptica (OD) fue medida mediante un lector de multiplaca a 415 nm. Todas las muestras se realizaron en las mismas condiciones experimentales y tiempo.

## **Diseño experimental 2.**

Se emplearon 70 ratas de la cepa Wistar obtenidos del Bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las ratas fueron separadas aleatoriamente en los siguientes grupos; un grupo control (n=35), un grupo expuesto a CdCl<sub>2</sub> en agua de consumo a una concentración de 32 ppm (n=35) durante 30 días y grupos expuestos a CdCl<sub>2</sub> en agua de consumo con una concentración de 32.5 ppm de Cd (n=25) durante 25 días, posteriormente a esto se les administro diferentes dosis de curcumina por vía oral, 0 mg/kg (n=5), 50 mg/kg (n=5), 125 mg/kg (n=5), 250 mg/kg (n=5), 500 mg/kg (n=5) y 750 mg/kg (n=5), dosis que se aplicaron diariamente durante 5 días.

La obtención de muestras se realizó como se detalla anteriormente. La cuantificación de AST, ALT, creatinina, urea, fueron analizadas en un

espectrofotómetro automatizado AutoKemII con reactivos de la marca Spinreact de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los índices de resistencia a insulina HOMA-IR y LIRI, así como la concentración de ROS y cadmios se realizo como se detalla anteriormente.

### **Diseño experimental 3.**

Se emplearon 24 ratas de la cepa Wistar obtenidas del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las ratas fueron separadas aleatoriamente en los siguientes grupos; un grupo control (n=12), un grupo expuesto a CdCl<sub>2</sub> en agua de consumo a una concentración de 15 ppm (n=12), un grupo expuesto a CdCl<sub>2</sub> en agua de consumo con una concentración de 32.5 ppm de Cd (n=12) y por último un cuarto grupo “insulina” (n=12), al cual se les aplico diariamente 4U/kg de peso por vía subcutánea de insulina de la marca “Glargina” que es un análogo de una insulina humana de larga duración. Estas condiciones fueron continuas durante 30 días después del periodo de acondicionamiento. Cinco días antes de terminar la exposición de los grupos experimentales (25 días) se les administro prednisona a una dosis de 250 mg/kg/día de peso del animal por vía oral diariamente hasta concluir los periodos mencionados anteriormente.

La curva de tolerancia oral a la glucosa, el área bajo la curva, los índices de resistencia a insulina (HOMA-IR y LIRI), los ensayos de estrés oxidativo, la determinación de la defesa antioxidante, las inmunofluorescencia así como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), se realizaron de la misma forma en que se describió anteriormente.

### **Diseño experimental 4.**

Se emplearon 70 ratas de la cepa Wistar obtenidos del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las ratas fueron separadas aleatoriamente en los siguientes grupos; un grupo control (n=35), un grupo expuesto a CdCl<sub>2</sub> en agua de consumo a una concentración de 32 ppm (n=35)

durante 30 días y grupos expuestos a  $\text{CdCl}_2$  en agua de consumo con una concentración de 32.5 ppm de Cd (n=25) durante 25 días, posteriormente a esto se les administro diferentes dosis de prednisona por vía oral, 0 mg/kg (n=5), 1 mg/kg (n=5), 3 mg/kg (n=5), 5 mg/kg (n=5), 10 mg/kg (n=5) y 750 mg/kg (n=5), dosis que se aplicaron diariamente durante 5 días.

La obtención de muestras se realizó como se detalla anteriormente. La cuantificación de AST, ALT, creatinina, urea, fueron analizadas en un espectrofotómetro automatizado AutoKemII con reactivos de la marca Spinreact de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los índices de resistencia a insulina HOMA-IR y LIRI, así como la concentración IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  se realizó como se detalla anteriormente.

### **Diseño experimental 5.**

Se emplearon 24 ratas de la cepa Wistar obtenidas del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las ratas fueron separadas aleatoriamente en los siguientes grupos; un grupo control (n=12), un grupo expuesto a  $\text{CdCl}_2$  en agua de consumo a una concentración de 15 ppm (n=12), un grupo expuesto a  $\text{CdCl}_2$  en agua de consumo con una concentración de 32.5 ppm de Cd (n=12) y por último un cuarto grupo “insulina” (n=12), al cual se les aplico diariamente 4U/kg de peso por vía subcutánea de insulina de la marca “Glargina” que es un análogo de una insulina humana de larga duración. Estas condiciones fueron continuas durante 30 días después del periodo de acondicionamiento. Cinco días antes de terminar la exposición de los grupos experimentales (25 días) se les administro prednisona a una dosis de 25mg/kg/día de peso del animal por vía oral diariamente hasta concluir los periodos mencionados anteriormente.

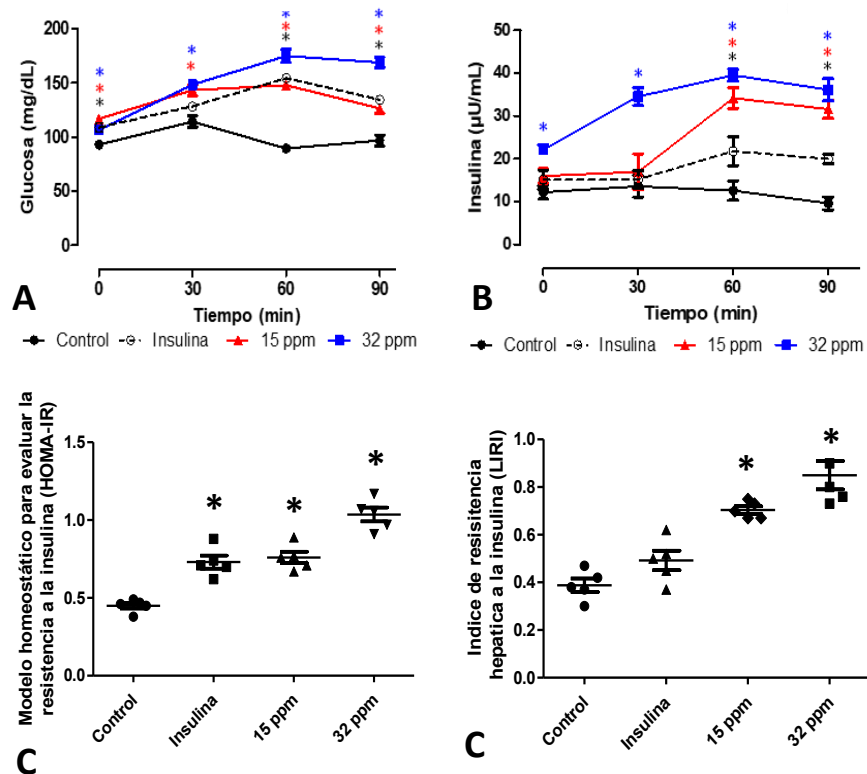
La curva de tolerancia oral a la glucosa, los índices de resistencia a insulina (HOMA-IR y LIRI) y los ensayos de ELISA, se realizaron de la misma forma en que se describió anteriormente.

## Análisis Estadístico

Los resultados cuantitativos obtenidos son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico fue realizado con ayuda del programa GraphPad Prims versión 5.0.0, con el cual se realizó una comparación entre grupos control y problema por medio de ANOVA de 1 Vía, con análisis Post Hoc de Bonferroni. Un nivel de significancia del 0.05 ( $P \leq 0.05$ ) fue considerado significativamente diferente.

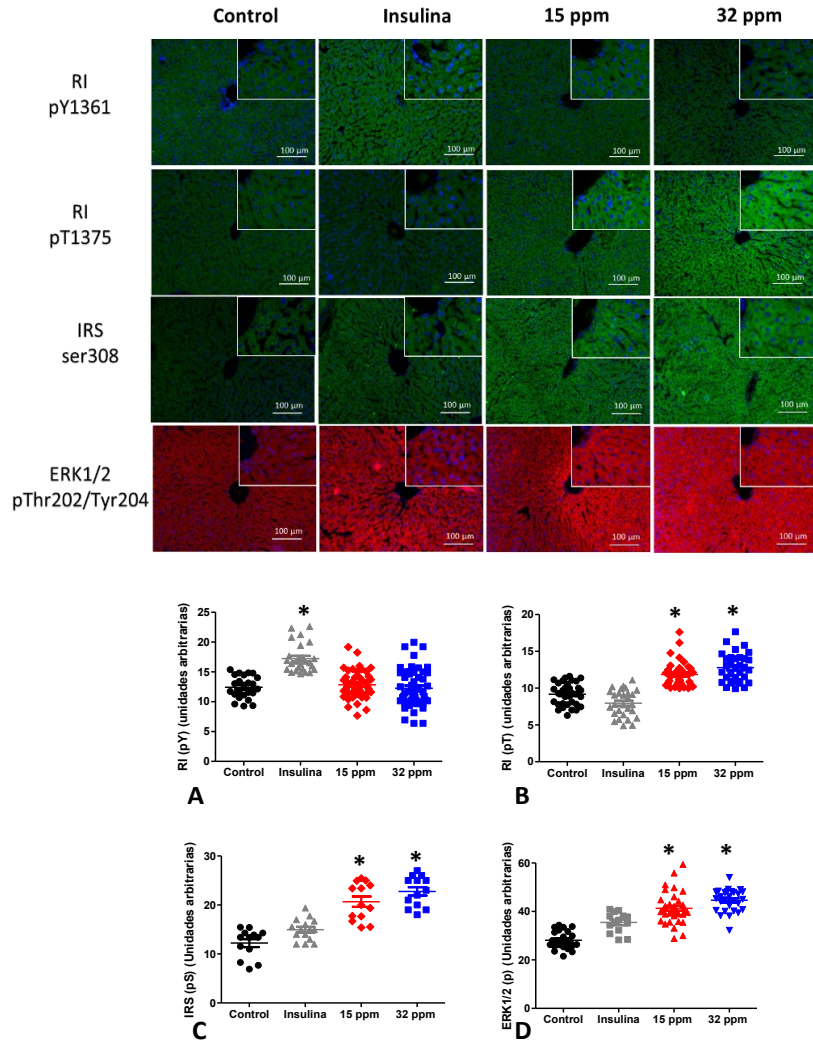
## Resultados

Efecto de la exposición de cadmio sobre el estrés oxidativo, inflamación y resistencia a insulina.



**Figura 8.- Tolerancia a la glucosa y Resistencia a la Insulina después de 30 días de exposición.** A) Tolerancia oral a la glucosa. B) Respuesta de insulina a glucosa. C) HOMA-IR D) LIRI. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos  $\pm$  EEM. A) y B) (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni. C) y D) (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por análisis de Kruskal-Wallis.

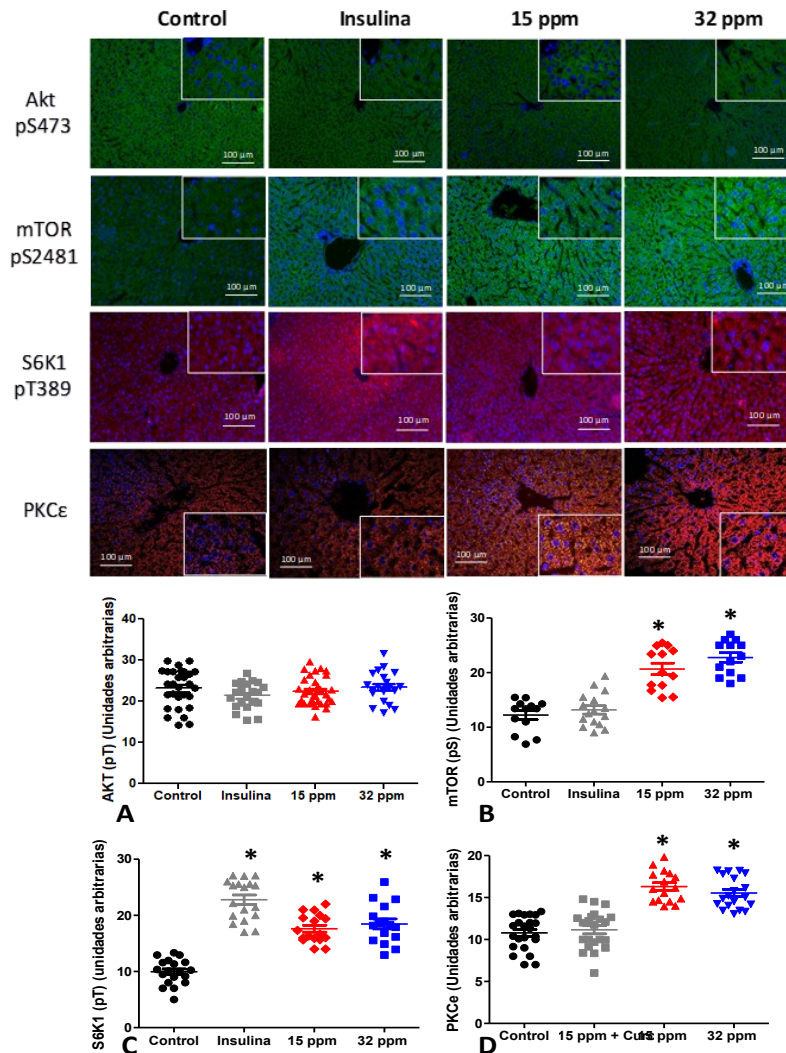
Después de 30 días de exposición nuestros grupos experimentales mostraron incrementos estadísticamente significativos en la concentración basal de glucosa (**Figura 8A**) que correspondieron a 17%, 26% y 15% respectivamente, para observar la utilización de la glucosa por el organismo se sometieron a una curva de tolerancia oral a la glucosa; al minuto 30 de la post carga los animales expuestos a Cd exhibieron incrementos para los grupos con 15ppm (25%) y 32 ppm (30%). El monitoreo a los 60 y 90 minutos, se observaron incrementos en los grupos: insulina



**Figura 9.- Comportamiento de proteínas de la vía de señalización de insulina después de la exposición a Cd.** Se muestran cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) de la inmunorreacción del RI(y), RI(t), IRS y ERK1/2. **A)** Análisis densitométrico de las fotomicrografías del receptor de insulina fosforilado en tirosina 1361 (RI-pY1361). **B)** Análisis densitométrico de las fotomicrografías receptor de insulina fosforilado en treonina 1375 (RI-pT1375). **C)** Análisis densitométrico de las fotomicrografías del sustrato del receptor de insulina (IRS) **D)** Análisis densitométrico de las fotomicrografías de la cinasa activada por mitógenos extracelulares (ERK1/2). Las gráficas muestran el promedio de 25 campos diferentes  $\pm$  EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de Kruskal-Wallis.

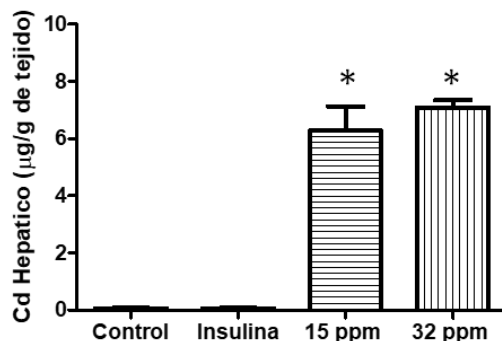
(72% y 38%), 15 ppm (65% y 30%) y 32 ppm (95% y 74%), comparado contra el grupo control. Por su parte, la curva de respuesta de insulina (**Figura 8B**), mostró un incremento significativo (82%) en ayuno (punto basal) y al minuto 30, solo el grupo 32 ppm mantuvo dicho incremento en la respuesta insulínica (55%); al minuto 60, el incremento observado fue significativo en los grupos experimentales de insulina (73%), 15 ppm (172%) y 32 ppm (214%); por ultimo al minuto 90 del monitoreo, los grupos insulina, 15ppm y 32 ppm se mantuvieron incrementados en

108%, 230% y 276%, respectivamente. Mientras que el indicador de resistencia HOMA-IR (**Figura 8C**), mostró incrementos significativos del 62% (insulina), 69% (15ppm) y 122% (32 ppm) respecto del grupo control; por su parte el índice de resistencia hepática a insulina (LIRI; **Figura 8D**), incrementó significativamente sólo en los grupos administrados con Cd 15 ppm (160%) y 32 ppm (157%) respecto al grupo control.



**Figura 10.- Comportamiento de proteínas de la vía de señalización de insulina después de la exposición a Cd.** Se muestran cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) de la inmunorreacción de AKT, mTOR, S6K1 y PKC $\epsilon$ . **A)** Análisis densitométrico de las fotomicrografías Proteína cina B fosforilada en serina 473 (AKTpS473). **B)** Análisis densitométrico de las fotomicrografías de La diana de rapamicina en células de mamífero (mTORpS2481). **C)** Análisis densitométrico de las fotomicrografías de La proteína ribosomal S6 quinasa beta-1 (S6K1). **D)** Análisis densitométrico de las fotomicrografías de laProteína cinasa C epsilon (PKC $\epsilon$ ). Las gráficas muestran el promedio de 25 campos diferentes  $\pm$  EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de Kruskal-Wallis.

Una vez que fue puesta en evidencia la resistencia a insulina con marcadores séricos y matemáticos, el siguiente paso fue evaluar su efecto en la vía de señalización de insulina en tejido hepático, tomando como antecedente la hiperinsulinemia persistente en los diferentes grupos experimentales. Por medio de inmunofluorescencia se analizó la inmunoreactividad del receptor de insulina fosforilado en tirosina por análisis densitométrico (**Figura 9**). Se observó únicamente el incremento en el grupo insulina (35%), mientras los grupos expuestos a Cd no mostraron diferencia con respecto del control. El siguiente paso después de la fosforilación en residuos tirosina es la fosforilación de residuos treonina del receptor de insulina, cuya expresión fue evaluada, donde los grupos expuestos a 15 ppm y 32 ppm incrementaron significativamente en 21% y 30% respectivamente. Siguiendo la cascada de fosforilación del receptor a insulina una proteína clave en la señalización fisiológica de insulina es IRS, sin embargo, en resistencia a insulina su fosforilación en residuos de serina inhibe la vía de señalización, por lo que se analizó su inmunoreactividad, mostrando incrementos de 47 y 74% para el grupo 15 ppm y 32 ppm respectivamente. Otra proteína clave en la vía de señalización de insulina independiente de la vía metabólica es ERK1/2, una MAP cinasa importante en la conducta de crecimiento y proliferación en los hepatocitos. Su evaluación demostró incrementos en su inmunoreactividad en el grupo insulina (26%), 15 ppm (40%) y 32 ppm (51%), con respecto a su control.



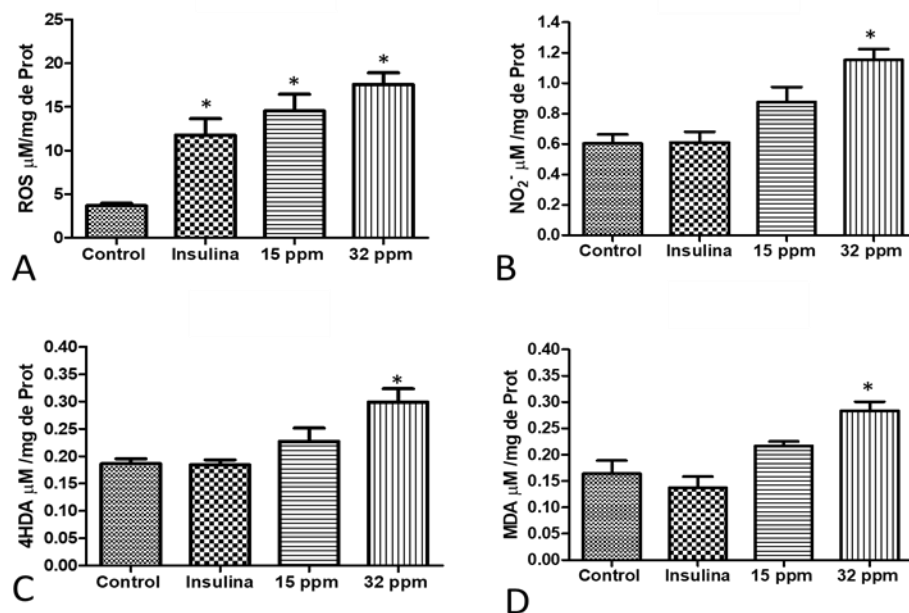
**Figura 11.-Concentración de Cadmio en hígado después de 30 días de exposición.** La concentración de Cadmio se cuantificó por ICP-MS (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente), de secciones de Hígado, después de una digestión ácida. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos  $\pm$  EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

**Tabla 1. Defensa Antioxidante después de 30 días de exposición.**

	Control	Insulina	15 ppm	32 ppm
N	10	10	10	10
Glutación Total ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de Prot)	18.9 $\pm$ 2.5	15.0 $\pm$ 1.4	23.5 $\pm$ 1.5	34.3 $\pm$ 3.3*
GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de Prot)	12.6 $\pm$ 1.8	2.7 $\pm$ 1.5*	15.0 $\pm$ 1.8	20.1 $\pm$ 2.2*
GSSG ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de Prot)	6.3 $\pm$ 0.6	12.7 $\pm$ 1.5*	8.5 $\pm$ 1.1	14.2 $\pm$ 1.4*
2GSH/GSSG	4.0 $\pm$ 0.5*	0.4 $\pm$ 0.02*	2.9 $\pm$ 0.6	2.6 $\pm$ 0.1*
GPx nmol min <sup>-1</sup> /mg de Prot	2.3 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.4
GR mU min <sup>-1</sup> /mg de Prot	1147.7 $\pm$ 170	1759.6 $\pm$ 218	1837.3 $\pm$ 220	2386.5 $\pm$ 260*
GT U min <sup>-1</sup> /mg de Prot	658.2 $\pm$ 92	958.7 $\pm$ 126	881.8 $\pm$ 106	733.3 $\pm$ 128
SOD U min <sup>-1</sup> /mg de Prot	7.6 $\pm$ 0.9	7.2 $\pm$ 0.5	8.9 $\pm$ 0.9	10.9 $\pm$ 0.5
CAT U min <sup>-1</sup> /mg de Prot	19.5 $\pm$ 1.8	18.4 $\pm$ 2.4	15.2 $\pm$ 2.4	24.8 $\pm$ 2.1
MT $\mu\text{g}$ /g de tejido	1.3 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.5	5 $\pm$ 0.3*	5.2 $\pm$ 0.4*

Los resultados mostrados son el promedio de diez animales de experimentación separados  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferencias significativas del grupo de control.  $P \leq 0.05$  mediante la prueba ANOVA con la prueba post hoc de Bonferroni. GSH, Glutación reducido; GSSG, Glutación oxidado; GSH/GSSG, ratio oxidativo; GPx, Glutación Peroxidasa; GR, Glutación Reductasa; GT, Glutación Transferasa; SOD, Superóxido Dismutasa; CAT, Catalasa; MT, Metalotioneína.

Siguiendo la cascada de fosforilación del receptor a insulina, una de las proteínas más importantes en la vía de señalización es Akt. Sin embargo, al evaluar el análisis densitométrico de la fosforilación de Akt en su residuo de serina (**Figura 10**) no mostró cambios significativos en ningún grupo experimental. Por su parte mTOR, la cual mostro incremento del 68 y 84% para el grupo 15 ppm y 32 ppm respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos al evaluar la inmunoreactividad de una proteína rio abajo de mTOR; la proteína S6K, la cual se muestra incremento para los grupos insulina (92%), 15 ppm (45%) y 32 ppm (50%). Por último, aunque PKC $\epsilon$  no está involucrada directamente en la vía de señalización de insulina, se sabe que su incremento es importante para la inhibición de función del receptor de insulina. Interesantemente encontramos incremento de esta proteína solo en los grupos expuestos a cadmio de 36 y 40% para el grupo 15 ppm y 32 ppm respectivamente.

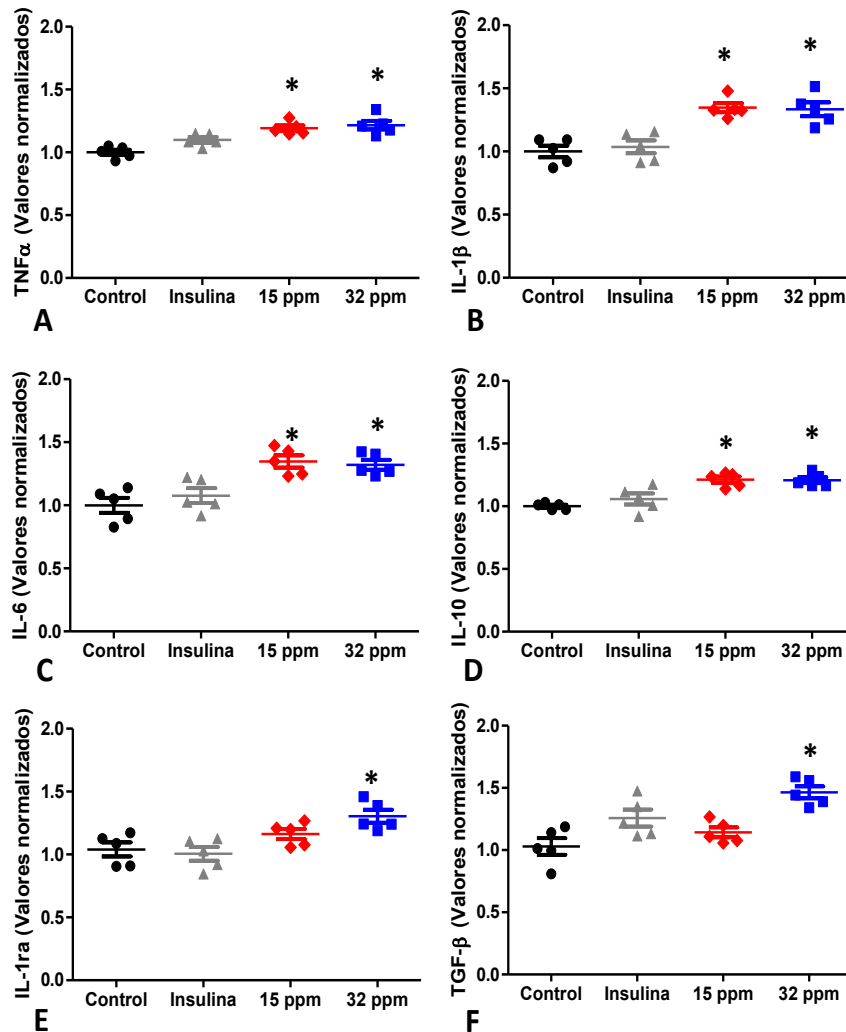


**Figura 12. Estrés Oxidante después de 30 días de exposición.** A) ROS. B) NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. C) 4-HDA D) MDA. Los resultados mostrados son el promedio de diez animales de experimentación separados  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferencias significativas del grupo de control.  $P \leq 0.05$  mediante la prueba ANOVA con la prueba post hoc de Bonferroni.

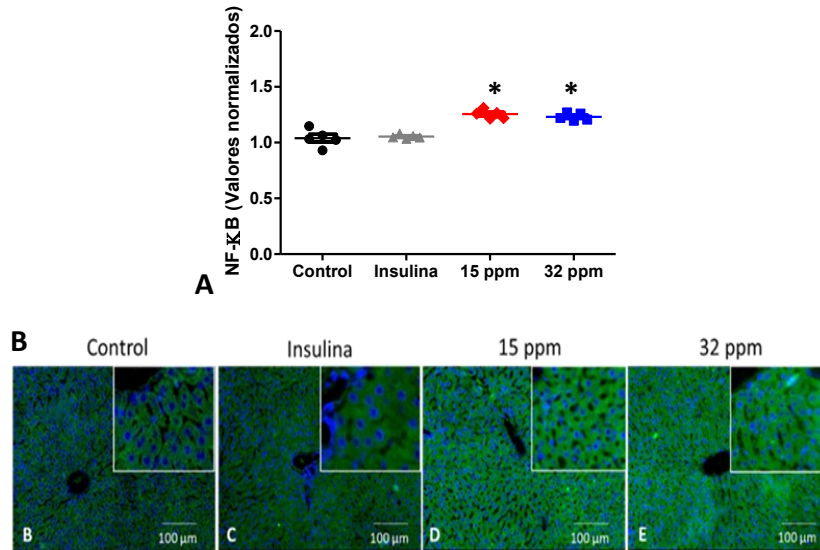
Antes de mostrar su efecto sobre el estrés oxidativo y la inflamación de nuestros grupos experimentales, quisimos evidenciar la concentración de cadmio que se almacena en hígado (**Figura 11**), por medio de espectrometría de masas observamos que se incrementa la concentración del metal en 12 000 y 14 000% para el grupo 15 ppm y 32 ppm respectivamente comparado contra el grupo control.

Para mostrar el papel del estrés oxidativo, evaluamos de primera instancia el efecto sobre la defensa antioxidante (**Tabla 1**), como se puede observar el grupo insulina mostro incremento del 101% en la concentración de GSSG y decremento en 78 y 90% para GSH y 2GSH/GSSG respectivamente. El grupo 15 ppm solo evidencio incremento del 284% en la concentración de MT. Por su parte el grupo 32 ppm mostro incremento en las concentraciones de Glutati6n total (81%), GSH (60%), GSSG (125%), GR (107%), SOD (43%), MT (300%) y reducci6n de 2GSH/GSSG (35%) respecto al grupo control, evidenciando un ambiente prooxidante por agotamiento de la defensa antioxidante para el grupo insulina, pero sobre todo para el grupo 32 ppm. Por otro lado, evaluando el estr6s oxidante,

observamos un incremento de 243%, 328% y 414% para el grupo insulina, 15 ppm y 32 ppm en la concentración de ROS, pero solo un incremento del 92, 53 y 75% en el grupo 32 ppm en la concentración de nitritos, 4HDA y MDA respectivamente (**Figura 12**).

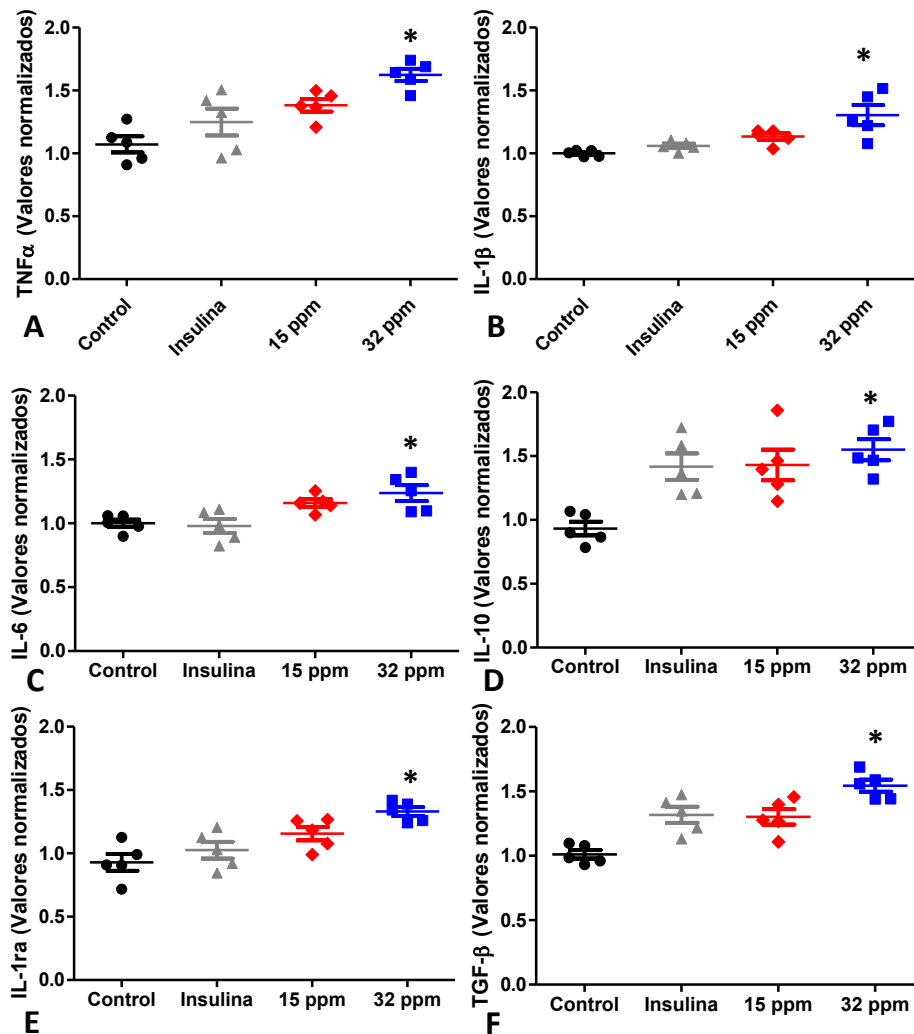


**Figura 13. Estatus sérico inflamatorio después de 30 días de exposición. A)** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . (TNF- $\alpha$ ). **B)** Interleucina 6 (IL-6). **C)** Interleucina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). **D)** Interleucina 10 (IL-10). **E)** Antagonista del Receptor de Interleucina 1 (IL-1ra). **F)** Factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF- $\beta$ ). Los resultados mostrados son el promedio de cinco animales de experimentación separados  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por prueba de Kruskal-Wallis.



**Figura 14. NF-κB a 30 días de los grupos experimentales.** A) Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activada (NF-κB) Cuantificación por el método de Elisa de homogenado de tejido hepático. B - E) Inmunofluorescencias contra NF-κB en cortes de tejido hepático a 5 μm. Los resultados mostrados son el promedio de cinco animales de experimentación separados ± SEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Kruskal-Wallis.

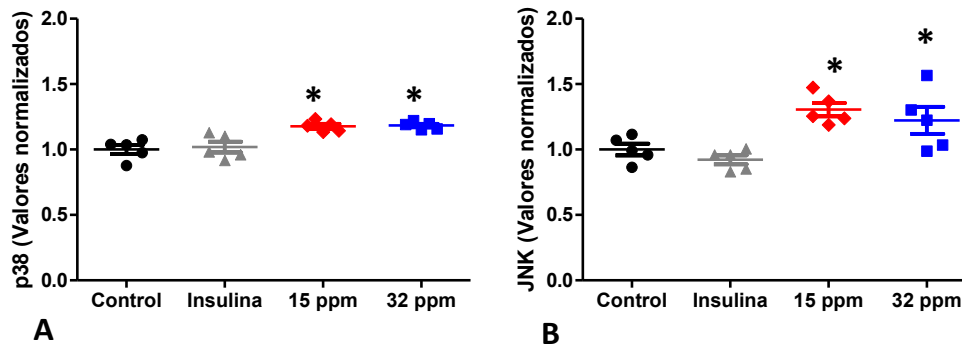
Para mostrar el efecto de la exposición de cadmio sobre la inflamación evaluamos el estatus sérico inflamatorio con la cuantificación de las principales citocinas pro y antiinflamatorias (**Figura 13**). Las citocinas proinflamatorias mostraron incremento solo en los grupos expuestos a cadmio, para el grupo 15 ppm; TNF-α (19%), IL-1β (32%) y IL-6 (34%), mientras que para el grupo 32 ppm TNF-α (21%), IL-1β (33%) y IL-6 (32%). Por su parte, las citocinas antiinflamatorias mostraron un efecto similar para solo para los grupos expuestos a cadmio, donde la IL-10 y el IL-1ar se incrementó en 30% respectivamente en el grupo 32 ppm, y las citocinas IL-10, IL-1ar y TGFβ se incrementaron en 20, 42 y 46% respectivamente en el grupo 32 ppm. Además de mostrar el status inflamatorio sérico era importante para nosotros evaluar cómo se encontraba este ambiente a nivel tisular, por lo que en primera instancia evaluamos NF-κB; el principal factor de transcripción involucrado en la inflamación, por medio de inmunofluorescencia evidenciamos un incremento en su inmunoreactividad del 33 y del 26% solo en los grupos 15ppm y 32 ppm respectivamente, sin embargo este incremento solo fue a nivel citoplasmático como se puede observar en la **Figura 14**, ya que no se encontró una colocalización a nivel nuclear.



**Figura 15. Estatus tisular inflamatorio después de 30 días de exposición. A)** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . (TNF- $\alpha$ ). **B)** Interleucina 6 (IL-6). **C)** Interleucina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). **D)** Interleucina 10 (IL-10). **E)** Antagonista del Receptor de Interleucina 1 (IL-1ra). **F)** Factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF- $\beta$ ). Los resultados mostrados son el promedio de cinco animales de experimentación separados  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por prueba de Kruskal-Wallis.

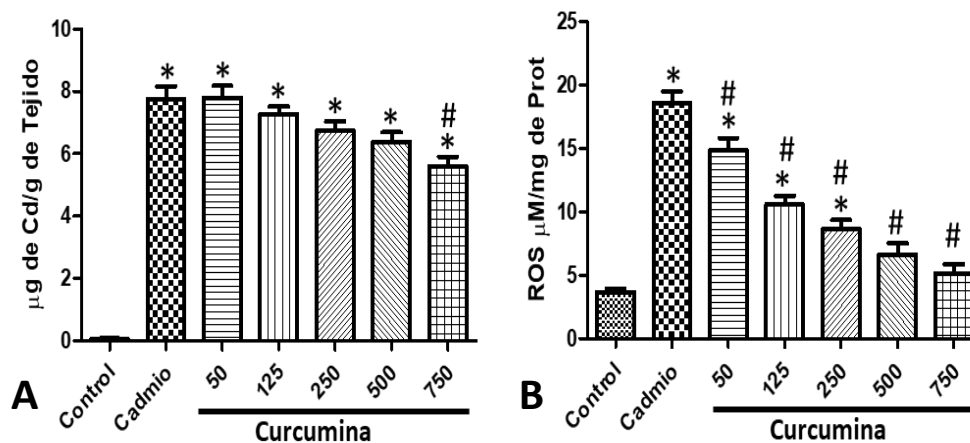
En la parte del estatus inflamatorio a nivel tisular (**Figura 15**) se pudo evidenciar que el grupo 32 ppm es el que presentó el mayor cambio significativo, mostrando incremento en TNF- $\alpha$  (62%), IL-1 $\beta$  (30%), IL-6 (23%), IL-10 (52%) e IL-1ra (28%), mientras que el TGF $\beta$  mostró incremento de 31, 30 y 54% para el grupo insulina, 15 ppm y 32 ppm respectivamente. Por último, para relacionar las vías de señalización activadas por estrés oxidativo e inflamación con la vía de insulina

evaluamos a p38 y JNK como las principales MAPK (**Figura16**). La concentración de p38 se incrementó en 17 y 18% en el grupo 15ppm y 32 ppm respectivamente, mientras que JNK se incrementó 30% (15 ppm) y 24% (32 ppm).

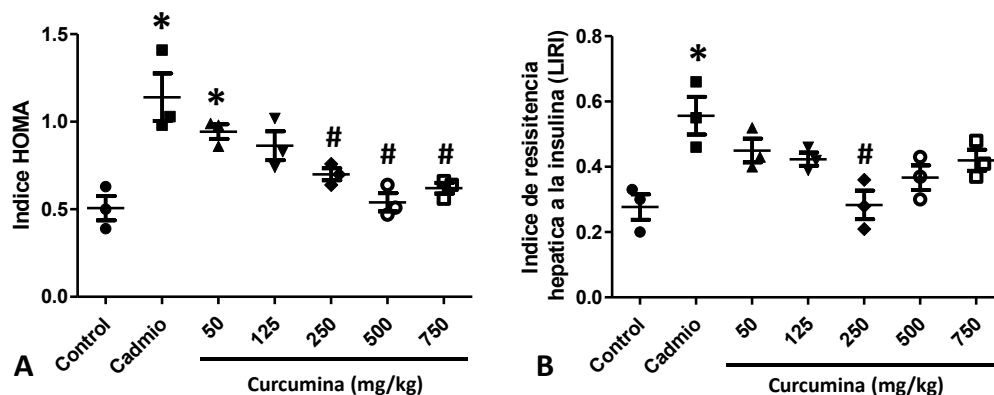


**Figura 16. Cinasas p38 y JNK a los 30 días de exposición con cadmio. (A) Proteína cinasa activada por mitógeno p38 (p38). (B) Cinasa c-Jun N-terminal (JNK).** Los resultados mostrados son el promedio de cinco animales de experimentación separados  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferencias significativas del grupo de control.  $P \leq 0.05$  mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

Curva dosis respuesta Curcumina-Resistencia a insulina y estrés oxidativo.

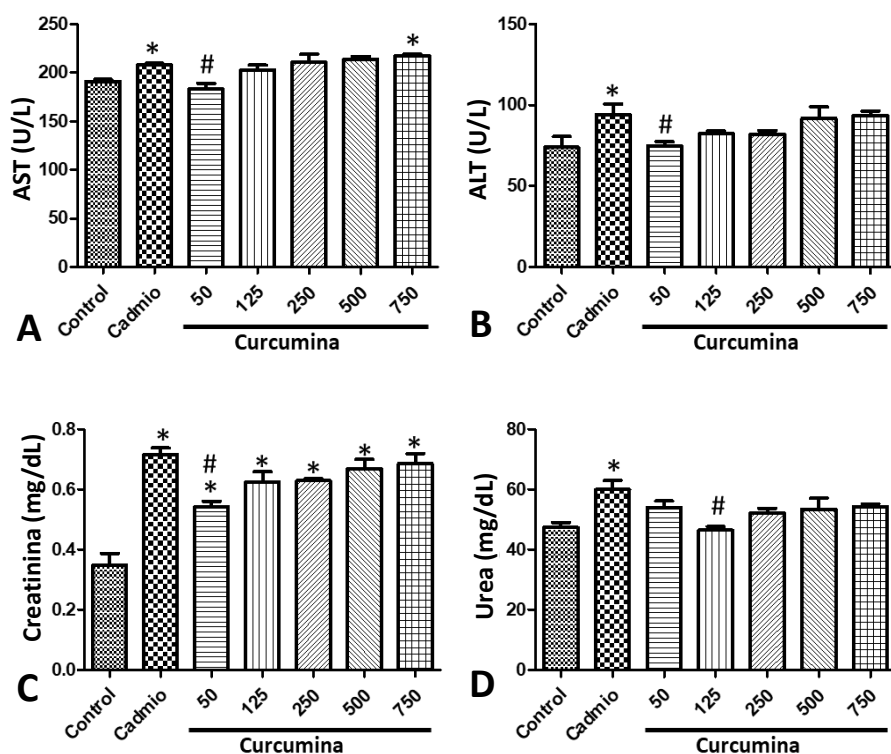


**Figura 17. Efecto de diferentes dosis de curcumina sobre la concentración de cadmio hepático y ROS después de 30 días de exposición a cadmio. A) Concentración hepática de cadmio. B) ROS (Especies reactivas de oxígeno).** Los resultados son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. ANOVA de 1 Vía, con análisis Post Hoc de Bonferroni. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control y (#) respecto al grupo cadmio a una  $p \leq 0.05$ .



**Figura 18.** Efecto de diferentes dosis de curcumina sobre índices de resistencia a insulina después de 30 días de exposición a cadmio. A) HOMA-IR (modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina). B) LIRI (Índice hepático de resistencia a insulina). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control y (#) respecto al grupo cadmio a una  $p \leq 0.05$  por análisis Kruskal-Wallis.

Para determinar el papel del estrés oxidativo sobre el desarrollo de RI después de la exposición a Cd, decidimos utilizar como herramienta metodológica a la curcumina como antioxidante. Para conocer la dosis efectiva se realizó una curva dosis respuesta del antioxidante evaluando su efecto sobre ROS y la RI. La curcumina es un antioxidante con propiedades quelantes, por lo que en primera instancia evidenciamos diferentes dosis su papel sobre la concentración de Cd hepático (**Figura 17A**). Aunque las dosis crecientes de curcumina mostraron una tendencia a disminuir la concentración del metal, solamente la concentración de 750 mg/kg al día mostró una reducción estadísticamente significativa del 27%, aunque sigue habiendo en promedio  $6 \mu\text{g} / \text{g}$  de tejido.



**Figura 19. Efecto de diferentes dosis de curcumina sobre marcadores de daño hepático y renal.** A) AST (Aspartato aminotransferasa) B) ALT (Alanina transaminasa). C) Creatinina D) Urea Los resultados son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. ANOVA de 1 Vía, con análisis Post Hoc de Bonferroni. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control y (#) respecto al grupo cadmio a una  $p \leq 0.05$

Mientras que, los niveles de ROS hepático (**Figura 17B**) disminuyeron estadísticamente 20%, 43%, 53%, 64% y 72% con las dosis de curcumina 50, 125, 250, 500 y 750 mg/kg al día en los animales previamente expuestos a Cd. Las dosis de 500 y 750 mg/kg al día no muestran diferencias con relación al grupo control.

En cuanto a la RI (**Figura 18**), tras la administración de curcumina disminuye el índice HOMA-IR con las dosis de 250 (38%), 500 (52%) y 750 mg/kg al día (45%) en los animales expuestos a Cd. A partir de la dosis de 125 mg/kg al día ya no presentan diferencias respecto al grupo control. Mientras que el índice LIRI observó una reducción del 50% respecto al grupo Cd y condiciones similares al grupo control con la de 250 mg/kg al día. Los resultados sugieren que un exceso de antioxidante también favorece el desarrollo de RI hepática

Una dosificación no adecuada de antioxidante puede causar daño hepático y renal. Por lo que se evaluó a estos tejidos con los principales marcadores clínicos de daño (**Figura 19**). El daño hepático se valoró por medio de la actividad de las transaminasas AST y ALT. Los resultados mostraron que las dosis desde 50 - 500 mg/kg al día, en ambas enzimas no fueron diferentes al grupo control, y ALT muestra este comportamiento hasta la dosis de 750 mg/kg al día. La dosis de 50 mg/kg al día disminuyó la actividad en ambas enzimas, 11% para AST y 20% para ALT.

Los marcadores de daño renal creatinina y urea mostraron un comportamiento similar a los marcadores hepáticos. La creatinina disminuye estadísticamente (24%) respecto al grupo Cd sólo en la dosis de 50 mg/kg al día. Sin embargo, permanece incrementada (55%) respecto al grupo control. La urea observó el mayor decremento con la dosis de 125 mg/kg al día (22%), llegando a valores similares del grupo control. En conjunto, los resultados demuestran que la administración de curcumina no generó un efecto protector hepato-renal, restringiendo el daño causado por la exposición a Cd. Lo cual nos permite elegir la dosis de 250 mg/kg al día como herramienta para valorar el estrés oxidativo su asociación con el desarrollo de RI.

## Efecto de la Curcumina sobre la resistencia a insulina y estrés oxidativo.

**Tabla 2. Estrés Oxidante después de 30 días de los grupos experimentales más tratamiento con curcumina.**

	30 días							
	Control	C + Curc	Insulina	I + Curc	15 ppm	15 ppm + Curc	32 ppm	32 ppm + Curc
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mM /mg de Prot)	0.6 ± 0.05	0.3 ± 0.03*	0.6 ± 0.07	0.34 ± 0.02*	0.8 ± 0.1	0.33 ± 0.01*	1.1 ± 0.06#	0.33 ± 0.02*
4HDA (mM /mg de Prot)	0.18 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.10 ± 0.01*	0.22 ± 0.02	0.07 ± 0.01*	0.29 ± 0.04#	0.12 ± 0.01*
MDA (mM /mg de Prot)	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.13 ± 0.02*	0.28 ± 0.02#	0.14 ± 0.01*
ROS (mM/mg de Prot)	3.6 ± 0.25	5.5 ± 0.3	11.7 ± 1.8#	8.3 ± 0.5*	14.5 ± 1.9#	5.7 ± 0.4	17.5 ± 1.3#	6.83 ± 0.8*

Los resultados mostrados son el promedio de cinco animales de experimentación separados ± SEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a su grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por "t" de Student. (#) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por "t" de Student. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, Nitritos; 4HDA, 4-Hidroxiacetonales; MDA, Malondialdehído; ROS, Especies reactivas de Oxígeno.

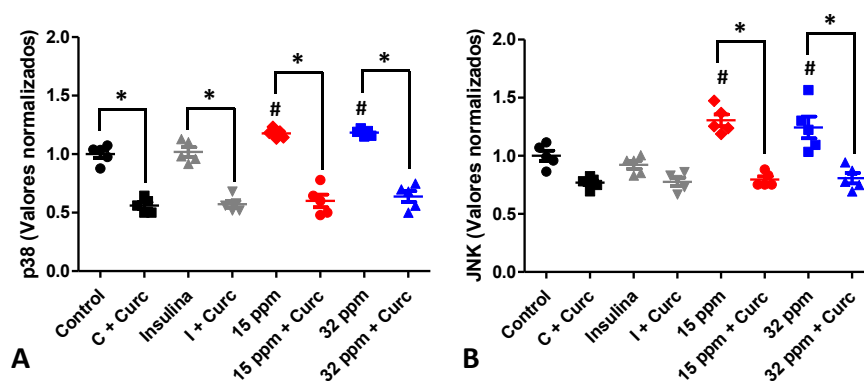
Se evaluó estrés oxidante hepático después de 30 días en los grupos experimentales con y sin tratamiento de curcumina (**Tabla 2**). El tratamiento con curcumina disminuyó la concentración de ROS en los grupos insulina (29%), 15 ppm (60%) y 32 ppm (61%) con respecto a su grupo control sin tratamiento respectivamente. La concentración de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> disminuyó después del tratamiento con curcumina en los grupos control (20%), insulina (43%), Cd-15 ppm (59%) y Cd-32 ppm (70%) respecto a su grupo control sin tratamiento. La concentración de 4HDA se redujo en los grupos insulina (44%), Cd-15 ppm (68%) y Cd-32 ppm (58%) con el tratamiento con curcumina. Finalmente, la concentración de MDA sólo se redujo en un 38% y 50% en los grupos Cd-15 y Cd-32 ppm, respectivamente. Estos resultados evidencian que la curcumina es un antioxidante hepático efectivo contra el estrés oxidante generado por la exposición al xenobiótico.

**Tabla 3. Defensa Antioxidante a 30 días de los grupos experimentales más tratamiento con curcumina.**

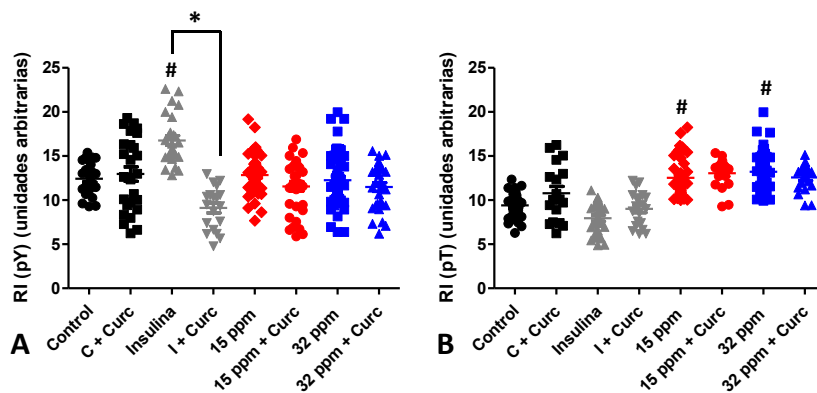
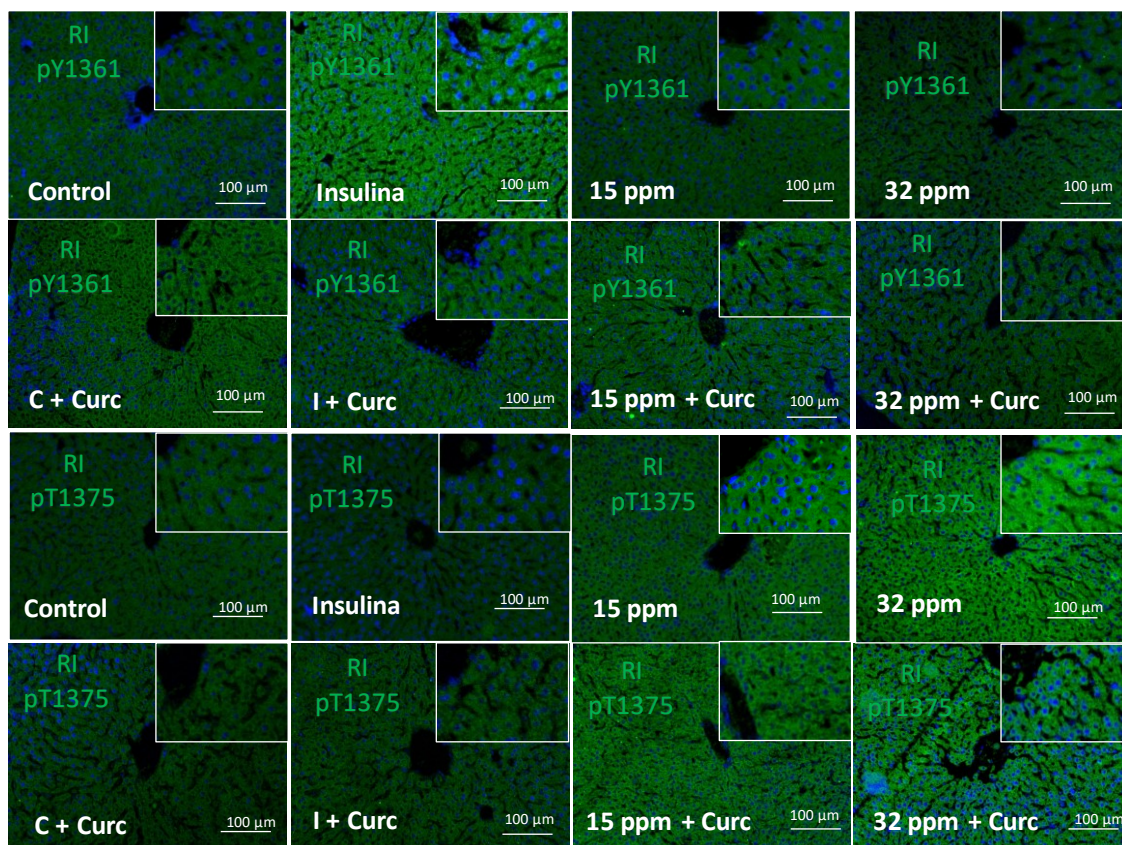
	30 días							
	Control	Control + Curcumina	Insulina	Insulina + Curcumina	15 ppm	15 ppm + Curcumina	32 ppm	32 ppm + Curcumina
Glutación Total (µM/mg de Prot)	18.9 ± 2.5	19.7 ± 0.6	15.0 ± 1.4	18 ± 1.6	23.5 ± 1.5	18.1 ± 3.6*	34.3 ± 3.3#	24.3 ± 2.2*
GSH (µM/mg de Prot)	12.6 ± 1.8	15.2 ± 0.6	2.7 ± 1.5#	14.2 ± 1*	15.0 ± 1.8	13.9 ± 1.2	20.1 ± 2.2#	20.3 ± 1.4
GSSG (µM/mg de Prot)	6.3 ± 0.6	4.4 ± 0.3	12.7 ± 1.5#	5.8 ± 0.5*	8.5 ± 1.1	6.7 ± 0.7+	14.2 ± 1.4#	7 ± 0.8*
2GSH/GSSG	2.13 ± 0.5	3.1 ± 0.5	0.34 ± 0.05#	2.6 ± 0.3	1.6 ± 0.2	2.3 ± 0.6	1.3 ± 0.1#	3.1 ± 0.3*
GPx nmol min <sup>-1</sup> /mg de Prot	2.3 ± 0.1	2.4 ± 0.7	2.9 ± 0.2	2.5 ± 0.4	3.4 ± 0.5	3.6 ± 0.1	3.8 ± 0.4	2.6 ± 0.4*
GR mU min <sup>-1</sup> /mg de Prot	1147.7 ± 170	1395 ± 136	1759.6 ± 218	1845 ± 139	1837.3 ± 220	2092 ± 222	2386.5 ± 260#	2053 ± 117
GT U min <sup>-1</sup> /mg de Prot	658.2 ± 92	1029 ± 107*	958.7 ± 126	956 ± 49	881.8 ± 106	1332 ± 124*	733.3 ± 128	1087 ± 76*
SOD U min <sup>-1</sup> /mg de Prot	7.6 ± 0.9	7.4 ± 0.7	7.2 ± 0.5	7.7 ± 0.7	8.9 ± 0.9	7.9 ± 0.6	10.9 ± 0.5#	10.7 ± 0.5
CAT U min <sup>-1</sup> /mg de Prot	19.5 ± 1.8	10.1 ± 0.9 *	18.4 ± 2.4	9.2 ± 1 *	15.2 ± 2.4	7 ± 0.5 *	24.8 ± 2.1	11.1 ± 1.6*

Los resultados mostrados son el promedio de cinco animales de experimentación separados ± SEM. . (\*) Indica diferencia significativa con respecto a su grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por "t" de Student. (#) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por "t" de Student GSH, Glutación reducido; GSSG, Glutación oxidado; 2GSH/GSSG, índice redox; GPx, Glutación Peroxidasa; GR, Glutación Reductasa; GT, Glutación Transferasa; SOD, Superóxido Dismutasa; CAT, Catalasa.

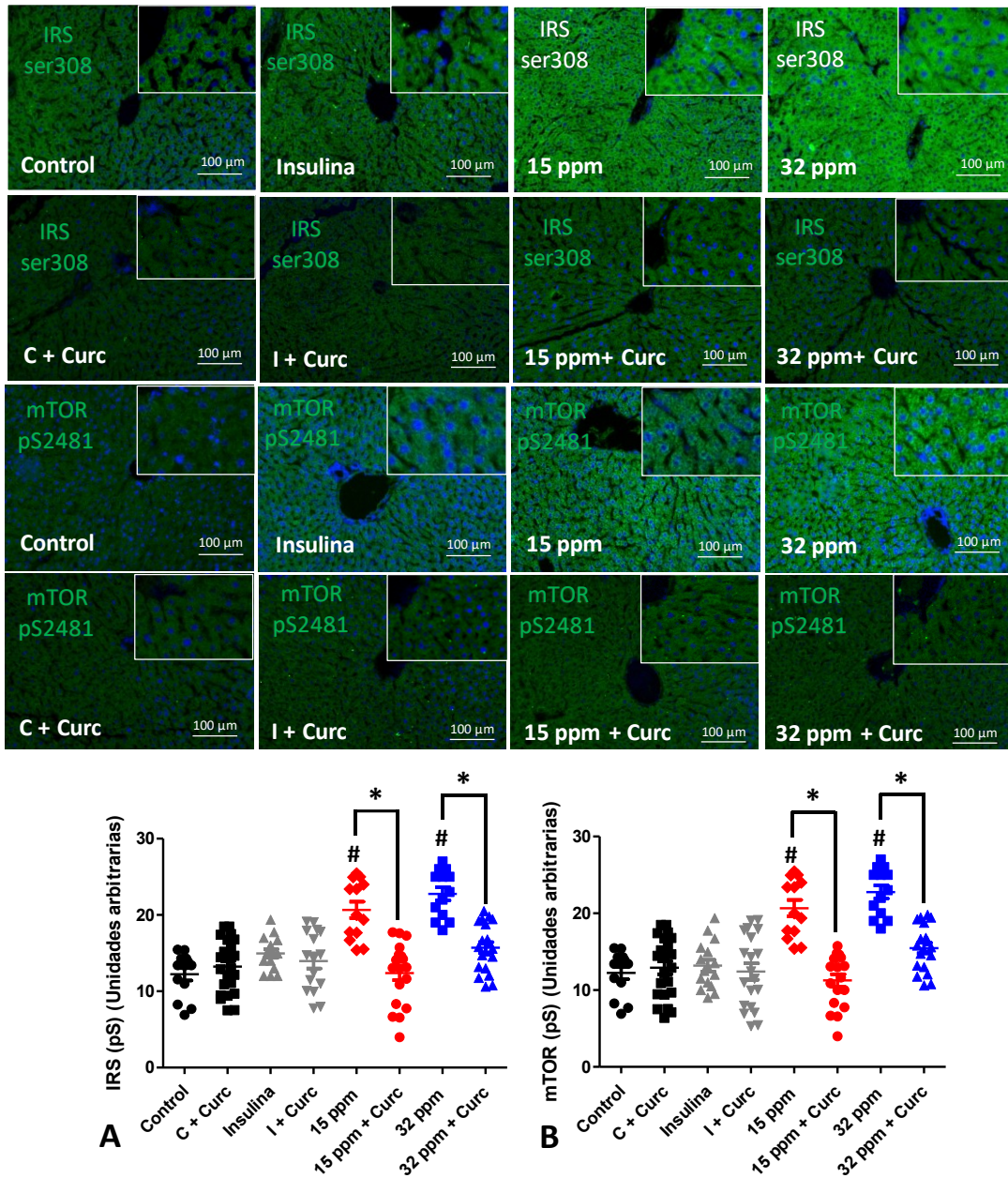
Además, evaluamos el efecto de curcumina sobre la defensa antioxidante (Tabla 3). La actividad de la CAT se afectó por el tratamiento con curcumina, al reducir su actividad en el grupo control (48%), insulina (50%), Cd-15 ppm (53%) y Cd-32 ppm (55%) respecto a sus grupos control sin tratamiento. El GSH incrementó en el grupo insulina (425%), el GSSG se redujo en los grupos insulina (54%) y Cd-32 ppm (51%) respecto a sus grupos sin tratamiento. Además, el glutatión total se incrementó 22 y 29% en los grupos Cd-15 y Cd-32 ppm, comparados con su grupo control sin tratamiento. Por último, el índice redox se incrementó en el grupo insulina (664%) y el grupo Cd-32ppm (130%) comparados con su grupo control sin tratamiento. Estos resultados apoyan la idea que el tratamiento con curcumina regula el ambiente oxidante generado por la exposición a Cd.



**Figura 20. Comportamiento de p38 y JNK después de la exposición a Cd y tratamiento con curcumina.** A) Proteína cinasa activada por mitógeno p38 (p38). B) Cinasa c-Jun N-terminal (JNK). Los resultados mostrados son el promedio de cinco animales de experimentación separados  $\pm$  SEM. Los resultados mostrados son el promedio de diez animales de experimentación separados  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney. (#) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney.

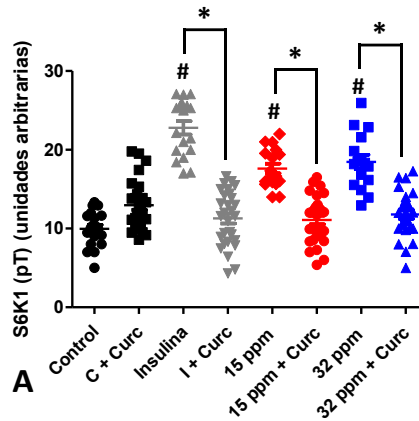
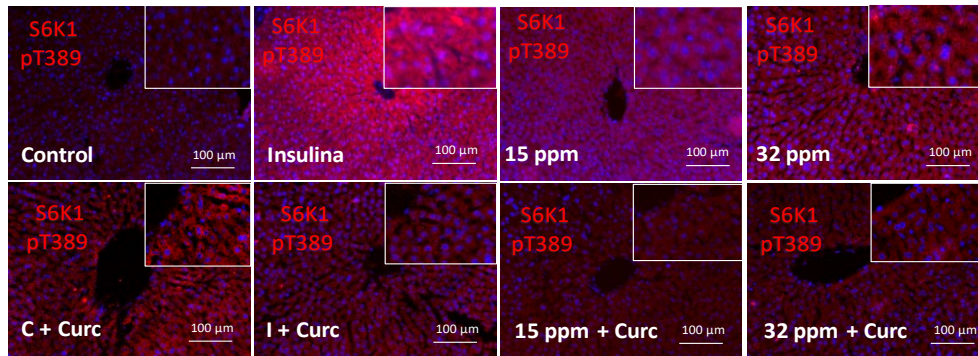


**Figura 21.- Comportamiento de la fosforilación en treonina y tirosina del receptor a insulina después de la exposición a Cd y tratamiento con curcumina.** Se muestran cortes de tejido hepático (5μm) de la inmunorreacción del receptor de insulina fosforilado en tirosina 1361 (RI-pY1361) y al receptor de insulina fosforilado en treonina 1375 (RI-pT1375). **A)** Análisis densitométrico de las fotomicrografías del receptor de insulina fosforilado en tirosina 1361 (RI-pY1361). **B)** Análisis densitométrico de las fotomicrografías receptor de insulina fosforilado en treonina 1375 (RI-pT1375). Las gráficas muestran el promedio de 25 campos diferentes ± EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney. (#) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney.



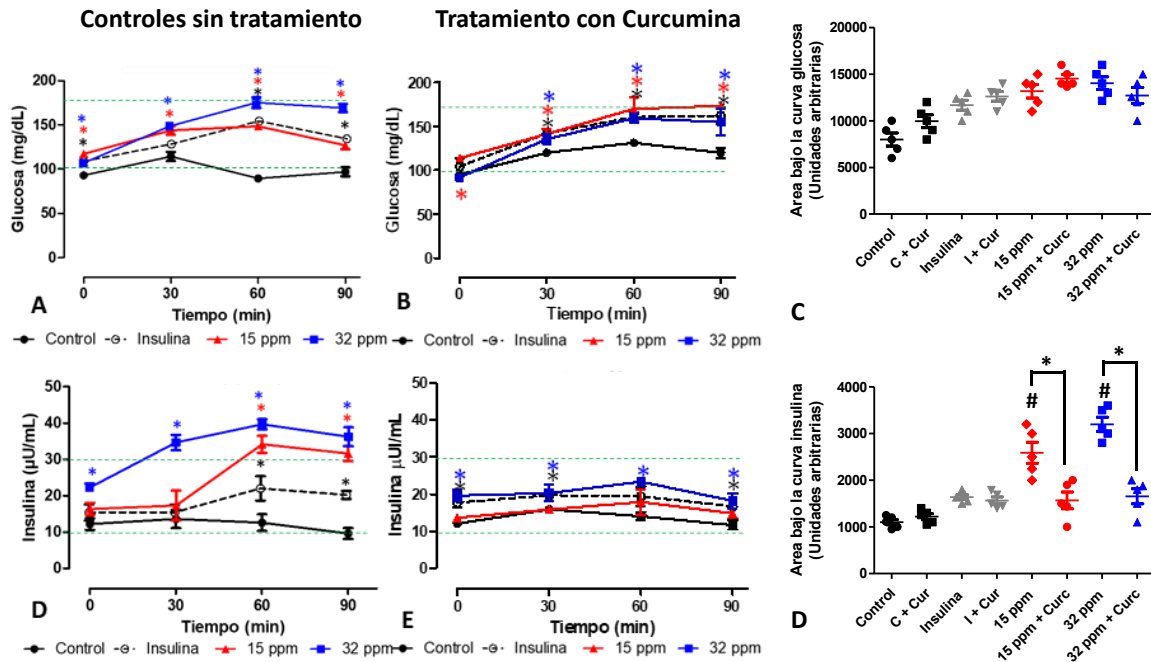
**Figura 22.-** Comportamiento de la fosforilación del IRS y mTOR después de la exposición a Cd y tratamiento con curcumina. Se muestran cortes de tejido hepático (5µm) de la inmunorreacción del sustrato del receptor de insulina (IRS) y la diana de rapamicina en células de mamífero (mTORpS2481). **A)** Análisis densitométrico de las fotomicrografías del sustrato del receptor de insulina (IRS) **B)** Análisis densitométrico de las fotomicrografías receptor de diana de rapamicina en células de mamífero (mTORpS2481). Las gráficas muestran el promedio de 25 campos diferentes ± EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney. (#) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney.

Consecuentemente, se evaluó la expresión de p38 y JNK (Figura 20), como las principales proteínas involucradas en la RI activadas por vías de señalización que involucran al estrés oxidativo.



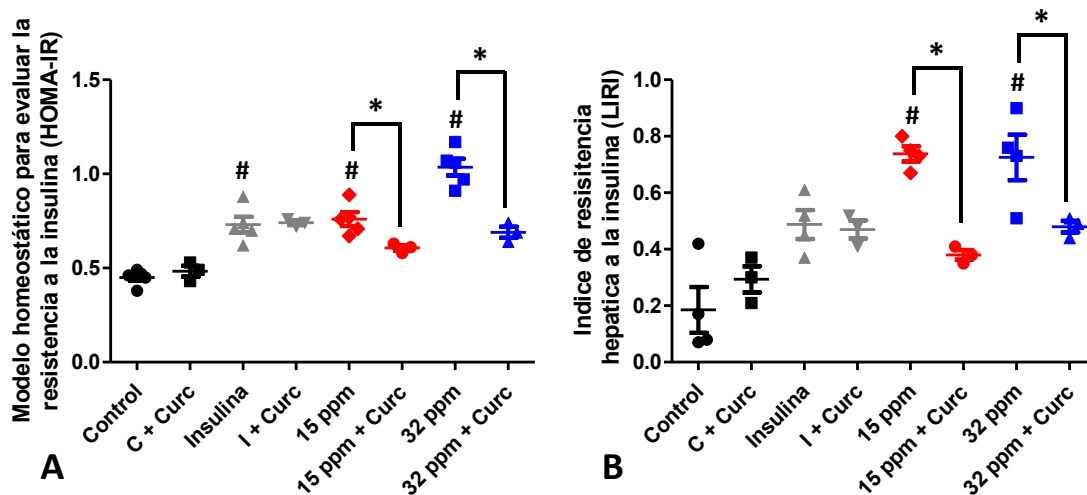
**Figura 23. Comportamiento de la S6K después de la exposición a Cd y tratamiento con curcumina.** Se muestran cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) de la inmunorreacción La proteína ribosomal S6 quinasa beta-1 (S6K1). **A)** Análisis densitométrico de las fotomicrografías de la proteína ribosomal S6 quinasa beta-1. Las barras muestran el promedio de 45 campos diferentes. Las gráficas muestran el promedio de 25 campos diferentes  $\pm$  EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney. (#) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney.

En p38 se redujo en 43%, 44%, 57% y 54% en los grupos control, insulina, Cd-15 ppm y Cd-32 ppm, mientras que para JNK fue de 51% y 43% en los grupos Cd-15 ppm y Cd-32 ppm, comparados con su grupo control sin tratamiento, después de la administración de curcumina. Estos resultados apoyan la idea que al mejorar el estatus oxidativo celular se reduce la concentración las principales MAPK involucradas en el desarrollo de RI.



**Figura 24.- Tolerancia a la glucosa y su respuesta de insulina a 30 días de la exposición a Cd y tratamiento con curcumina. A)** Tolerancia oral a la glucosa (TOG) de los grupos control. **B)** Tolerancia oral a la glucosa de los grupos más tratamiento con curcumina. **C)** Área bajo la curva de la TOG. **D)** Respuesta insulínica después de la TOG de los grupos controles. **E)** Respuesta insulínica de los grupos más tratamiento con curcumina. **F)** Área bajo la curva de la de la respuesta insulínica. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos  $\pm$  EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por "t" de Student. Para C) y D) (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney. (#) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney.

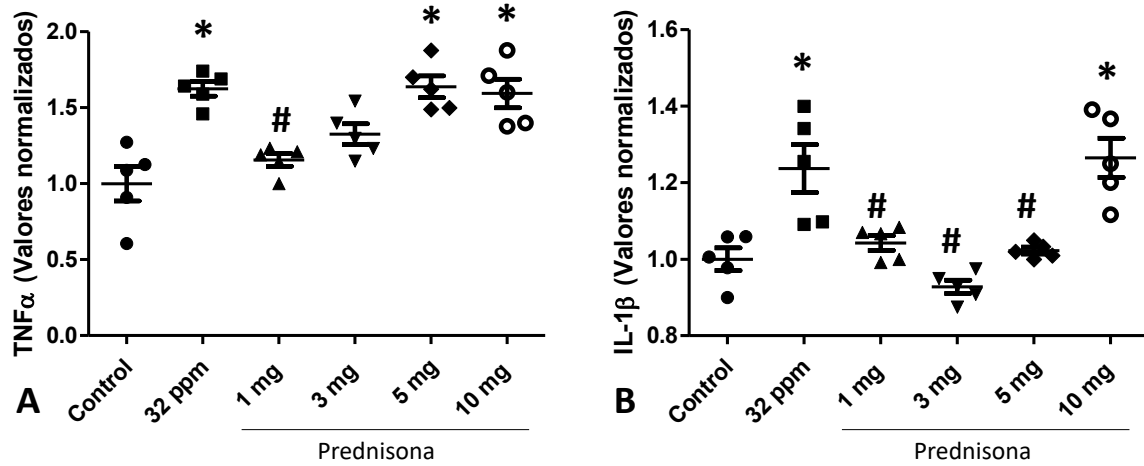
Así mismo, el tratamiento con curcumina reguló la expresión del RI-pY1361 y de RI-pT1375 en el grupo insulina. Mientras que en los grupos expuestos a Cd no se observan cambios estadísticamente significativos en la inmunorreactividad del receptor fosforilado en tirosina o treonina después de la administración con curcumina (**Figura 21**). Rio abajo en la señalización de insulina (**Figura 22**) se observó como la curcumina reduce la inmunorreactividad de IRS ser308 en el grupo Cd-15 ppm (34%) y el grupo Cd-32 ppm (50%), de mTOR pS2481 en los grupos Cd-15 ppm (35%) y Cd-32 ppm (37%) y de S6K1 (**Figura 23**) en los grupos insulina (45%), Cd-15 ppm (23%) y Cd-32 ppm (17%), comparados contra su grupo control sin tratamiento.



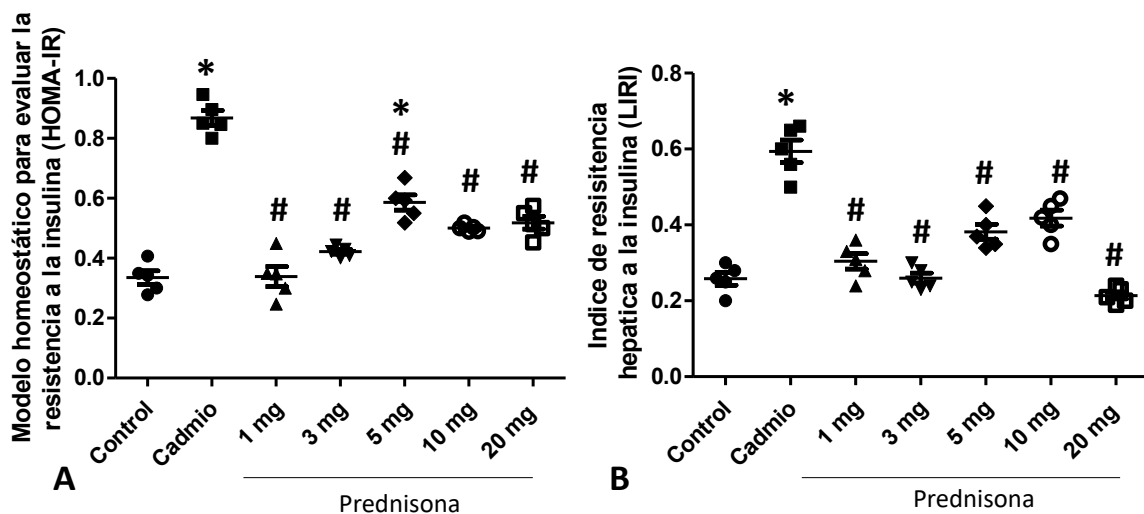
**Figura 25. Índices de Resistencia a insulina a 30 días de la exposición a Cd y tratamiento con curcumina. A) Modelo de evaluación de la homeostasis de resistencia a insulina (HOMA-IR). B) Índice de resistencia a insulina en hígado (LIRI). Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos  $\pm$  EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney. (#) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney.**

Una vez evidenciado los cambios de la administración de curcumina sobre la vía de señalización de insulina, evaluamos la tolerancia a la glucosa y la secreción de insulina estimulada por el carbohidrato (**Figura 24**). Como se puede observar, aunque existen ligeros cambios a lo largo de la prueba de tolerancia oral a la glucosa estos no son estadísticamente significativos. Estos se observan finamente en el área bajo la curva. Sin embargo, la secreción de insulina se redujo considerablemente desde el minuto 30 de análisis, en los grupos Cd-15 ppm y Cd-32 ppm. El área bajo la curva evidenció un 40 y 45%, respectivamente comparado contra sus grupos sin tratamiento. Debido a la reducción en la secreción de insulina, los índices de RI mejoraron considerablemente (**Figura 25**). En los grupos Cd-15 y Cd-32 ppm, el índice HOMA-IR se redujo en 20% y 33%, mientras que en el LIRI se redujo en 48% y 33% comparados contra su grupo sin tratamiento, evidenciando que el ambiente oxidante asociado a Cd es un inductor de RI.

## Curva dosis respuesta Prednisona-RI e inflamación.



**Figura 26. Efecto de diferentes dosis de Prednisona sobre la inflamación asociada a la exposición a cadmio.** A) Concentración hepática de TNF- $\alpha$ . B) Concentración hepática de IL-1 $\beta$ . Los resultados son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control y (#) respecto al grupo Cadmio a una  $P \leq 0.05$  por análisis Kruskal-Wallis.



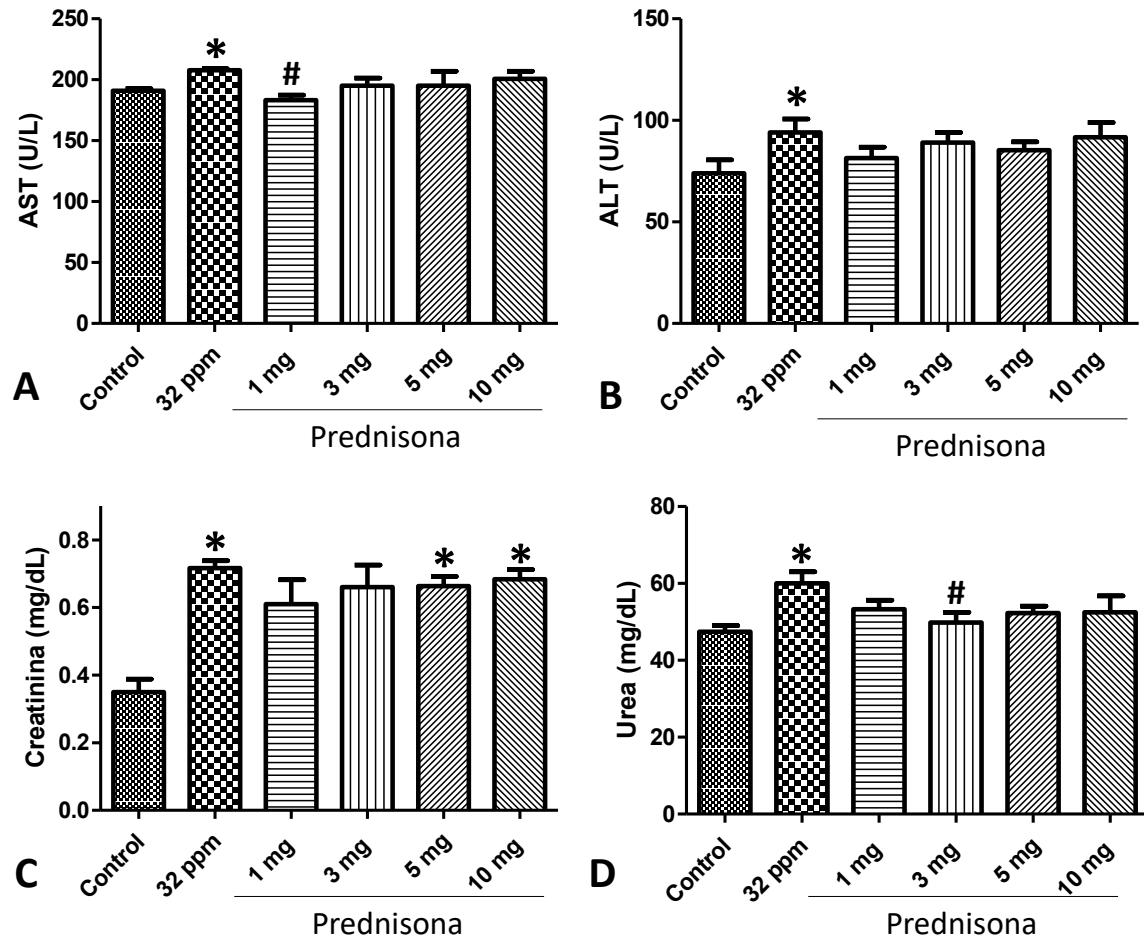
**Figura 27. Efecto de diferentes dosis de Prednisona sobre índices de resistencia a insulina después exposición a cadmio.** A) HOMA-IR (modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina). B) LIRI (Índice hepático de resistencia a insulina). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control y (#) respecto al grupo Cadmio a una  $P \leq 0.05$  por análisis Kruskal-Wallis.

Para determinar el papel que juega la inflamación sobre el desarrollo de resistencia a insulina después de la exposición a cadmio, utilizamos a la prednisona

como herramienta metodológica como antiinflamatorio, sin embargo, al igual que la curcumina realizamos una curva dosis respuesta para evaluar su efecto sobre la inflamación y la resistencia a insulina.

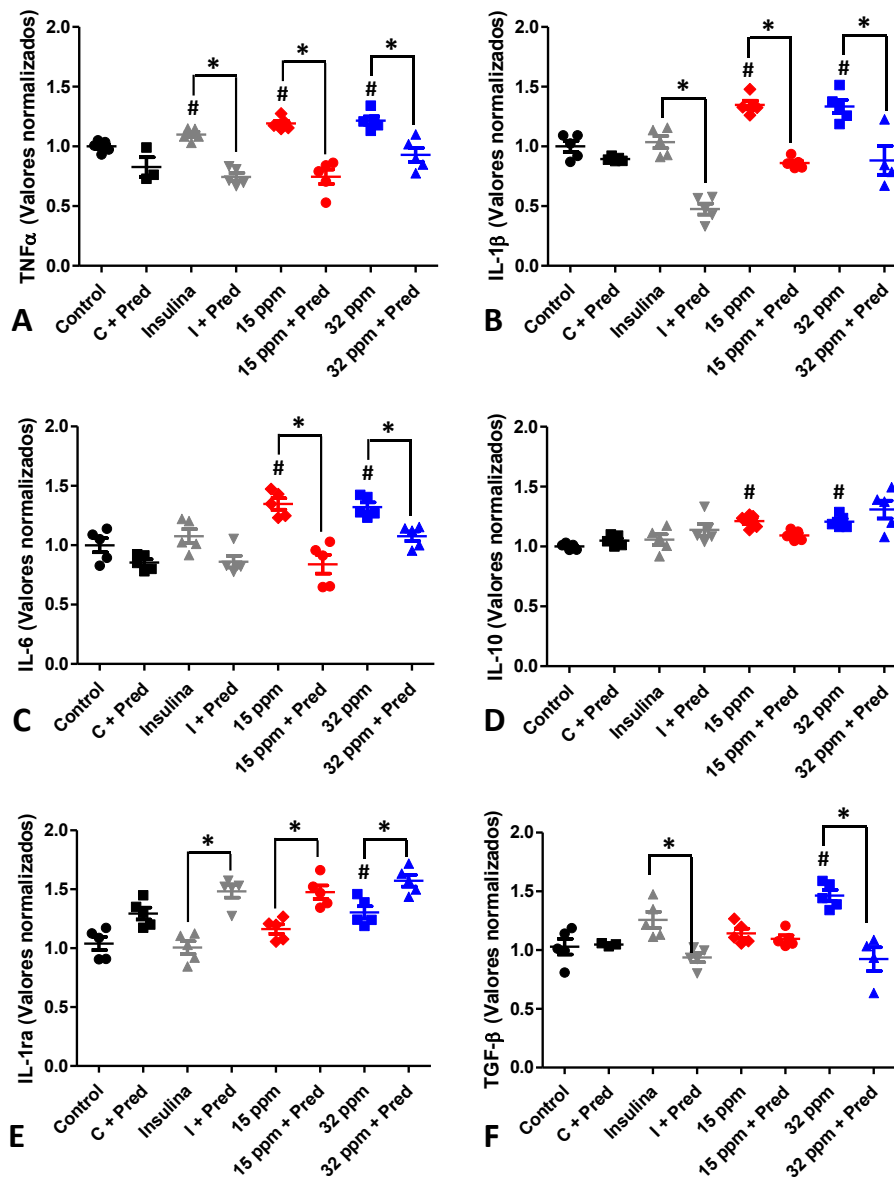
La curva dosis respuesta de Prednisona-Inflamación (**Figura 26**) muestra disminución estadísticamente significativa en la concentración de TNF- $\alpha$  solo con las dosis de 1 (30%) y de 2 mg/kg (16%), de manera similar la concentración de IL-1 $\beta$  se redujo 15, 25 y 16% solo en las dosis de 1, 2 y 5 mg/kg respectivamente. En lo que se refiere a la RI (**Figura 27**), se observó un decremento estadísticamente significativo del índice HOMA-IR con las dosis de 1 (61%), 2 (52%), 5 (33%) y 10 mg/kg (43%), respecto al grupo expuesto a Cd. El índice LIRI disminuyó significativamente en 45%, 55%, 32% y 29% al administrar 1, 3, 5 y 10 mg/kg. Las dosis de 1 y 3 mg/kg muestran el mejor efecto, al reducir ambos índices de RI.

Para asegurarnos de las dosis de Prednisona usadas no presenten efectos negativos en hígado y/o riñón, evaluamos biomoléculas clínicas asociadas a daño (**Figura 28**). La dosis de 1 mg/kg mostró el mejor efecto, al disminuir la actividad de AST (11%), similar al grupo control. Para AST, urea y creatinina, aunque no existe una disminución estadísticamente significativa con ninguna dosis del antiinflamatorio, se observa una tendencia a mejorar la actividad enzimática o concentración de los biomarcadores analizados. Con estos resultados nosotros elegimos a una dosis de 2 mg/kg, que es una dosis intermedia entre las dosis con mejores resultados (1 y 3 mg/kg) como aquella que disminuye la inflamación y la RI hepática, después de la exposición a Cd, sin causar daños hepáticos y renales.



**Figura 28.** Efecto de diferentes dosis de Prednisona sobre marcadores de daño hepático y renal después de exposición a cadmio. A) AST (Aspartato aminotransferasa); B) ALT (Alanina transaminasa); C) Creatinina; D) Urea. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. ANOVA de 1 Vía, con análisis Post Hoc de Bonferroni. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control y (#) respecto al grupo Cadmio a una  $P \leq 0.05$

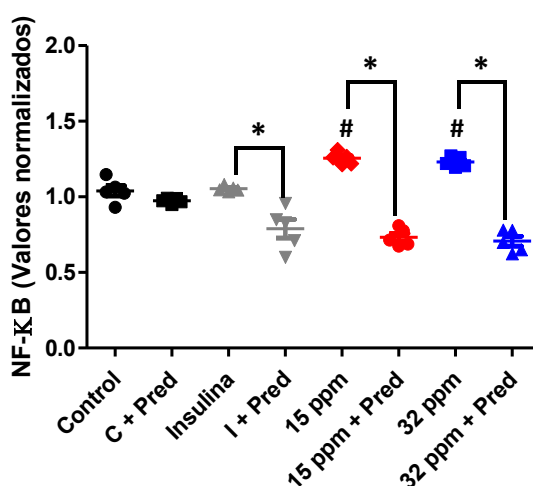
## Efecto de la Prednisona sobre la resistencia a insulina y la inflamación.



**Figura 29. Estatus sérico inflamatorio a 30 días de los grupos experimentales y su tratamiento con Prednisona. A)** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . (TNF- $\alpha$ ). **B)** Interleucina 6 (IL-6). **C)** Interleucina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). **D)** Interleucina 10 (IL-10). **E)** Antagonista del Receptor de Interleucina 1 (IL-1ar). **F)** Factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF- $\beta$ ). Los resultados mostrados son el promedio de cinco animales de experimentación separados  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney. (#) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney.

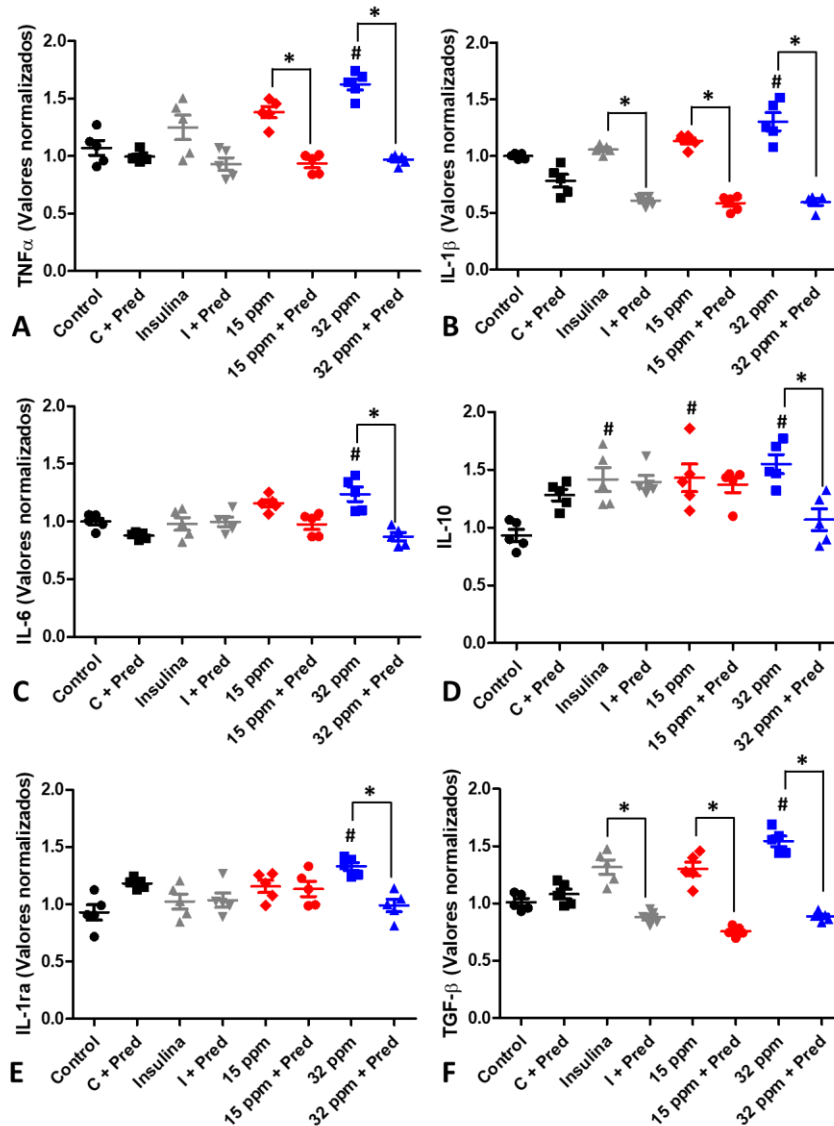
Una vez obtenida una dosis efectiva antiinflamatoria de prednisona esta fue utilizada para evaluar los marcadores inflamatorios séricos en nuestros grupos experimentales (**Figura 29**). La concentración de TNF- $\alpha$  se redujo de manera

significativa en todos los grupos 17 % para el grupo control, 25% para el grupo insulina, 37% para el grupo Cd-15 ppm y 17% para el grupo Cd-32 ppm, comparados contra su grupo sin tratamiento. La concentración de IL-1 $\beta$  e IL-6 disminuyó en el grupo insulina (46% IL-1 $\beta$ ), Cd-15 ppm (36% y 37%) y Cd-32 ppm (33%,15%). IL-10 disminuyó no mostro cambio significativos. Sin embargo, la concentración de IL-1 $\alpha$  se incrementó en 38%, 21% y 22% para los grupos insulina, Cd-15 ppm y Cd-32 ppm respecto a su grupo sin tratamiento. Por último, la concentración de TGF- $\beta$  se redujo en el grupo insulina (25%) y el grupo Cd-32 ppm (37%).



**Figura 30. NF-κB de los grupos experimentales y su tratamiento con Prednisona.** Cuantificación del Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activada (NF-κB) por el método de Elisa en homogenado de tejido hepático. Los resultados mostrados son el promedio de diez animales de experimentación separados  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney. (#) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney.

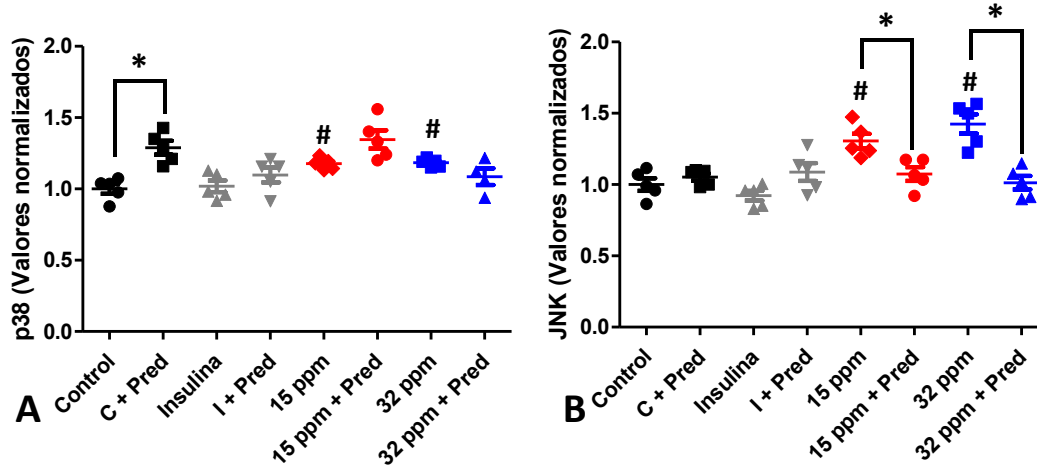
Además del estatus inflamatorio a nivel sérico, evaluamos este estatus a nivel tisular empezando por el principal factor de transcripción involucrado además de otras de vías de señalización en la inflamación el NF-κB (**Figura 30**). Por medio de la técnica de ELISA observamos que la concentración de NF-κB se redujo después de la administración de Prednisona en los grupos insulina (25%), Cd-15ppm (41%) y Cd-32 ppm (42%).



**Figura 31. Estatus tisular inflamatorio a 30 días de los grupos experimentales y su tratamiento con Prednisona. A)** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . (TNF- $\alpha$ ). **B)** Interleucina 6 (IL-6). **C)** Interleucina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). **D)** Interleucina 10 (IL-10). **E)** Antagonista del Receptor de Interleucina 1 (IL-1ar). **F)** Factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF- $\beta$ ). Los resultados mostrados son el promedio de cinco animales de experimentación separados  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney. (#) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney.

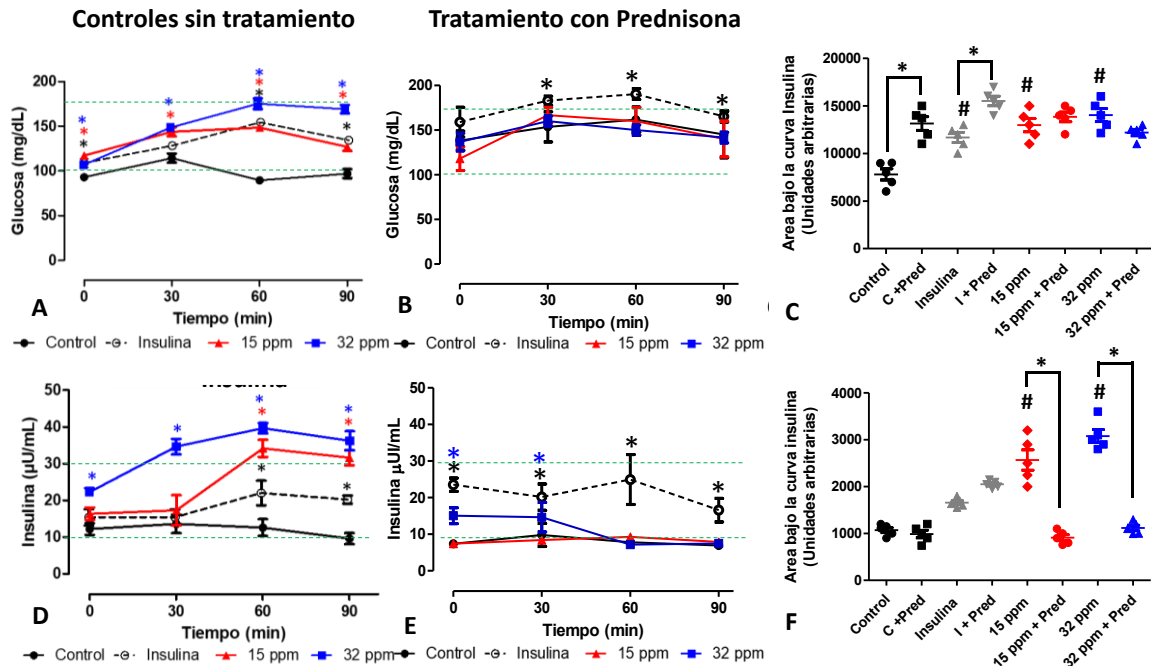
La concentración de TNF- $\alpha$  en tejido se redujo en 32% y 39% en los grupos, Cd-15 ppm y Cd-32 ppm respecto a sus grupos sin tratamiento. La concentración de IL-1 $\beta$  presentó una reducción para el grupo, insulina (42%), Cd-15 ppm (48%) y Cd-32 ppm (54%). Mientras que, la IL-6, la IL-10 y el IL-1ar sólo se redujeron en el grupo Cd-32 ppm en 28% y 24% y 23%. La concentración de TGF- $\beta$  se redujo

significativamente 33%, 41% y 42% en los grupos insulina, Cd-15 ppm y Cd-32 ppm, comparados contra su grupo sin administración de Prednisona.



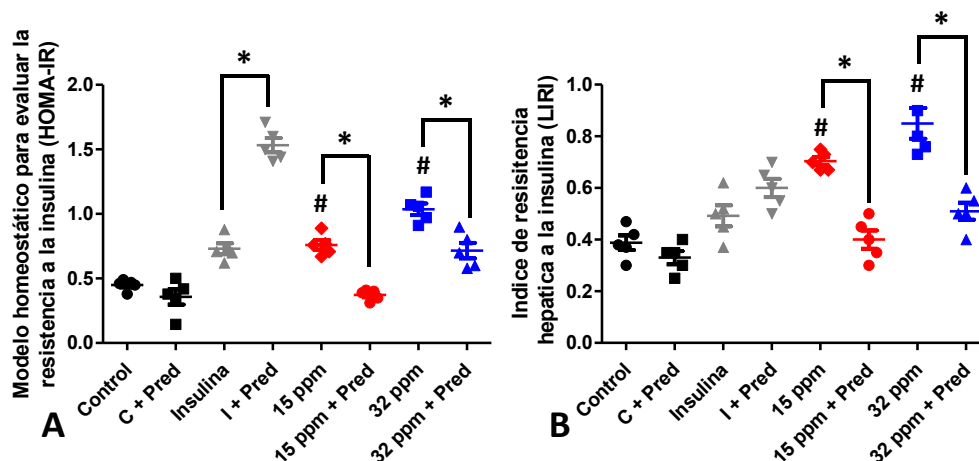
**Figura 32. Cinasas p38 y JNK en los grupos experimentales y su tratamiento con Prednisona. A)** Proteína cinasa activada por mitógeno p38 (p38). **B)** Cinasa c-Jun N-terminal (JNK). Los resultados mostrados son el promedio de cinco animales de experimentación separados  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney. (#) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney.

La concentración de p38 se incrementó solo en el grupo control (23%). La concentración de JNK se redujo 23% y 24% para el grupo Cd-15 ppm y Cd-32 ppm, comparados contra su grupo sin tratamiento de Prednisona. En conjunto nuestros resultados comprueban que la administración de Prednisona funciona como un modulador de la inflamación en los grupos experimentales, principalmente en los que fueron expuestos a Cd, en donde se disminuye la inflamación y las principales proteínas MAPK involucradas en el desarrollo de RI.



**Figura 33.- Tolerancia a la glucosa y respuesta de insulina de los grupos experimentales y su tratamiento con Prednisona. A)** Tolerancia oral a la glucosa (TOG) de los grupos control. **B)** Tolerancia oral a la glucosa de los grupos más tratamiento con prednisona. **C)** Área bajo la curva de la TOG de los grupos controles. **E)** Respuesta insulínica de los grupos más tratamiento con prednisona. **F)** Área bajo la curva de la de la respuesta insulínica. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos  $\pm$  EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney. (#) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney.

La tolerancia oral a la glucosa y la respuesta de insulina sirven como herramientas para evaluar el efecto de la Prednisona sobre la RI (**Figura 33**). La administración del antiinflamatorio incrementó la concentración de glucosa en los grupos control e insulina respecto a sus grupos sin tratamiento, lo cual fue corroborado por el análisis del área bajo la curva, en la que se observó un incremento de 60% y 32%, respectivamente. Sin embargo, el efecto de la Prednisona sobre la secreción de insulina estimulada por la TOG mostró decrementos significativos del 61% y 65% en los grupos Cd-15 ppm y Cd-32 ppm, respecto a sus controles sin tratamiento con Prednisona.



**Figura 34.- Índices de Resistencia a insulina de los grupos experimentales y su tratamiento con Prednisona. A)** Modelo de evaluación de la homeostasis de Resistencia a Insulina (HOMA-IR). **B)** Índice de resistencia a insulina en hígado (LIRI). Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos  $\pm$  EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto a cada grupo control sin tratamiento  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney. (#) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por prueba de U de Mann-Whitney.

Por último, evaluamos el efecto de la Prednisona sobre los índices de resistencia a insulina (**Figura 34**). Como se puede observar el grupo insulina muestra un incremento del 108% en el índice HOMA-IR. Sin embargo, un decremento del 53% y 26% fue observado en los grupos Cd-15 ppm y Cd-32 ppm, respectivamente. Mientras que, el índice LIRI disminuyó significativamente en los grupos Cd-15 ppm (45%) y Cd-32 ppm (42%). Con estos resultados podemos evidenciar que el uso de la Prednisona como antiinflamatorio reduce la RI por exposición a Cd.

## Discusión de Resultados

Efecto de la exposición de cadmio sobre el estrés oxidativo, inflamación y resistencia a insulina.

En estudios previos, se ha mostrado que la exposición a Cd puede ser causa de hiperglicemia, resistencia a insulina y diabetes en animales, cultivos celulares y seres humanos (Buha et al. 2020; Lei et al. 2019; Tinkov et al. 2017; Treviño et al. 2015). No obstante, la mayoría de estos estudios no son concluyentes debido a la gran variabilidad en cuanto al tiempo, la dosis y la vía de administración de Cd, por

lo que en el presente trabajo trata de aclarar estos mecanismos al exponer a ratas macho de la cepa Wistar a dos concentraciones diferentes de Cd en agua de beber durante 30 días; una dosis a nivel de efecto adverso no observado (NOAEL; 15 ppm) y otra dosis en el nivel más bajo de efecto adverso observado (LOAEL; 32 ppm) (ATSDR 2021). La exposición a Cd a estas dosis demostró el desarrollo de hiperglicemia en ayuno y postprandio, después de una carga oral estándar de glucosa (**Figura 8A**). La relación entre el desarrollo de hiperglicemia y la exposición a Cd es evidente, y los mecanismos propuestos para explicar este fenómeno incluyen al transportador de glucosa tipo 4 (GLUT 4), cuya expresión se ve afectada negativamente ante la exposición al metal (Han et al. 2003); además, se ha demostrado que Cd induce vías gluconeogénicas asociadas a una mayor actividad en algunas enzimas clave (Chapatwala et al. 1982; Chapatwala, Rajanna, and Desai 1980; Merali and Singhal 1980). Sin embargo, el mecanismo o los mecanismos por los cuales el Cd induce el desarrollo de estados hiperglucémicos no son completamente comprendidos actualmente.

Además de la hiperglucemia, los animales expuestos a Cd mostraron incremento en los niveles de insulina en ayuno, así como en la respuesta post-carga de glucosa. La secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) es un proceso altamente complejo que inicia con la entrada de glucosa en la célula  $\beta$  seguida del metabolismo de la glucosa en las vías citosólica y mitocondrial. El aumento en los niveles de ATP produce el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP, la despolarización de la membrana, afluencia de calcio y formación y exocitosis de vesículas que contienen insulina (Rorsman and Braun 2013). Si bien el mecanismo para el incremento de GSIS por Cd no se ha estudiado, existen informes sobre Cd, su efecto y acumulación en páncreas, sin que existan datos concluyentes debido a la gran variabilidad de diseños experimentales, ya que los efectos van desde proliferación hasta muerte celular (Buha et al. 2020; Dover, Patel, and Stýblo 2018; J. Edwards and Ackerman 2016; El Muayed et al. 2012; Treviño et al. 2015). En este sentido, se ha informado que existe una dependencia del tiempo y concentración en la exposición a Cd, ya que se puede presentar un doble mecanismo en relación de la secreción insulínica: a) altos niveles de Cd resultan en una disminución de la

liberación de insulina; b) mientras que bajos niveles de exposición producen una tasa incrementada de liberación de la hormona (J. R. Edwards and Prozialeck 2009; Hectors et al. 2011).

En nuestros resultados, una mayor hiperinsulinemia se observó en los grupos expuestos a Cd (**Fig. 8B**), comparada con el grupo control positivo al cual se le generó un exceso de la hormona cuando se administraron 4 UI/día de insulina de lenta acción por vía intraperitoneal (dosis NOAEL) (Stammberger et al. 2002). Estos resultados ponen en evidencia una hiperreactividad de las células  $\beta$  en la secreción de insulina en los grupos expuestos a Cd. En este sentido, parece ser que el aumento de la secreción de insulina es estimulada por el incremento en la concentración de glucosa, pero también por un estímulo de proliferación pancreático debido a la exposición al metal (Treviño 2015; Treviño et al. 2015).

El aumento progresivo en los niveles de insulina puede ser parte de un mecanismo de adaptación por el tejido pancreático con la finalidad de restaurar la homeostasis de la glucosa en ratas expuestas a Cd. La respuesta adaptativa a los estados de hiperinsulinemia a menudo se vinculan al desarrollo de resistencia a la insulina *in vivo*, en donde la hormona estimula a células diana, restaurando simultáneamente la capacidad de respuesta celular a las dosis posteriores de la hormona (Shanik et al. 2008). Independientemente de la causa que lleva a una hiperinsulinemia, la hiperfunción sostenida de las células  $\beta$  puede conducir a una alteración en su propia capacidad para regular su tasa de secreción de insulina, lo que conduciría a eventos crónicos de la enfermedad metabólica como resistencia a insulina y diabetes (DeFronzo 2010).

Debido a los cambios compensatorios en la secreción de la hormona, se han desarrollado estrategias que evalúan de manera no invasiva la actividad de la hormona en los diferentes tejidos, como lo son los modelos matemáticos. En este estudio se evaluó la insulino-resistencia usando el índice HOMA-IR (Matsuda and DeFronzo 1999) el cual presenta una buena correlación con la pérdida de la insulino sensibilidad *in vivo* (Sarafidis et al. 2007). De acuerdo con el cálculo de este índice, las ratas administradas con insulina y las expuestas en ambas concentraciones

expuestas a Cd presentan resistencia a la insulina a los 30 días de exposición (**Fig. 8C**). El mayor desarrollo de resistencia a insulina fue en el grupo expuesto a 32 ppm, no obstante, el grupo administrado con 15 ppm de Cd, dosis que en teoría y por definición no tiene efecto adverso observable, generó resistencia a insulina, estos resultados son muy importantes ya que no existía hasta el momento evidencia que demostrara que dosis no tóxicas generaran daño a nivel metabólico.

Adicionalmente al HOMA-IR, también fue calculado un índice específico para la evaluación de resistencia hepática a insulina; el índice LIRI (Vangipurapu, Stančáková, Kuulasmaa, Paananen, Kuusisto, Ferrannini, and Laakso 2011), este índice correlaciona la concentración de insulina durante la TOG, la concentración de triglicéridos, el porcentaje de grasa y el índice de masa corporal, marcadores que en humanos están estrechamente relacionados con el desarrollo de resistencia a insulina. El índice LIRI (**Fig. 8D**) muestra que la exposición a Cd incrementó notablemente la resistencia en tejido hepático independientemente de la dosis expuesta. Esto puede ser causado por la ruta de exposición de Cd a la cual fueron sometidos los animales, ya que la vía portal tiene como primer órgano blanco al hígado (Genchi et al. 2020).

Se sabe que independientemente del tipo de exposición a Cd (oral, pulmonar o parenteral), el hígado es el principal órgano que acumula la mayor cantidad de Cd durante las primeras horas después de la exposición (Järup and Akesson 2009; Thévenod and Lee 2013). El Cd llega a hígado a través de la circulación portal, unido principalmente a albúmina, donde se recaptura desde los capilares sinusoidales hasta los hepatocitos (Arroyo et al. 2013). Nuestros resultados evidenciaron que el metal se acumuló en el hígado en concentraciones similares, independientemente de la dosis de exposición al metal en el agua de consumo (**Fig. 11**). Probablemente lo observado se debe a mecanismos asociados a la desintoxicación hepática y su redistribución a diferentes tejidos diana, por lo que el hígado resguarda concentraciones similares de Cd sin importar la concentración de exposición (Klaassen, Liu, and Diwan 2009; Sidhu et al. 1993). Con estos resultados evidenciamos que la exposición al metal induce el desarrollo de resistencia hepática

a insulina después de un mes de exposición, tanto por una dosis LOAEL como por la NOAEL.

En la resistencia a la insulina, la capacidad de la hormona para iniciar las cascadas de fosforilación río abajo que regulan la actividad de segundos mensajeros se encuentran alteradas, se presentan cambios en la dinámica de fosforilación de la cascada de señalización (de tirosinas a treoninas o una hiperfosforilación en tirosinas), y por tanto se sufren modificaciones en la regulación de la expresión genética (Brown and Goldstein 2008; Petersen et al. 2016; Samuel and Shulman 2012, 2016). La actividad enzimática, la fosforilación de quinasas y sustratos en estas vías de señalización se reducen, como se ha demostrado en biopsias musculares de sujetos insulinoresistentes (SESTI et al. 2001). Sin embargo, el sitio o los sitios de la perturbación inicial en la transducción de la señal sigue siendo poco claros.

Hay evidencia que sugiere que la regulación del receptor de insulina en condiciones agudas y crónicas contribuye a la alteración en la sensibilidad a la hormona, así como en la homeostasis de la glucosa. De este modo, el primer evento después de la unión de insulina a su receptor (RI), da lugar a un cambio conformacional que induce la autofosforilación de distintos residuos tirosina de las subunidades  $\beta$  (Youngren 2007). Se han notificado alteraciones en la función del RI en tejidos de humanos y animales resistentes a la insulina, así como una autofosforilación reducida ante el estímulo por insulina *in vivo*, así como en biopsias de tejido, en trabajos *in vitro* (Gual, Le Marchand-Brustel, and Tanti 2005). Asimismo, se ha reportado que ante la exposición a Cd se reduce significativamente (aproximadamente 50%) el número total de RI, la cual podría ser responsable del efecto diabetogénico observado en ingestas de larga duración del metal (Ficková et al. 2003), tal vez por el efecto conocido como cooperación "negativa".

Nuestros resultados muestran que la exposición a Cd disminuyó la fosforilación de tirosina 1361 del RI, aunado a un incremento en la fosforilación de residuos de treonina 1375 (**Fig. 9**). Sin embargo, el grupo control positivo administrado con insulina exógena, no se observó. La disminución en la fosforilación

de los residuos de tirosina podría deberse a la actividad de diferentes fosfatasas relacionadas con el desarrollo de la resistencia a insulina e inflamación (Solinas and Becattini 2017). Consecutivamente a la autofosforilación de los residuos tirosina promueven un lento aumento en la fosforilación de residuos de serina y treonina, estos cambios se han propuesto como un mecanismo de retroalimentación negativo de la vía de señalización (Lee & Pilch, 1994; Pillay & Siddle, 1991; Tavaré et al., 1991), por lo que el cambio en la dinámica de fosforilación observada es característico de la exposición a Cd, lo cual explicaría, al menos a nivel del receptor el desarrollo de resistencia a insulina.

Un nodo crítico en la vía de señalización de insulina es el reclutamiento de sustratos del receptor, estos sustratos son fosforilados en sus residuos de tirosina y son la familia de sustratos de receptores de insulina (IRS) (Zhang et al., 2017). Las proteínas IRS son activadas por la fosforilación de la tirosina, sin embargo, son inhibidas por la fosforilación de residuos de serina y treonina (Taniguchi, Emanuelli, and Kahn 2006). La fosforilación de serina/treonina del IRS induce la defosforilación de tirosina, su disociación del receptor, su localización intracelular y su eventual degradación, lo cual disminuye actividad de la cascada de insulina o genera estados de insulinoresistencia. Por lo que, al evaluar la expresión de IRS fosforilado en serina 307, en los grupos expuestos al metal encontramos un incremento en la inmunoreactividad de esta proteína, este incremento podría estar asociada a un mecanismo de regulación negativa de la vía de señalización de insulina ya que también se incrementada la inmunoreactividad de mTORC1 y de manera más importante de S6K1 (p70S6K) que es una cinasa río abajo de mTORC1 en la vía de señalización de insulina, sin embargo, la retroalimentación negativa por esta vía es fisiológica, y no un mecanismo de resistencia a insulina (Shum et al. 2016; J. Zhang et al. 2008). De manera interesante el mayor incremento de la expresión de S6K1 se dio en el grupo administrado con insulina, lo que sugiere que la insulina exógena genera la retroalimentación negativa fisiológica de la vía, mientras que el Cd genera resistencia a insulina por otros mecanismos. En este sentido, ya se ha descrito que la exposición a Cd incrementa la expresión de mTOR1c *in vitro* por la inducción de ROS (Kato, Katoh, and Kitamura 2013).

Además, S6K1 bajo condiciones *in vitro* se incrementa tras la exposición a Cd en hepatocitos aún en Rapamicina (inhibidor selectivo de mTORC1, que es el principal inductor de S6K1 río arriba), esto indicaría que el Cd activa a S6K1 de manera independiente de la señalización de insulina (Tsai, Chao, and Lin 2016). Además, cuando se usa NAC como antioxidante, disminuye la actividad de S6K (Kato, Katoh, and Kitamura 2013), lo que sugiere fuertemente la idea de que el estrés oxidativo inducido por la exposición a Cd interviene en la vía de señalización de insulina.

La segunda rama en la cascada de señalización de insulina es la ruta de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), en ésta, la insulina activa a las MAPK's a través del reclutamiento y de una serie de fosforilaciones que terminan finalmente con la activación de ERK1/2 (Boucher, Kleinridders, and Kahn 2014). En concordancia a la ruta de señalización secundaria, nuestros resultados mostraron incremento en la inmunoreactividad de ERK1/2, lo que sugiere fuertemente que el Cd induce la activación de ERK1/2 en estados de resistencia a insulina. El Cd puede activar la vía de las MAPK (JNK, p38 y ERK) de manera secundaria a la generación de ROS y en respuesta a su incremento (Chen, Liu, and Huang 2008; Nemmiche 2016; Thévenod 2009). Además, ERK se activa también mediante señales inflamatorias fosforilando a otras cinasas y factores transcripcionales. La activación de ERK1/2 se ha caracterizado como un evento clave en la señalización de la insulina y la diabetes, desempeñando un papel importante en la captación y el metabolismo de la glucosa en el hígado y en músculo esquelético, regula la secreción y producción de insulina a nivel transcripcional, y en la traducción. ERK tiene una actividad bimodal ya que principalmente induce crecimiento, proliferación y diferenciación celular, sin embargo, cuando es inducida por inflamación exagera la producción de ácidos grasos libres y citoquinas proinflamatorias, lo que conduce a una mayor inflamación y resistencia a la insulina (Nandipati, Subramanian, and Agrawal 2017).

A pesar de existir otros nodos importantes en la vía de señalización de insulina para el desarrollo de resistencia a insulina; la inactivación de IRS parece ser la clave en los mecanismos moleculares de la resistencia a insulina, en este

sentido, se conoce que existen múltiples reguladores que modulan la actividad de IRS en condiciones patológicas, entre los que se encuentran GSK3 $\beta$ , PKC $\theta$ , IKK, p38 y JNK, sin embargo, parecen ser los últimos 3 los más importantes ya que fosforilan a IRS en serina 307 inhibiendo su capacidad de señalización río abajo, esto principalmente en condiciones de inflamación y estrés oxidativo, lo que proporciona una idea mecanicista plausible entre la inflamación y/o el estrés oxidativo generado por la exposición a Cd y el desarrollo de resistencia a la insulina (Petersen and Shulman 2018).

La propagación de la señal en diversas vías de señalización como el estrés oxidativo y la inflamación depende principalmente MAPK. Las MAPK's están compuestas por tres grupos principales: JNK, ERK y p38 que son importantes mediadores de la transducción de señales, como la sobrevivencia, proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (Kyriakis and Avruch 2012). La sobre activación de las vías de señalización de p38 y JNK parecen ser el vínculo entre la inflamación, el estrés oxidativo y la resistencia a insulina. Nuestros resultados evidencian incremento de JNK y p38 después de la exposición a Cd (**Fig. 16**), sin embargo, la administración crónica de insulina no genera dicho efecto, lo cual proporciona evidencia de que estos cambios son por la exposición al metal y no por la hiperinsulinemia generada. No obstante, todavía existe debate acerca de la presencia de MAPKs como causa o el resultado de la resistencia a insulina. Se sabe que la activación de p38 se produce en respuesta a la hiperglucemia y en la diabetes (Kyriakis and Avruch 2012; Nandipati, Subramanian, and Agrawal 2017). Por su parte JNK es una de las moléculas más investigadas en los modelos de obesidad y de resistencia a la insulina, y los estudios han llevado a un nuevo paradigma de cómo el exceso de la proteína puede causar resistencia a la hormona (Arthur and Ley 2013; Solinas and Becattini 2017).

En general las p38-MAPK responden a una amplia gama de estímulos extracelulares como; citocinas proinflamatorias, los factores de crecimiento y principalmente el estrés oxidativo. La inducción de p38 ha sido descrita en varias vías (Kyriakis and Avruch 2012), dentro de las cuales se incluyen como las más

potentes IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B y ROS. Asimismo, es probable que la activación de p38 promueva la transducción de señales de mTORC1 (Tsai, Chao, and Lin 2016), el cual también encontramos incrementado tras la exposición a Cd. Además, se sabe que JNK, es un importante transductor de señales que conduce a la respuesta fisiológica de varios estresores celulares, como daño genotóxico, estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico, ácidos grasos saturados de cadena larga, citoquinas inflamatorias y subproductos microbianos (Kyriakis and Avruch 2012; Solinas and Becattini 2017). Se han propuesto varios mecanismos del papel de JNK en la generación de la resistencia a insulina, sin embargo, al parecer la fosforilación inhibitoria directa de los IRS1 por JNK es el principal inductor de resistencia a insulina (Solinas and Becattini 2017). Tanto la activación de p38 y JNK han sido estudiados tras la exposición a Cd y la mayor parte de los resultados han evidenciado que el incremento de las MAPK son mediados por una mayor producción de ROS (Chen, Liu, and Huang 2008; Thévenod 2009; Thévenod and Lee 2013), por lo que más adelante se discutirá el papel que tiene tanto el estrés oxidativo como la inflamación por la exposición a Cd en el desarrollo de resistencia a insulina.

Uno de los mecanismos más recientes de resistencia hepática a insulina, propone que la acumulación de diacilglicerol (DAG) promueve la translocación y activación de la proteína quinasa C- $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) (Roura-Guiberna et al. 2019), que fosforila RI en su residuo de treonina 1160 desestabilizando su configuración y, por lo tanto, inhibiendo la actividad de receptor (Petersen et al. 2016). El mecanismo de PKC $\epsilon$  proporciona una clara explicación del incremento de la fosforilación de residuos de treonina y la disminución de residuos de tirosina del receptor a insulina mostrado por la exposición a Cd. Los grupos expuestos a Cd, pero no a insulina exógena incrementaron la expresión de PKC $\epsilon$  (**Fig. 10**). Además, evidenciamos la co-localización de PKC $\epsilon$  con el receptor a insulina (datos no mostrados), estos resultados son muy importantes ya que a nuestro conocimiento este es el primer trabajo que asocia este mecanismo de resistencia a insulina con la exposición al metal. El mecanismo PKC $\epsilon$ -RI propone que la acumulación de lípidos hepáticos son una de las principales causas de resistencia hepática a la insulina, en este sentido

ya hemos demostrado como el Cd altera el lipidoma hepático caracterizado por incremento de TG hepáticos, asociado a resistencia a insulina (Sarmiento-Ortega et al. 2017; Treviño et al. 2015). A pesar de que el mecanismo de resistencia a insulina por PKC $\epsilon$  es muy novedoso y poco estudiado, nuestro trabajo se centra principalmente el estudio de otros mecanismos de resistencia como la inflamación y el estrés oxidativo, por lo que nos enfocamos en el estudio de estos.

En el hepatocito, el Cd forma complejos con pequeños péptidos y proteínas a través de grupos sulfhidrilo, incluido el glutatión y las metalotioneínas (MT) como principal fuente de protección, excreción y redistribución contra el metal. En este contexto la tolerancia a un estado de hepatotoxicidad crónica por Cd depende de los niveles de MT y GSH, que funcionan como la primer defensa celular contra el metal (Klaassen, Liu, and Diwan 2009). Bajo condiciones de cronicidad, el GSH participa en la respuesta antioxidante. Nuestros resultados confirmaron que la exposición a Cd incrementó de manera importante a las MT y a GSH en respuesta al metal y al ambiente prooxidante, ya que el grupo insulina no mostró dicho incremento. Además, se ha demostrado que ante una exposición a Cd, ocurre una depleción de GSH con un incremento de su especie oxidada, GSSG (Figueiredo-Pereira, Yakushin, and Cohen 1998; Ikediobi et al. 2004; Karmakar et al. 1999). Nuestros resultados mostraron que mientras que el glutatión oxidado se mantiene incrementado (**Tabla 1**), la concentración de GSH total se incrementa como respuesta a estos estímulos oxidantes. Además, el incremento del ratio GSSG/GSH indicó un ambiente celular prooxidante para los grupos expuestos al metal. Es interesante que en el grupo insulina no presente este incremento de GSH total a pesar de que disminuye la disponibilidad de GSH por el incremento de los niveles de GSSG, observándose también un ambiente fuertemente prooxidante.

Además, la maquinaria antioxidante enzimática coordinada también juega un papel importante durante el mantenimiento de los procesos de estrés oxidativo. La mayor parte del sistema enzimático antioxidante no mostró cambios estadísticamente significativos en nuestros grupos experimentales, por lo que la *novo* síntesis de GSH y la subsecuente formación del complejo Cd-GSH, amortigua

la actividad de estas enzimas, a pesar de que se ha reportado que el Cd tienen la capacidad de inhibir la actividad de la maquinaria enzimática (Galażyn-Sidorczuk et al. 2012; Ulusu et al. 2003). Cabe destacar que el incremento en la actividad de SOD sugiere una mayor producción de  $H_2O_2$ , el cual puede ser rápidamente catabolizado mediante la actividad de GPX y la CAT, sin embargo, al no existir cambios estadísticamente significativos, se puede hipotetizar en su desvío a la generación de especies reactivas de oxígeno.

Las ROS a menudo están implicadas en la toxicología de Cd. Se ha sugerido que los mecanismos de toxicidad involucran el agotamiento del glutatión y los grupos sulfhidrilo, inactivación de enzimas antioxidantes dependientes de Zn, modificación de la cadena transportadora de electrones y en la actividad de NADPH oxidasas. Lo que resulta en una mayor producción de ROS, como ion superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos. Las ROS a su vez pueden generar lipoperoxidación lipídica (LPO) (J. Liu, Qu, and Kadiiska 2009). Como evidenciamos se presenta un incremento significativo de ROS en nuestros grupos experimentales expuestos a Cd, sin embargo, solamente se incrementaron significativamente en el grupo 32 ppm (**Fig.12**).

Aunque el destino final de las ROS puede ser la LPO, se sabe que también actúan como segundos mensajeros que activan diferentes vías de señalización, por lo que podemos asociar su incremento a la exposición al metal, con el subsecuente desarrollo de resistencia a insulina. Es probable que los mecanismos precisos varíen de tejido a tejido, no obstante, se ha informado que el incremento de ROS impulsa a JNK y p38, contribuyendo al desarrollo de resistencia a la insulina, siendo probablemente el mecanismo de la inhibición del IRS el vínculo entre las ROS y la resistencia a insulina. Mecanismos similares a la activación de MAPK por ROS, se han descrito para las vías de señalización durante procesos inflamación (Nathan and Ding 2010).

La inflamación se caracteriza por una serie de eventos complejos que pueden ser causados por diferentes tipos de lesión tisular. Bajo condiciones normales, la respuesta inflamatoria desaparece cuando se elimina el estímulo, y luego se

establece un estado en equilibrio altamente activo y bien regulado (inflamación aguda). Sin embargo, durante un estímulo persistente de baja intensidad, se genera una respuesta prolongada y excesiva en los tejidos diana. En la cual la inflamación no logra un estado estable de reparación, manteniendo una inflamación continúa, crónica y de bajo grado (Nathan and Ding 2010). Mientras que la respuesta inflamatoria característica de las lesiones agudas disminuye en unos días, la inflamación crónica se caracteriza por niveles elevados de citoquinas proinflamatorias en respuesta a factores de estrés fisiológicos y ambientales.

En este sentido, evidenciamos que la exposición a Cd incrementó las principales citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) (**Fig. 13**). Por lo que observamos una inducción de inflamación sistémica, probablemente no resolutive, en la que se incrementan tanto citocinas proinflamatorias como antiinflamatorias (IL-10 y IL-1ra). El incremento sérico de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , condiciona la activación de NF- $\kappa$ B, que tiene como principal función la regulación de la respuesta inflamatoria, además de mediar la inducción de genes proinflamatorios como: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10 entre otros (T. Liu et al. 2017), lo que establece una inflamación constante. No obstante, los resultados de la cuantificación de la expresión de NF- $\kappa$ B (**Fig.14**), muestran que si bien existe un incremento ante la exposición de ambas concentraciones de Cd (**Fig.14B**), éste es citoplasmático y no se observa translocación nuclear.

Los resultados obtenidos podrían explicarse con relación a la respuesta antiinflamatoria (AIR), la cual está controlada en gran medida por IL-10. El efecto antiinflamatorio de la IL-10 en macrófagos se manifiesta como la inhibición transcripcional de aproximadamente el 20% de los genes inducidos por factores inflamatorios (Hutchins, Diez, and Miranda-Saavedra 2013). Esta dinámica de la homeostasis inflamatoria fue evidenciada por la presencia de una inflamación crónica no resolutive por exposición a Cd, explicando el incremento de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) y al mismo tiempo incremento de IL-10.

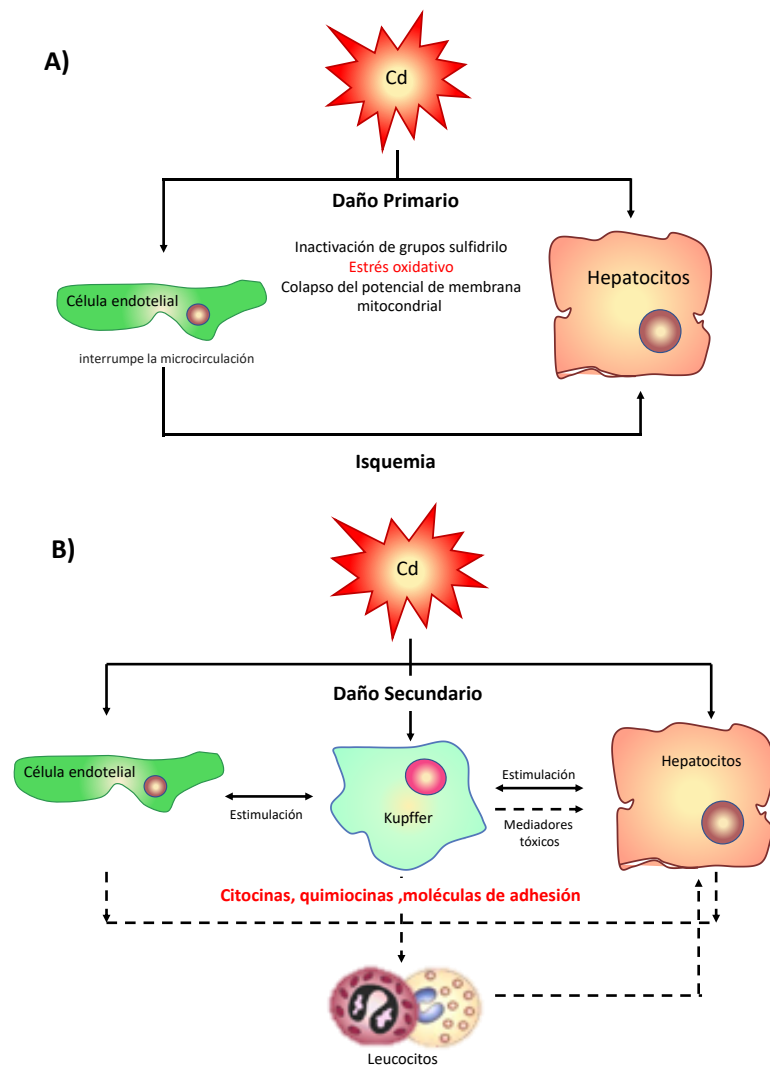
Además de evidenciar el incremento sérico de biomarcadores de inflamación, también demostramos el desarrollo de estos a nivel hepático (**Fig.15**). En hígado,

se incrementó la concentración de IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1ra, TGF- $\beta$  después de la exposición a Cd. En este sentido la mayoría de los estudios *in vitro*, demuestran que Cd estimula a líneas celulares de macrófagos y hepatocitos incrementando sus niveles de TNF- $\alpha$ , sin embargo, en estos estudios el estímulo es agudo, y el incremento se observa alrededor de las 24 horas (Arroyo et al. 2013; Olszowski et al. 2012). También, se ha propuesto que la hepatotoxicidad por Cd implica una isquemia que lesiona a las células endoteliales estableciendo un proceso inflamatorio el cual activa a las células Kupffer y la infiltración de neutrófilos. Las células de Kupffer que endocitan el complejo Cd-MT lo pueden degradar, liberando al metal, el cual puede ser recapturado por los hepatocitos. Alternativamente, el Cd puede activar en las células de Kupffer la liberación de diferentes interleucinas inflamatorias, que estimulan la producción de ROS y MT en los hepatocitos (Klaassen et al., 2009; J. Liu et al., 2009; Sabolić, Breljak, Škarica, & Herak-Kramberger, 2010). Asimismo, se ha evidenciado que los mediadores inflamatorios aumentan la expresión de moléculas de adhesión, iniciándose una cascada de respuestas celulares y humorales que conducen a inflamación y daño hepático secundario al daño que genera propiamente la exposición a Cd (Olszowski et al. 2012).

Tanto TNF- $\alpha$  como IL-1 $\beta$  estimulan la producción de moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intercelular 1 (IMAC-1), la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1), E-selectina, P-Selectina,  $\beta$ 2-integrina Mac-1 en el hígado, que reclutan, la adhieren y activan células inflamatorias circulantes (Arroyo et al. 2013; Olszowski et al. 2012). Estas se acumulan en los sinusoides y se adhieren al endotelio, siendo mediado por E-selectin, Mac-1 e ICAM-1. Todo lo anterior como un mecanismo para propiciar un ambiente inflamatorio autorregulado y estimulado de manera constante, crónica y de baja intensidad por Cd. A largo plazo, esta respuesta en tejidos diana genera un estado estable de reparación con inflamación no resolutive.

Aunque existen algunos otros mecanismos de daño hepático por la exposición a Cd, parece ser el estrés oxidativo el “daño primario” a nivel hepático

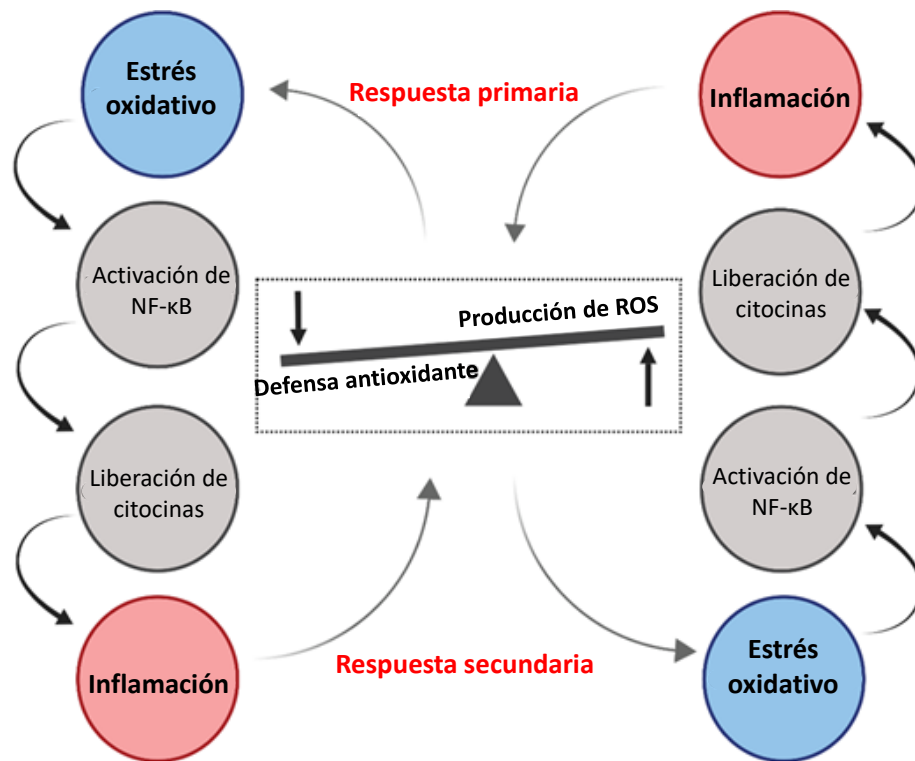
como respuesta a la inactivación de grupos sulfhidrilo (MT y GSH), el daño a nivel mitocondrial y la inactivación de algunas enzimas antioxidantes. Seguido de un “daño secundario”, iniciado por la activación de células de Kupffer, ya sea directa o indirectamente a través de células endoteliales y parenquimatosas lesionadas, las células activadas liberan mediadores (por ejemplo, citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión) que de manera redundante inducen una cascada de respuestas celular y humoral que involucran a los hepatocitos, células de Kupffer, células endoteliales y leucocitos circulantes, generando un ambiente proinflamatorio (Das and Al-Naemi 2019; Rikans and Yamano 2000). Estos mecanismos se detallan en la **Figura 35**.



**FIGURA 35. Mecanismo propuesto de hepatotoxicidad a inducida por cadmio.** A) La lesión primaria resulta de la unión del Cd a grupos sulfhidrilo en proteínas críticas, produciendo estrés oxidativo y colapso del potencial de la membrana mitocondrial. El daño al endotelio

*vascular interrumpe la microcirculación y la isquemia resultante causa daño a los hepatocitos. B) La lesión secundaria se inicia por la activación de Células de Kupffer, ya sea directa o indirectamente a través de células endoteliales y parenquimatosas lesionadas. Las células de Kupffer activadas liberan mediadores (por ejemplo, citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión) que inducen una cascada de respuestas celulares y humorales que involucran a los hepatocitos, Células de Kupffer, células endoteliales y leucocitos circulantes. El daño secundario es causado por mediadores citotóxicos (p. Ej., Oxígeno reactivo o nitrógeno especies, lípidos bioactivos, enzimas hidrolíticas) producidas principalmente por células de Kupffer y leucocitos que han sido reclutados en el sitio de lesión. Imagen tomada y modificada de Rikans and Yamano 2000.*

A pesar de que la bibliografía concuerda que es el estrés oxidativo es el primer daño en la lesión inducida por Cd, la inflamación también está estrechamente relacionada en el curso temporal de la fisiopatología, ya que uno puede ser inducido por el otro, y viceversa. Asimismo, las ROS generadas indirectamente por las células inflamatorias (además del estrés oxidativo directo) también pueden inducir y amplificar cascadas de señalización que aumentan la expresión de genes proinflamatorios. La activación inducida por ROS de enzimas que facilitan la fosforilación conduce a la activación de factores de transcripción, que a su vez desencadenan la generación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (Das and Al-Naemi 2019; Rikans and Yamano 2000), el resumen de estos mecanismos se presentan en la **Figura 36**. Por tanto, tanto el estrés oxidativo como la inflamación están implicados simultáneamente en la patogénesis de la toxicidad inducida por Cd.



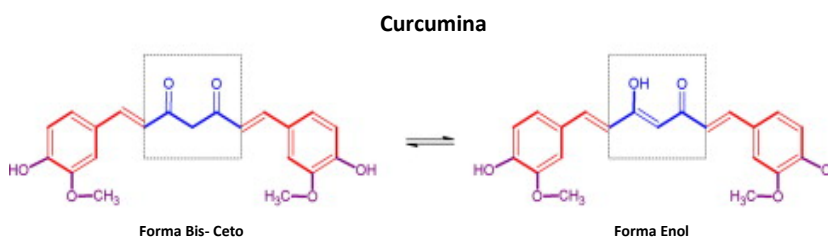
**FIGURA 36. Interdependencia del estrés oxidativo y la inflamación inducida por cadmio.** La respuesta primaria a la presencia de cadmio da como resultado estrés oxidativo o inflamación que puede conducir a la otra como respuesta secundaria. Los eventos clave incluyen defensa antioxidante debilitada, producción elevada de ROS, NF-κB activado y liberación de citocinas. (Tomado y modificado de Das and Al-Naemi 2019).

Teniendo en cuenta todos estos resultados, evidenciamos que la exposición de Cd induce resistencia a insulina, modifica la vía de señalización de insulina, incrementa p38 y JNK cinasas que redundan sobre la resistencia a la hormona. Al mismo tiempo, la exposición a cadmio genera estrés oxidativo e inflamación, por lo que el uso de un compuesto antioxidante y de uno antiinflamatorio, son herramientas que nos ayudan a dilucidar los mecanismos involucrados, la temporalidad, y la importancia de estos en el desarrollo de resistencia a insulina.

### Efecto de la Curcumina sobre el estrés oxidativo y la resistencia a insulina.

La curcumina es un compuesto polifenol hidrofóbico que se concentra naturalmente en el rizoma de la hierba *Curcuma longa*, comúnmente conocida como cúrcuma. La curcumina es una  $\beta$ -dicetona bis- $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada y la fracción  $\beta$ -diceto

presenta a una tautomería ceto-enólica (**Fig. 37**) (García-Niño and Pedraza-Chaverrí 2014). La curcumina puede participar en muchas reacciones redox debido a la presencia de un doble enlace conjugado en su estructura química. Por lo que la molécula puede donar un electrón y estabilizar su estructura, de esta forma actúa como un quelante directo de ROS, este efecto es descrito contra una variedad importante de ROS, incluyendo  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y  $HO\cdot$  (García-Niño and Pedraza-Chaverrí 2014).



**FIGURA 37.** Tautomerismo ceto-enol de curcumina.

Después de haber evaluado la curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones de curcumina. Se usó como una herramienta metodológica como antioxidante, y para evaluar su efecto sobre el desarrollo de resistencia a insulina. Anteriormente se ha discutido que el Cd no posee química redox, pero indirectamente puede inducir estrés oxidativo (López et al. 2006). Tras la administración de curcumina se redujo de manera significativa la concentración de ROS y LPO, exhibiendo de esta manera su potente papel antioxidante (**Tabla 2**).

Además, la actividad de la defensa antioxidante enzimática (CAT, SOD, GT, GR y Gpx) se reguló de manera negativa en los grupos experimentales tras el uso de la curcumina (**Tabla 2**). En la bibliografía se establece que tras administrar dosis de 50 y 250 mg/kg por 5 días, disminuyen a nivel hepático, las principales enzimas antioxidantes (Eybl, Kotyzová, and Bludovská 2004; Mohajeri, Rezaee, and Sahebkar 2017; Na Ayutthaya and Tarasub 2008). Además, con la administración de estas dosis, la concentración de GSH se incrementa, mientras que, el GSSG disminuye, y el índice redox mejora al mismo tiempo que el ambiente prooxidante exhibido por la exposición a Cd. Esta evidencia puede ser la suma de los diversos

mecanismos celulares generados por la curcumina, tales como su actividad de scavenger de ROS, quelante de Cd e inductor secundario de antioxidantes.

Nuestra evidencia muestra que, al disminuir el estrés oxidativo también disminuye la concentración de las MAPKs en todos los grupos experimentales. Esta reducción fue mayor para p38 que para JNK (**Fig. 20**). Se ha descrito que, si bien la activación de p38 y JNK se da por estímulos proinflamatorios, p38 además es estimulada por ROS (Arthur and Ley 2013; Kyriakis and Avruch 2012). Debido a que el incremento de las ROS desencadena la disociación de tiorredoxina (TRX) del complejo TRX-ASK1, que promueve la autofosforilación de ASK1 y su activación, así ASK1 forma un alto complejo con otras proteínas, incluidas TRAF2 y TRAF6, que posteriormente activa p38. Con relación a lo anterior, podemos sugerir que al reducir de manera importante las ROS, se reduce en mayor proporción p38 y no JNK.

Al reducir el estrés oxidativo, la fosforilación del RI no presentó cambios, no obstante, la expresión de la fosforilación en serina de IRS se redujo de manera significativa acompañado de la expresión de mTOR y S6K1 (**Fig. 21, 22, 23**). Lo que indicaría que, al mejorar el ambiente redox se mejora la autorregulación negativa de la vía de señalización de insulina, y por ende, la resistencia a la hormona. La fosforilación de IRS-Ser se genera principalmente por JNK y p38, por lo que la reducción de IRS-Ser después de disminuir el estrés oxidativo podría deberse en gran medida a la reducción de estas cinasas, ya que diversos estudios también asocian la reducción de estas MAPK con la mejora de la sensibilidad a insulina, aunado a la disminución de marcadores de estrés oxidativo (Panzhinskiy et al. 2014; Maithilikarpagaselvi et al. 2016; Ghorbani, Hekmatdoost, and Mirmiran 2014; Zaheri et al. 2019).

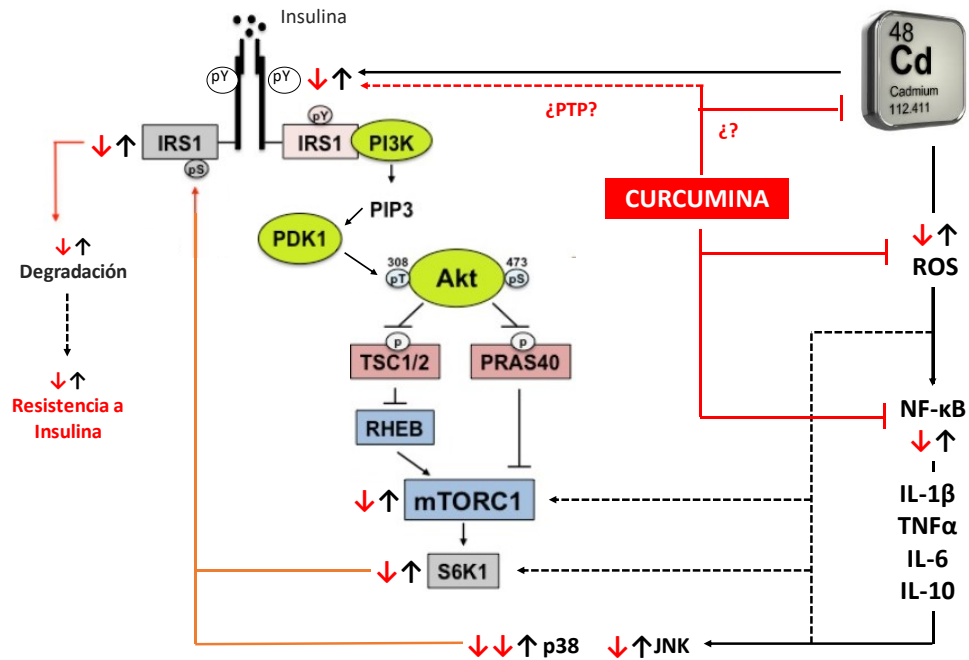
Conjuntamente con la mejora en la sensibilidad a insulina y la reducción de la resistencia, disminuye la glucosa en plasma a través de varios mecanismos que incluyen la activación de las enzimas glucolíticas, el aumento de la actividad de la glucoquinasa hepática (GK), el contenido de glucógeno, la regulación negativa de las enzimas gluconeogénicas mediante la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa

(G6Pase) (Jiménez-Osorio, Monroy, and Alavez 2016; Poolsup et al. 2019). Sin embargo, a pesar de la reducción en el estrés oxidativo y mejora en la señalización de insulina, no se logró mejorar la tolerancia a glucosa en los grupos de exposición a Cd (**Fig. 24**). Es importante tener en cuenta que la homeostasis de la glucosa no siempre se logra en este tipo de modelos experimentales después del tratamiento con antioxidantes (Jiménez-Osorio, Monroy, and Alavez 2016). Por ello es importante considerar el tiempo de administración, las dosis y el vehículo empleado que son factores críticos para lograr un efecto significativo sobre concentración plasmática de glucosa. A pesar de esto, existen estudios clínicos y experimentales que evidencian una asociación directa entre la reducción de ROS y la mejora en la tolerancia a glucosa, así como la reducción de hiperinsulinemia (Chuengsamarn et al. 2012; Jiménez-Osorio, Monroy, and Alavez 2016; Maithilikarpagaselvi et al. 2016; Poolsup et al. 2019; Thota et al. 2018; Zaheri et al. 2019).

Adicionalmente, demostramos que al disminuir el estrés oxidativo se logró una reducción en la concentración de insulina posprandial en los grupos expuestos a Cd (**Fig. 25**). Asimismo, los índices de resistencia a insulina (**Fig. 26**) disminuyeron conjuntamente al estrés oxidativo observándose mejoras importantes en el índice HOMA-IR y LIRI. Dicho efecto ya se ha demostrado en la literatura tanto en ensayos experimentales de diabetes genética, por consumo de fructuosa y por aplicación de STZ, así como ensayos clínicos (Chuengsamarn et al. 2012; Jiménez-Osorio, Monroy, and Alavez 2016; Maithilikarpagaselvi et al. 2016; Poolsup et al. 2019; Thota et al. 2018; Zaheri et al. 2019).

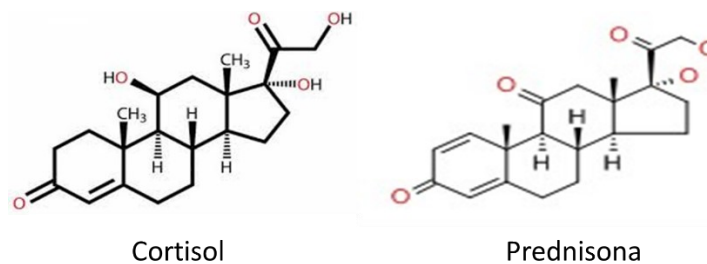
A pesar de que, ya se ha evidenciado a la curcumina como antidiabético, en nuestro conocimiento no existe evidencia bibliográfica que evalúe su efecto en relación a la toxicidad del Cd y el desarrollo de resistencia a insulina por exposición al metal. Por lo que, en base a nuestros resultados la curcumina, puede mejorar la resistencia a insulina a través de tres mecanismos diferentes; **(i)** mejorar la vía de señalización de la insulina, **(ii)** inhibir la inflamación e **(iii)** inhibir el estrés oxidativo. Como se ha expuesto, después de la intoxicación con Cd se induce primariamente estrés oxidativo y secundariamente inflamación vinculados entre sí, por lo que al hacer uso de curcumina como antioxidante y por su mecanismo de acción podemos

pensar que se elimina el inductor de daño primario (estrés oxidativo) y al disminuir el estrés se disminuye la inflamación (datos no mostrados), acompañado de una reducción en las MAPK (principalmente p38) y mejorando de la señalización de insulina, y por consiguiente se evita el desarrollo de resistencia a insulina.



**FIGURA 38.** Posible mecanismo de acción de los efectos celulares por la exposición a cadmio (flechas negras) y el posible efecto del tratamiento de curcumina (Flechas rojas), sobre vía de señalización de insulina. Tomado y modificado de Yoon, 2017.

Efecto de la Prednisona sobre la inflamación y la resistencia a insulina.



**FIGURA 39.** Comparación de la estructura del cortisol el corticoesteroide endógeno más importante con prednisona un antiinflamatorio esteroideo.

El cortisol y los corticosteroides actúan mediante su unión al receptor de glucocorticoides intracelular (GR), que luego se transloca al núcleo celular donde el complejo receptor-ligando se une a elementos específicos de respuesta a glucocorticoides en el ADN, activando genes que median la respuesta principalmente antiinflamatoria. Los efectos de los corticosteroides sobre la inflamación y el sistema inmune se atribuyen a múltiples genes y vías de señalización. Las potentes cualidades antiinflamatorias e inmunosupresoras de los corticosteroides los han convertido en agentes importantes en la terapia de diversas enfermedades (Ehrchen, Roth, and Barczyk-Kahlert 2019). Es por ello que en el presente trabajo utilizamos a la Prednisona como herramienta metodológica, y no como tratamiento, para dilucidar el papel que juega la inflamación sobre el desarrollo de resistencia a insulina por exposición a Cd. La **figura 39**, representa la estructura molecular de la prednisona comparada con el cortisol.

Es importante mencionar que, la prednisona se convierte en prednisolona en el hígado, esta última es la forma activa del fármaco, sin embargo, sigue un mecanismo de acción común para todos los glucocorticoides. Los glucocorticoides atraviesan la membrana plasmática para formar un complejo con el GR citosólico y ser transportado al núcleo en un proceso estrictamente regulado (Cruz-Topete and Cidlowski 2014; Ronchetti et al. 2018).

Tras la formación del complejo GC-GR, este se transloca al núcleo para permitir o reprimir la transcripción de genes diana por varios mecanismos:

1. La unión a elementos sensibles a glucocorticoides (GRE) positivos da como resultado una mayor transcripción génica, en un proceso conocido como "transactivación". Mientras que la unión a GRE negativos da como resultado la supresión de la transcripción del gen diana.
2. El complejo monomérico GC/GR puede inhibir la transcripción de genes independientemente de la unión del ADN mediante la interacción directa con otros factores de transcripción como NF- $\kappa$ B/AP-1 o co-activadores nucleares.
3. El complejo GC/GR puede interactuar con el ADN (uniéndose a un GRE) simultáneamente con otro factor de transcripción, que se conoce como

regulación compuesta que puede tener efectos de activación o represión (Cruz-Topete and Cidlowski 2014; Ronchetti et al. 2018).

En el primer mecanismo la unión de GR activado a GRE positivo da como resultado la activación génica de IL-10, IL-1 $\alpha$ , MKP-1, entre otros y reprimiendo la transcripción uniéndose a GRE negativos (nGRE) resultando en la represión de genes proinflamatorios como NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, IL-8, CXCL-1, COX-2, MCP-1, entre otros (Ronchetti et al. 2018).

En base a esto, evidenciamos que la administración de Prednisona muestra una incuestionable acción antiinflamatoria que se refleja en los resultados sérico, al reducir la concentración de las principales citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) asociado al incremento de la citocina antiinflamatoria (IL-1 $\alpha$ ) (**Fig. 29**). Estos resultados sugieren que la Prednisona logra disminuir la inflamación sistémica generada por el Cd. Los estudios clínicos para evaluar los efectos antiinflamatorios de la Prednisona son limitados y se enfocan principalmente a enfermedades como asma, artritis, lepra y algunas otras enfermedades inflamatorias crónicas, en donde el uso de este glucocorticoide tiene buen efecto antiinflamatorio, disminuyendo principalmente la concentración de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , además de incrementar la concentración de IL-10 y TGF- $\beta$  sérico, (Andersson et al. 2005; Holland and Taylor 1991; Negera et al. 2018). A pesar del buen uso en la práctica clínica de la Prednisona, existen muy pocas evidencias que apuntan que este fármaco tiene un buen efecto para disminuir la inflamación generada por la exposición a Cd (Bolognin et al. 2009).

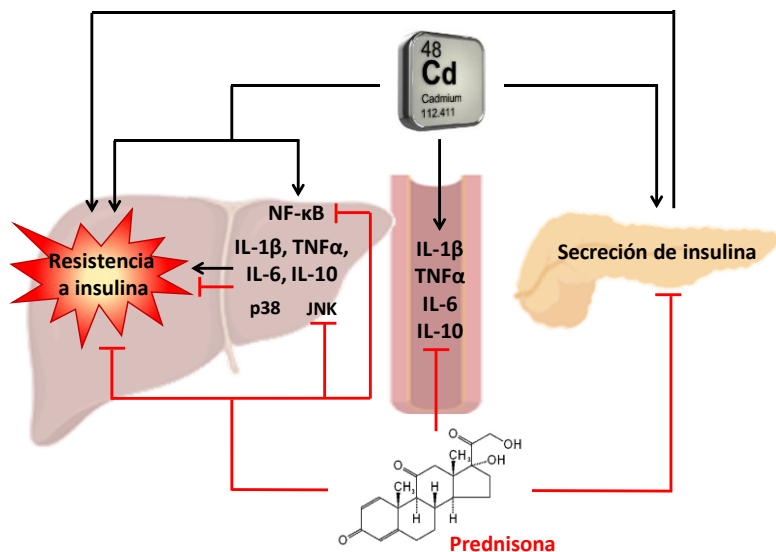
También evidenciamos que, tras el uso de la Prednisona la inflamación hepática se redujo notablemente, disminuyendo la expresión de NF- $\kappa$ B en los grupos experimentales, principalmente en los expuestos a Cd (**Fig. 31**). La inhibición de NF- $\kappa$ B se da por la interacción del glucocorticoide con la molécula p53, que reprime a NF- $\kappa$ B vía GR, como un segundo mecanismo de acción genómico de los glucocorticoides (Cruz-Topete and Cidlowski 2014; Ronchetti et al. 2018). Aunado a esto, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL6 también disminuyeron considerablemente en todos los grupos experimentales. Respecto a las citocinas antiinflamatorias, IL-10 se mantuvo

incrementada en todos los grupos, pero se redujo en el grupo 32 ppm, mismo efecto mostrado en el caso del IL-1ar, además contrariamente a lo reportado en la literatura, el tratamiento con el glucocorticoide redujo la concentración de TGF- $\beta$  en todos los grupos experimentales (**Fig. 31**). Como ya hemos mencionado no existen trabajos con los que se puedan contrastar nuestros resultados con relación al efecto antiinflamatorio de la Prednisona tras la exposición a Cd, sin embargo, algunos reportes indican una acción protectora del fármaco ante la toxicidad suprarrenal generada por el metal, sin que se explique el mecanismo por el cual se genera la protección de la glándula (Selyes, Lorencz, and Serényi 1986).

Aunque la mayoría de los mecanismos genómicos implicados en la diafonía entre las vías de señalización de los glucocorticoides y las MAPK son bien conocidos, los mecanismos de interferencia con la señalización MAPK son menos claros y no implican síntesis de proteínas, sino que están respaldados por la interacción directa de GR con algunos componentes de las vías de señalización de las MAPK modulando sus vías de transducción de señales. Las acciones no genómicas por lo tanto son independientes del receptor (intercalación inespecífica en membranas plasmáticas) o dependientes del receptor (mediado por el GR citosólico o por un GR unido a la membrana (mGR) (Ayroldi et al. 2012; Cruz-Topete and Cidlowski 2014; Czock et al. 2005). Este proceso ocurre a través de interacciones de GR unidas a membrana o GR citosólicas con cinasas, tales como ERK, JNK, y p38, pero hasta la fecha, el mecanismo detallado y las implicaciones biológicas de los efectos no genómicos de GR no se han dilucidado completamente (Ayroldi et al. 2012; Cruz-Topete and Cidlowski 2014; Czock et al. 2005). Además del mecanismo no genómico, es claro que al disminuir las citocinas proinflamatorias se disminuyen las vías de señalización que involucran a las MAPK y por tanto una disminución de estas, sin embargo, independientemente del mecanismo por el cual los GC regulan a las MAPK, evidenciamos que al disminuir la inflamación en nuestros modelos experimentales disminuye tanto p38 como JNK, pero de manera más evidente la concentración de JNK en los grupos expuestos a Cd (**Fig. 32**).

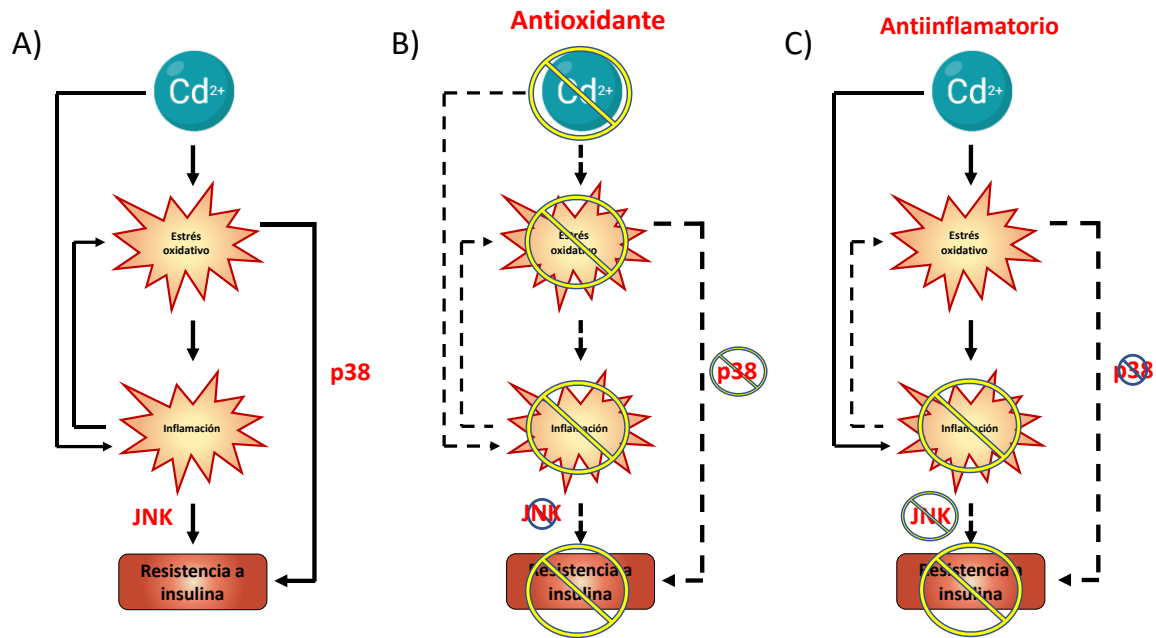
Tomando en cuenta la importancia que tienen p38 y JNK para el desarrollo de resistencia a insulina, evaluamos la tolerancia a glucosa y su respuesta insulínica en los grupos experimentales después de la administración de Prednisona. Evidenciamos que al disminuir la inflamación se incrementó el área bajo la curva de la tolerancia a glucosa en el grupo control y el grupo insulina; pero se disminuye en el grupo 32 ppm (**Fig. 33A-B**). Lo observado está muy bien descrito en la literatura y no son atribuibles al descenso de la inflamación, sino como efectos metabólicos generados por los glucocorticoides. Debido a que, los glucocorticoides promueven la gluconeogénesis hepática y reducen la captación de glucosa en el músculo esquelético y el tejido adiposo blanco. Estos efectos son críticos para la adaptación metabólica durante el estrés, como el ayuno y la inflamación, cuando la glucosa en plasma necesita ser preservada, ya que es la fuente primaria de energía para diversos tejidos (Ronchetti et al. 2018; Willms, Schumm-Draeger, and Siegmund 2016).

Al mismo tiempo, tras el uso del glucocorticoide disminuyó la respuesta de insulina durante la PTOG, en ambos grupos experimentales expuestos a Cd (**Fig. 33C-D**). En este sentido la insulina, ejerce efectos fisiológicamente opuestos, al inhibir la gluconeogénesis hepática y promover la utilización de glucosa por el músculo esquelético y tejido adiposo. Por lo tanto, los glucocorticoides antagonizan las acciones de insulina. Estos eventos son críticos durante el estrés, que a corto plazo no afecta o incluso mejora la tolerancia a la glucosa, como se puede observar principalmente en el grupo 32 ppm (Kuo et al. 2015; Willms, Schumm-Draeger, and Siegmund 2016).



**Figura 40.** Posible mecanismo de acción de los efectos celulares por la exposición a cadmio (flechas negras) y el posible efecto del tratamiento de prednisona (Flechas rojas), sobre la inflamación y el desarrollo de resistencia a insulina.

Por último, evidenciamos que, al regular el ambiente proinflamatorio, tanto el índice HOMA-IR como el LIRI disminuyeron significativamente en los grupos expuestos a Cd (**Fig. 34**), lo cual proporciona la evidencia de que la inflamación juega un papel crítico en el desarrollo de resistencia a insulina. Ya que, al regular la inflamación, disminuyen las MAPKs (principalmente JNK) y por consiguiente la resistencia a insulina. Nuestros resultados sugieren fuertemente que dicha mejora está vinculada a la regulación de JNK y consiguiente fosforilación de IRS, lo que trae consigo la mejora a nivel celular de la señalización de insulina, efectos que se resumen en la **figura 40**. A pesar de que ya se ha descrito la interrelación que existe entre la inflamación y el estrés oxidativo, el uso del glucocorticoide mejoró la inflamación por la exposición a Cd, pero no tiene efecto significativo sobre el estrés oxidativo (datos no mostrados), lo que indica que el mayor efecto causal en el desarrollo de resistencia a insulina es la inflamación, ya sea directa o indirectamente (estrés oxidativo) por la exposición al metal (**Fig. 41**).



**Figura 41. Resumen de los eventos implicados en el desarrollo de resistencia a insulina por exposición a cadmio.** A) El cadmio induce de manera primaria estrés oxidativo y de manera secundaria inflamación, pero ambos tienen una interrelación entre sí lo que induce resistencia a insulina. B) Al disminuir el estrés oxidativo, se disminuye también la inflamación y por tanto la resistencia a insulina. C) Al disminuir la inflamación no se presenta efecto sobre el estrés oxidativo, pero sí sobre la resistencia a insulina.

## Conclusiones:

- La exposición a cadmio induce estrés oxidativo, inflamación, cambios en la vía de señalización a insulina, lo que genera resistencia hepática a insulina.
- La resistencia hepática a insulina inducida por la exposición a cadmio se genera tanto por la concentración LOAEL como NOAEL.
- La resistencia hepática a insulina inducida por la exposición a cadmio es mediada principalmente por las MAPK's p38 y JNK.
- Al disminuir el estrés oxidativo, p38 se regula negativamente, lo que disminuye la inflamación y la resistencia hepática a insulina.
- Al disminuir la inflamación, JNK se regula negativamente, mejorando la señalización de insulina y se reduce la resistencia hepática a insulina.
- Tanto la inflamación como el estrés oxidativo por exposición a cadmio tienen un rol central en el desarrollo de resistencia hepática a insulina, sin embargo, la inflamación tiene mayor relevancia en el desarrollo de esta.

## Bibliografía

- Aguirre, Vincent et al. 2002. "Phosphorylation of Ser307 in Insulin Receptor Substrate-1 Blocks Interactions with the Insulin Receptor and Inhibits Insulin Action." *The Journal of biological chemistry* 277(2): 1531–37. <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M101521200> (April 8, 2019).
- Andersson, Anna K. et al. 2005. "Effects of Prednisolone Treatment on Cytokine Expression in Patients with Leprosy Type 1 Reactions." *Infection and Immunity* 73(6): 3725–33.
- Arroyo, Verónica Souza et al. 2013. "Liver and Cadmium Toxicity." *Journal of Drug Metabolism & Toxicology* 03(06). <https://www.omicsonline.org/liver-and-cadmium-toxicity-2157-7609.S5-001.php?aid=3686>.
- Arthur, J. Simon C., and Steven C. Ley. 2013. "Mitogen-Activated Protein Kinases in Innate Immunity." *Nature Reviews Immunology* 13(9): 679–92.
- ATSDR. 2021. "Agency for Toxic Substance and Disease Registry. Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA." <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=15> (April 8, 2019).
- Ayroldi, Emira et al. 2012. "Mechanisms of the Anti-inflammatory Effects of Glucocorticoids: Genomic and Nongenomic Interference with MAPK Signaling Pathways." *The FASEB Journal* 26(12): 4805–20. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.12-216382> (May 11, 2020).
- Blaser, Heiko, Catherine Dostert, Tak W Mak, and Dirk Brenner. 2016. "TNF and ROS Crosstalk in Inflammation." <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.12.002> (November 21, 2019).
- Bolognin, M. et al. 2009. "Characterisation of the Acute and Reversible Airway Inflammation Induced by Cadmium Chloride Inhalation in Healthy Dogs and Evaluation of the Effects of Salbutamol and Prednisolone." *Veterinary Journal* 179(3): 443–50.
- Boucher, J., A. Kleinridders, and C. R. Kahn. 2014. "Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(1): a009191–a009191. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384568> (April 10, 2019).
- Brown, Michael S, and Joseph L Goldstein. 2008. "Selective versus Total Insulin Resistance: A Pathogenic Paradox." *Cell metabolism* 7(2): 95–96. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413107003828> (April 9, 2019).
- Buha, Aleksandra et al. 2020. "Emerging Links between Cadmium Exposure and Insulin Resistance: Human, Animal, and Cell Study Data." *Toxics* 8(3): 63. [www.mdpi.com/journal/toxics](http://www.mdpi.com/journal/toxics) (January 5, 2021).
- Cacho, J et al. 2008. "Validation of Simple Indexes to Assess Insulin Sensitivity during Pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley Rats." *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 295(5): E1269–76. <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.90207.2008> (April 8, 2019).
- Chao, C C et al. 1992. "Activated Microglia Mediate Neuronal Cell Injury via a Nitric Oxide Mechanism." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 149(8): 2736–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1383325> (April 8, 2019).
- Chapatwala, K D, M Hobson, D Desai, and B Rajanna. 1982. "Effect of Cadmium on Hepatic and Renal Gluconeogenic Enzymes in Female Rats." *Toxicology letters* 12(1): 27–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7112599> (April 15, 2019).
- Chapatwala, K D, B Rajanna, and D Desai. 1980. "Cadmium Induced Changes in Gluconeogenic Enzymes in Rat Kidney and Liver." *Drug and chemical toxicology* 3(4): 407–20. <http://www.informapharmascience.com/doi/abs/10.3109/01480548009030129> (April 15, 2019).

- Chen, Long, Lei Liu, and Shile Huang. 2008. "Cadmium Activates the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway via Induction of Reactive Oxygen Species and Inhibition of Protein Phosphatases 2A and 5." *Free Radical Biology and Medicine* 45(7): 1035–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703135> (April 12, 2019).
- Chuengsamarn, Somlak et al. 2012. "Curcumin Extract for Prevention of Type 2 Diabetes." *Diabetes Care* 35(11): 2121–27.
- Cone, Roger D. 2005. "Anatomy and Regulation of the Central Melanocortin System." *Nature Neuroscience* 8(5): 571–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15856065> (April 8, 2019).
- Courtney, C. Hamish, and Jerrold M. Olefsky. 2007. "Insulin Resistance." In *Mechanisms of Insulin Action: Medical Intelligence Unit*, Springer New York, 185–209. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507839/> (January 4, 2021).
- Cruz-Topete, Diana, and John A. Cidlowski. 2014. "One Hormone, Two Actions: Anti- And pro-Inflammatory Effects of Glucocorticoids." *NeuroImmunoModulation* 22(0): 20–32.
- Czock, David, Frieder Keller, Franz Maximilian Rasche, and Ulla Häussler. 2005. "Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Systemically Administered Glucocorticoids." *Clinical Pharmacokinetics* 44(1): 61–98.
- Das, Sandra Concepcion, and Hamda A. Al-Naemi. 2019. "Cadmium Toxicity: Oxidative Stress, Inflammation and Tissue Injury." *Occupational Diseases and Environmental Medicine* 07(04): 144–63. <https://www.scirp.org/journal/odem> (January 6, 2021).
- DeFronzo, R A. 2010. "Insulin Resistance, Lipotoxicity, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis: The Missing Links. The Claude Bernard Lecture 2009." *Diabetologia* 53(7): 1270–87. <http://link.springer.com/10.1007/s00125-010-1684-1> (April 15, 2019).
- Dover, E. Nicole, Naishal Y. Patel, and Miroslav Stýblo. 2018. "Impact of in Vitro Heavy Metal Exposure on Pancreatic  $\beta$ -Cell Function." *Toxicology Letters* 299: 137–44. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427418319465?via%3Dihub> (April 8, 2019).
- Đukić-Čosić, Danijela et al. 2020. "An Overview of Molecular Mechanisms in Cadmium Toxicity." *Current Opinion in Toxicology* 19: 56–62.
- Eaton, D L, and M G Cherian. 1991. "Determination of Metallothionein in Tissues by Cadmium-Hemoglobin Affinity Assay." *Methods in enzymology* 205: 83–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1779827> (April 8, 2019).
- Edwards, Joshua, and Christopher Ackerman. 2016. "A Review of Diabetes Mellitus and Exposure to the Environmental Toxicant Cadmium with an Emphasis on Likely Mechanisms of Action." *Current diabetes reviews* 12(3): 252–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26264451> (April 8, 2019).
- Edwards, Joshua R., and Walter C. Prozialeck. 2009. "Cadmium, Diabetes and Chronic Kidney Disease." *Toxicology and Applied Pharmacology* 238(3): 289–93. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X09001173> (April 15, 2019).
- Ehrchen, Jan M., Johannes Roth, and Katarzyna Barczyk-Kahlert. 2019. "More than Suppression: Glucocorticoid Action on Monocytes and Macrophages." *Frontiers in Immunology* 10(AUG).
- Esterbauer, H, and H Zollner. 1989. "Methods for Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products." *Free radical biology & medicine* 7(2): 197–203. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2680787> (April 8, 2019).
- Eybl, Vladislav, Dana Kotyzová, and Monika Bludovská. 2004. "The Effect of Curcumin on Cadmium-Induced Oxidative Damage and Trace Elements Level in the Liver of Rats and Mice." *Toxicology Letters* 151(1):

- Ficková, M et al. 2003. "Long Lasting Cadmium Intake Is Associated with Reduction of Insulin Receptors in Rat Adipocytes." *Biomaterials: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 16(4): 561–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12779241> (April 15, 2019).
- Figueiredo-Pereira, M E, S Yakushin, and G Cohen. 1998. "Disruption of the Intracellular Sulfhydryl Homeostasis by Cadmium-Induced Oxidative Stress Leads to Protein Thiolation and Ubiquitination in Neuronal Cells." *The Journal of biological chemistry* 273(21): 12703–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9582293> (April 12, 2019).
- Flohé, L, and W A Günzler. 1984. "Assays of Glutathione Peroxidase." *Methods in enzymology* 105: 114–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727659> (April 8, 2019).
- Fougère, Bertrand et al. 2017. "RETRACTED: Chronic Inflammation: Accelerator of Biological Aging." *The Journals of Gerontology: Series A* 72(9): 1218–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28003373> (April 12, 2019).
- Galazyn-Sidorczuk, Malgorzata et al. 2012. "Effect of Zinc Supplementation on Glutathione Peroxidase Activity and Selenium Concentration in the Serum, Liver and Kidney of Rats Chronically Exposed to Cadmium." *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 26(1): 46–52. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0946672X11002677> (April 15, 2019).
- García-Niño, Wylly Ramsés, and José Pedraza-Chaverrí. 2014. "Protective Effect of Curcumin against Heavy Metals-Induced Liver Damage." *Food and Chemical Toxicology* 69: 182–201.
- Genchi, Giuseppe et al. 2020. "The Effects of Cadmium Toxicity." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(11). [/pmc/articles/PMC7312803/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32576931/) (January 4, 2021).
- Gual, Philippe, Yannick Le Marchand-Brustel, and Jean-François Tanti. 2005. "Positive and Negative Regulation of Insulin Signaling through IRS-1 Phosphorylation." *Biochimie* 87(1): 99–109. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908404001981> (April 15, 2019).
- Haas, Joel T et al. 2012. "Hepatic Insulin Signaling Is Required for Obesity-Dependent Expression of SREBP-1c mRNA but Not for Feeding-Dependent Expression." *Cell metabolism* 15(6): 873–84. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413112001957> (April 8, 2019).
- Hall, Catherine, Hongtao Yu, and Eunhee Choi. 2020. "Insulin Receptor Endocytosis in the Pathophysiology of Insulin Resistance." *Experimental and Molecular Medicine* 52(6): 911–20. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32576931/> (January 5, 2021).
- Han, Jin C et al. 2003. "Cadmium Induces Impaired Glucose Tolerance in Rat by Down-Regulating GLUT4 Expression in Adipocytes." *Archives of biochemistry and biophysics* 413(2): 213–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12729619> (April 15, 2019).
- Hectors, T L M et al. 2011. "Environmental Pollutants and Type 2 Diabetes: A Review of Mechanisms That Can Disrupt Beta Cell Function." *Diabetologia* 54(6): 1273–90. <http://link.springer.com/10.1007/s00125-011-2109-5> (April 15, 2019).
- Holland, E G, and A T Taylor. 1991. "Glucocorticoids in Clinical Practice." *The Journal of family practice* 32(5): 512–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2022941> (May 11, 2020).
- Hosseini-Khannazer, Nikoo et al. 2020. "The Effects of Cadmium Exposure in the Induction of Inflammation." *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 42(1): 1–8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31793820/> (January 6, 2021).
- Hotamisligil, G S et al. 1995. "Increased Adipose Tissue Expression of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Human Obesity and Insulin Resistance." *Journal of Clinical Investigation* 95(5): 2409–15.

- <http://www.jci.org/articles/view/117936> (April 8, 2019).
- Hotamisligil, G S, and B M Spiegelman. 1994. "Tumor Necrosis Factor Alpha: A Key Component of the Obesity-Diabetes Link." *Diabetes* 43(11): 1271–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926300> (April 8, 2019).
- Houstis, Nicholas, Evan D. Rosen, and Eric S. Lander. 2006. "Reactive Oxygen Species Have a Causal Role in Multiple Forms of Insulin Resistance." *Nature* 440(7086): 944–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16612386> (April 8, 2019).
- Hutchins, Andrew P, Diego Diez, and Diego Miranda-Saavedra. 2013. "The IL-10/STAT3-Mediated Anti-Inflammatory Response: Recent Developments and Future Challenges." *Briefings in functional genomics* 12(6): 489–98. <https://academic.oup.com/bfg/article-lookup/doi/10.1093/bfgp/elt028> (April 15, 2019).
- Ikedobi, Christopher O et al. 2004. "Response of Antioxidant Enzymes and Redox Metabolites to Cadmium-Induced Oxidative Stress in CRL-1439 Normal Rat Liver Cells." *International journal of molecular medicine* 14(1): 87–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15202021> (April 12, 2019).
- Ingram, Sonia, Marina Diotallevi, and ( Brighton. 2017. *Reactive Oxygen Species: Rapid Fire in Inflammation*. <https://portlandpress.com/biochemist/article-pdf/39/4/30/852022/bio039040030.pdf> (November 27, 2019).
- Jacquet, Adeline et al. 2016. "Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Diabetes: Role of Oxidative Stress and Comparison with Polychlorinated Biphenyls." *Current Drug Targets* 17(12): 1385–1413. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26028051/> (January 6, 2021).
- Järup, Lars, and Agneta Akesson. 2009. "Current Status of Cadmium as an Environmental Health Problem." *Toxicology and applied pharmacology* 238(3): 201–8. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X09001690> (April 8, 2019).
- Jiménez-Osorio, Angélica Saraí, Adriana Monroy, and Silvestre Alavez. 2016. "Curcumin and Insulin Resistance-Molecular Targets and Clinical Evidences." *BioFactors* 42(6): 561–80. <http://doi.wiley.com/10.1002/biof.1302> (November 22, 2019).
- Karmakar, R, A Banerjee, S Datta, and M Chatterjee. 1999. "Influence of Cadmium Intoxication on Hepatic Lipid Peroxidation, Glutathione Level, and Glutathione S-Transferase and Gamma-Glutamyl Transpeptidase Activities: Correlation with Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells." *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* 18(4): 277–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15281238> (April 12, 2019).
- Kato, Hironori, Ryohei Katoh, and Masanori Kitamura. 2013. "Dual Regulation of Cadmium-Induced Apoptosis by MTORC1 through Selective Induction of IRE1 Branches in Unfolded Protein Response." [www.plosone.org](http://www.plosone.org) (April 15, 2019).
- Kim, Francis et al. 2005. "Free Fatty Acid Impairment of Nitric Oxide Production in Endothelial Cells Is Mediated by IKKbeta." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25(5): 989–94. <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.0000160549.60980.a8> (April 8, 2019).
- Klaassen, Curtis D, Jie Liu, and Bhalchandra A Diwan. 2009. "Metallothionein Protection of Cadmium Toxicity." *Toxicology and applied pharmacology* 238(3): 215–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19362100> (April 14, 2019).
- Kuo, Taiyi, Allison McQueen, Tzu Chieh Chen, and Jen Chywan Wang. 2015. "Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 872: 99–126.
- Kyriakis, John M, and Joseph Avruch. 2012. "Mammalian MAPK Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation: A 10-Year Update." *Physiological reviews* 92(2): 689–737.

- <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00028.2011> (April 12, 2019).
- Lee, J., and P. F. Pilch. 1994. "The Insulin Receptor: Structure, Function, and Signaling." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 266(2): C319–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8141246> (April 9, 2019).
- Lei, L J et al. 2019. "[Relationship between Urinary Cadmium and Type 2 Diabetes Mellitus in Adults]." *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi* 40(2): 207–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30744274> (April 8, 2019).
- Leon Chavez, B A et al. 2001. "Regional and Temporal Progression of Reactive Astrocytosis in the Brain of the Myelin Mutant Taiep Rat." *Brain research* 900(1): 152–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325359> (April 8, 2019).
- Liu, Jie, Wei Qu, and Maria B Kadiiska. 2009. "Role of Oxidative Stress in Cadmium Toxicity and Carcinogenesis." *Toxicology and applied pharmacology* 238(3): 209–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236887> (April 14, 2019).
- Liu, Ting, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, and Shao-Cong Sun. 2017. "NF-KB Signaling in Inflammation." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2: 17023. <http://www.nature.com/articles/sigtrans201723> (April 12, 2019).
- Loh, Kim et al. 2009. "Reactive Oxygen Species Enhance Insulin Sensitivity." *Cell Metabolism* 10(4): 260–72.
- López, E et al. 2006. "Cadmium Induces Reactive Oxygen Species Generation and Lipid Peroxidation in Cortical Neurons in Culture." *Free radical biology & medicine* 40(6): 940–51. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584905006738> (April 12, 2019).
- de Luca, Carl, and Jerrold M. Olefsky. 2008. "Inflammation and Insulin Resistance." *FEBS Letters* 582(1): 97–105.
- de Luca, Carl, and Jerrold M Olefsky. 2006. "Stressed out about Obesity and Insulin Resistance." *Nature Medicine* 12(1): 41–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397561> (April 8, 2019).
- Maccarrone, M., and B. Brüne. 2009. "Redox Regulation in Acute and Chronic Inflammation." In *Cell Death and Differentiation*, , 1184–86.
- Maithilikarpagaselvi, Nachimuthu, Magadi Gopalakrishna Sridhar, Rathinam Palamalai Swaminathan, and Bobby Zachariah. 2016. "Curcumin Prevents Inflammatory Response, Oxidative Stress and Insulin Resistance in High Fructose Fed Male Wistar Rats: Potential Role of Serine Kinases." *Chemico-Biological Interactions* 244: 187–94.
- Matović, Vesna, Aleksandra Buha, Zorica Bulat, and Danijela Dukić-Ćosić. 2011. "Cadmium Toxicity Revisited: Focus on Oxidative Stress Induction and Interactions with Zinc and Magnesium." *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 62(1): 65–76.
- Matsuda, M, and R A DeFronzo. 1999. "Insulin Sensitivity Indices Obtained from Oral Glucose Tolerance Testing: Comparison with the Euglycemic Insulin Clamp." *Diabetes care* 22(9): 1462–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480510> (April 9, 2019).
- Merali, Z., and R. L. Singhal. 1980. "Diabetogenic Effects of Chronic Oral Cadmium Administration to Neonatal Rats." *British Journal of Pharmacology* 69(1): 151. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2044180/> (April 15, 2019).
- Mohajeri, Mohammad, Mehdi Rezaee, and Amirhossein Sahebkar. 2017. "Cadmium-Induced Toxicity Is Rescued by Curcumin: A Review." *BioFactors* 43(5): 645–61. <http://doi.wiley.com/10.1002/biof.1376> (November 20, 2019).

- Morgan, Michael J, and Zheng-gang Liu. 2011. "Crosstalk of Reactive Oxygen Species and NF-KB Signaling." *Cell Research* 21(1): 103–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187859> (April 8, 2019).
- El Muayed, Malek et al. 2012. "Accumulation of Cadmium in Insulin-Producing  $\beta$  Cells." *Islets* 4(6): 405–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466887> (April 8, 2019).
- Na Ayutthaya, Devakul W, and Naovarat Tarasub. 2008. 23 Thai J Toxicology *Effects of Curcumin on Cadmium-Induced Hepatotoxicity in Rats*.
- Nandipati, Kalyana C., Saravanan Subramanian, and Devendra K. Agrawal. 2017. "Protein Kinases: Mechanisms and Downstream Targets in Inflammation-Mediated Obesity and Insulin Resistance." *Molecular and Cellular Biochemistry* 426(1–2): 27–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27868170> (April 11, 2019).
- Nathan, Carl, and Aihao Ding. 2010. "Nonresolving Inflammation." *Cell* 140(6): 871–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303877> (April 12, 2019).
- Negera, Edessa et al. 2018. "The Effects of Prednisolone Treatment on Cytokine Expression in Patients with Erythema Nodosum Leprosum Reactions." *Frontiers in Immunology* 9(FEB): 189. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00189/full> (May 11, 2020).
- Nelson, D P, and L A Kiesow. 1972. "Enthalpy of Decomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase at 25 Degrees C (with Molar Extinction Coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Solutions in the UV)." *Analytical biochemistry* 49(2): 474–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5082943> (April 8, 2019).
- Nemmiche, Saïd. 2016. "Oxidative Signaling Response to Cadmium Exposure." *Toxicological Sciences* 156(1): kfw222. <http://toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfw222> (April 12, 2019).
- Olszowski, Tomasz, Irena Baranowska-Bosiacka, Izabela Gutowska, and Dariusz Chlubek. 2012. *Pro-Inflammatory Properties of Cadmium*. [www.actabp.pl](http://www.actabp.pl) (April 12, 2019).
- Ozougwu, K C Obimba, and Unakalamba. 2013. "Journal of Physiology and Pathophysiology The Pathogenesis and Pathophysiology of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus." 4(4): 46–57. <http://www.academicjournals.org/JPAP> (April 8, 2019).
- Petersen, Max C. et al. 2016. "Insulin Receptor Thr1160 Phosphorylation Mediates Lipid-Induced Hepatic Insulin Resistance." *Journal of Clinical Investigation* 126(11): 4361–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27760050> (April 9, 2019).
- Petersen, Max C., and Gerald I. Shulman. 2018. "Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance." *Physiological Reviews* 98(4): 2133–2223. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30067154/> (January 5, 2021).
- Pillay, T S, and K Siddle. 1991. "Insulin-Stimulated Serine/Threonine Phosphorylation of the Insulin Receptor: Paucity of Threonine 1348 Phosphorylation in Vitro Indicates the Involvement of More than One Serine/Threonine Kinase in Vivo." *Biochemical and biophysical research communications* 179(2): 962–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1654905> (April 9, 2019).
- Poolsup, Nalinee, Naeti Suksomboon, Putu Dian Marani Kurnianta, and Kulchalee Deawjaroen. 2019. "Effects of Curcumin on Glycemic Control and Lipid Profile in Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis" ed. Stephen L. Atkin. *PLOS ONE* 14(4): e0215840. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0215840> (November 22, 2019).
- Rahimzadeh, Mehrdad Rafati, Mehravar Rafati Rahimzadeh, Sohrab Kazemi, and Ali Akbar Moghadamnia. 2017. "Cadmium Toxicity and Treatment: An Update." *Caspian Journal of Internal Medicine* 8(3): 135–45. [/pmc/articles/PMC5596182/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC5596182/?report=abstract) (January 4, 2021).
- Rahman, Irfan, Aruna Kode, and Saibal K Biswas. 2006. "Assay for Quantitative Determination of Glutathione

- and Glutathione Disulfide Levels Using Enzymatic Recycling Method." *Nature Protocols* 1(6): 3159–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406579> (April 8, 2019).
- Rennolds, Jessica et al. 2012. "Curcumin Regulates Airway Epithelial Cell Cytokine Responses to the Pollutant Cadmium." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417(1): 256–61.
- Rikans, Lora E., and Tetsuo Yamano. 2000. "Mechanisms of Cadmium-Mediated Acute Hepatotoxicity." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 14(2): 110–17. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1099-0461\(2000\)14:2%3C110::AID-JBT7%3E3.0.CO;2-J](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1099-0461(2000)14:2%3C110::AID-JBT7%3E3.0.CO;2-J) (March 30, 2021).
- Ronchetti, Simona, Graziella Migliorati, Stefano Bruscoli, and Carlo Riccardi. 2018. "Defining the Role of Glucocorticoids in Inflammation." *Clinical Science* 132(14): 1529–43.
- Rorsman, Patrik, and Matthias Braun. 2013. "Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets." *Annual Review of Physiology* 75: 155–79. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22974438/> (February 17, 2021).
- Roura-Guiberna, Adriana et al. 2019. "Isomers of Conjugated Linoleic Acid Induce Insulin Resistance through a Mechanism Involving Activation of Protein Kinase C $\epsilon$  in Liver Cells." *Cellular Signalling* 53: 281–93. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656818302626?via%3Dihub> (May 7, 2019).
- Roytblat, L et al. 2000. "Raised Interleukin-6 Levels in Obese Patients." *Obesity research* 8(9): 673–75. <http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2000.86> (April 8, 2019).
- Sabolić, Ivan, Davorka Breljak, Mario Škarica, and Carol M. Herak-Kramberger. 2010. "Role of Metallothionein in Cadmium Traffic and Toxicity in Kidneys and Other Mammalian Organs." *BioMetals* 23(5): 897–926. <http://link.springer.com/10.1007/s10534-010-9351-z> (April 14, 2019).
- Samuel, Varman T., and Gerald I. Shulman. 2012. "Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links." *Cell* 148(5): 852–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22385956> (April 8, 2019).
- Samuel, Varman T., and Gerald I. Shulman. 2016. "The Pathogenesis of Insulin Resistance: Integrating Signaling Pathways and Substrate Flux." *Journal of Clinical Investigation* 126(1): 12–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26727229> (April 9, 2019).
- Sarafidis, P A et al. 2007. "Validity and Reproducibility of HOMA-IR, 1/HOMA-IR, QUICKI and McAuley's Indices in Patients with Hypertension and Type II Diabetes." *Journal of Human Hypertension* 21(9): 709–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17443211> (April 9, 2019).
- Sarmiento-Ortega, Victor Enrique et al. 2017. "Changes on Serum and Hepatic Lipidome after a Chronic Cadmium Exposure in Wistar Rats." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 635: 52–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29066246> (April 13, 2019).
- . 2017. "Evaluación Del Desarrollo de Resistencia a Insulina Hepática y Su Relación En La Ruta Lipogénica En Ratas Wistar Expuestas a Cd." Benemerita Universidad Autonoma de Puebla.
- Selypes, A., R. Lorencz, and P. Serényi. 1986. "The Preventive Effect of Prednisolone on the Adrenal Toxicity of Cadmium." *Journal of Applied Toxicology* 6(5): 377–78. <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.2550060513> (May 12, 2020).
- SESTI, GIORGIO et al. 2001. "Defects of the Insulin Receptor Substrate (IRS) System in Human Metabolic Disorders." *The FASEB Journal* 15(12): 2099–2111. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11641236> (April 15, 2019).
- Shanik, M. H. et al. 2008. "Insulin Resistance and Hyperinsulinemia: Is Hyperinsulinemia the Cart or the Horse?" *Diabetes Care* 31(Supplement 2): S262–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18227495> (April 15, 2019).

- Shoelson, Steven E., Jongsoo Lee, and Allison B. Goldfine. 2006. "Inflammation and Insulin Resistance." *Journal of Clinical Investigation* 116(7): 1793–1801. /pmc/articles/PMC1483173/?report=abstract (January 5, 2021).
- Shum, Michael, Kerstin Bellmann, Philippe St-Pierre, and André Marette. 2016. "Pharmacological Inhibition of S6K1 Increases Glucose Metabolism and Akt Signalling in Vitro and in Diet-Induced Obese Mice." *Diabetologia* 59(3): 592–603. <http://link.springer.com/10.1007/s00125-015-3839-6> (April 9, 2019).
- Sidhu, M et al. 1993. "Effect of Chronic Cadmium Exposure on Glutathione S-Transferase and Glutathione Peroxidase Activities in Rhesus Monkey: The Role of Selenium." *Toxicology* 83(1–3): 203–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8248946> (April 12, 2019).
- Smith, I K, T L Vierheller, and C A Thorne. 1988. "Assay of Glutathione Reductase in Crude Tissue Homogenates Using 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoic Acid)." *Analytical biochemistry* 175(2): 408–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3239770> (April 8, 2019).
- Solinas, Giovanni, and Barbara Becattini. 2017. "JNK at the Crossroad of Obesity, Insulin Resistance, and Cell Stress Response." *Molecular metabolism* 6(2): 174–84. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212877816302447> (April 12, 2019).
- Stammberger, Ingo et al. 2002. "Evaluation of the Carcinogenic Potential of Insulin Glargine (LANTUS) in Rats and Mice." *International Journal of Toxicology* 21(3): 171–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055018> (April 15, 2019).
- Straczkowski, Marek et al. 2002. "Plasma Interleukin-8 Concentrations Are Increased in Obese Subjects and Related to Fat Mass and Tumor Necrosis Factor-Alpha System." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87(10): 4602–6. <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2002-020135> (April 8, 2019).
- Tangvarasittichai, Surapon. 2015. "Oxidative Stress, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Type 2 Diabetes Mellitus." *World Journal of Diabetes* 6(3): 456. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25897356> (April 8, 2019).
- Taniguchi, Cullen M, Brice Emanuelli, and C Ronald Kahn. 2006. "Critical Nodes in Signalling Pathways: Insights into Insulin Action." *Nature reviews. Molecular cell biology* 7(2): 85–96. <http://www.nature.com/articles/nrm1837> (April 8, 2019).
- Tavaré, J M, B Zhang, L Ellis, and R A Roth. 1991. "Insulin-Stimulated Serine and Threonine Phosphorylation of the Human Insulin Receptor. An Assessment of the Role of Serines 1305/1306 and Threonine 1348 by Their Replacement with Neutral or Negatively Charged Amino Acids." *The Journal of biological chemistry* 266(32): 21804–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1939203> (April 9, 2019).
- Thévenod, Frank. 2009. "Cadmium and Cellular Signaling Cascades: To Be or Not to Be?" *Toxicology and Applied Pharmacology* 238(3): 221–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19371614> (April 8, 2019).
- Thévenod, Frank, and Wing-Kee Lee. 2013. "Toxicology of Cadmium and Its Damage to Mammalian Organs." In , 415–90. [http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-5179-8\\_14](http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-5179-8_14) (April 8, 2019).
- Thota, Rohith N. et al. 2018. "Curcumin Alleviates Postprandial Glycaemic Response in Healthy Subjects: A Cross-over, Randomized Controlled Study." *Scientific Reports* 8(1).
- Tiganis, Tony. 2011. "Reactive Oxygen Species and Insulin Resistance: The Good, the Bad and the Ugly." *Trends in Pharmacological Sciences* 32(2): 82–89. <http://www.cell.com/article/S0165614710002075/fulltext> (January 6, 2021).
- Tinkov, Alexey A. et al. 2017. "The Role of Cadmium in Obesity and Diabetes." *Science of The Total Environment* 601–602: 741–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28577409> (April 8, 2019).

- Treviño, Samuel et al. 2015. "Chronic Cadmium Exposure in Rats Produces Pancreatic Impairment and Insulin Resistance in Multiple Peripheral Tissues." *Archives of biochemistry and biophysics* 583: 27–35. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000398611530014X> (April 8, 2019).
- . 2015. "Efecto de La Administración Crónica de Cadmio En Tejido Pancreático de Ratas Wistar Como Factor de Alteración En El Metabolismo de Los Carbohidratos." Benemerita Universidad Autonoma de Puebla.
- Tsai, Jia-Shiuan, Cheng-Han Chao, and Lih-Yuan Lin. 2016. "Cadmium Activates Multiple Signaling Pathways That Coordinately Stimulate Akt Activity to Enhance C-Myc mRNA Stability" ed. Michal Hetman. *PLOS ONE* 11(1): e0147011. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0147011> (April 10, 2019).
- Ulusu, N, N Acan, Belma Turan, and E Tezcan. 2003. "Inhibition of Glutathione Reductase by Cadmium Ion in Some Rabbit Tissues and the Protective Role of Dietary Selenium." *Biological trace element research* 91(2): 151–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12719610> (April 15, 2019).
- Vangipurapu, J., A. Stančáková, T. Kuulasmaa, J. Paananen, J. Kuusisto, E. Ferrannini, M. Laakso, et al. 2011. "A Novel Surrogate Index for Hepatic Insulin Resistance." *Diabetologia* 54(3): 540–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21107521> (April 8, 2019).
- . 2011. "A Novel Surrogate Index for Hepatic Insulin Resistance." *Diabetologia* 54(3): 540–43. <http://link.springer.com/10.1007/s00125-010-1966-7> (April 9, 2019).
- Williams, K H et al. 2013. "Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Pathogenic Duo." *Endocrine reviews* 34(1): 84–129. <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/er.2012-1009> (April 8, 2019).
- Willms, A., P. M. Schumm-Draeger, and T. Siegmund. 2016. "Glucocorticoids and Diabetes." *Diabetologie* 12(2): 127–38.
- Yecies, Jessica L et al. 2011. "Akt Stimulates Hepatic SREBP1c and Lipogenesis through Parallel MTORC1-Dependent and Independent Pathways." *Cell metabolism* 14(1): 21–32. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413111002208> (April 8, 2019).
- Yoon, Mee-Sup. 2017. "The Role of Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) in Insulin Signaling." *Nutrients* 9(11). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29077002> (April 9, 2019).
- Youngren, J. F. 2007. "Regulation of Insulin Receptor Function." *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(7–8): 873–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17347799> (April 8, 2019).
- Zaheri, Zahra et al. 2019. "Curcumin Exerts Beneficial Role on Insulin Resistance through Modulation of SOCS3 and Rac-1 Pathways in Type 2 Diabetic Rats." *Journal of Functional Foods* 60.
- Zhang, Jin et al. 2008. "S6K Directly Phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to Promote Insulin Resistance in Response to TNF-(Alpha) Signaling through IKK2." *The Journal of biological chemistry* 283(51): 35375–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952604> (April 13, 2019).
- Zhang, Yuanyuan, Yajie Zhang, and Yonghao Yu. 2017. "Global Phosphoproteomic Analysis of Insulin/Akt/MTORC1/S6K Signaling in Rat Hepatocytes." *Journal of proteome research* 16(8): 2825–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28689409> (April 9, 2019).
- Aguirre, Vincent et al. 2002. "Phosphorylation of Ser307 in Insulin Receptor Substrate-1 Blocks Interactions with the Insulin Receptor and Inhibits Insulin Action." *The Journal of biological chemistry* 277(2): 1531–37. <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M101521200> (April 8, 2019).
- Andersson, Anna K. et al. 2005. "Effects of Prednisolone Treatment on Cytokine Expression in Patients with

- Leprosy Type 1 Reactions." *Infection and Immunity* 73(6): 3725–33.
- Arroyo, Verónica Souza et al. 2013. "Liver and Cadmium Toxicity." *Journal of Drug Metabolism & Toxicology* 03(06). <https://www.omicsonline.org/liver-and-cadmium-toxicity-2157-7609.S5-001.php?aid=3686>.
- Arthur, J. Simon C., and Steven C. Ley. 2013. "Mitogen-Activated Protein Kinases in Innate Immunity." *Nature Reviews Immunology* 13(9): 679–92.
- ATSDR. 2021. "Agency for Toxic Substance and Disease Registry. Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA." <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=15> (April 8, 2019).
- Ayroidi, Emira et al. 2012. "Mechanisms of the Anti-inflammatory Effects of Glucocorticoids: Genomic and Nongenomic Interference with MAPK Signaling Pathways." *The FASEB Journal* 26(12): 4805–20. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.12-216382> (May 11, 2020).
- Blaser, Heiko, Catherine Dostert, Tak W Mak, and Dirk Brenner. 2016. "TNF and ROS Crosstalk in Inflammation." <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.12.002> (November 21, 2019).
- Bolognin, M. et al. 2009. "Characterisation of the Acute and Reversible Airway Inflammation Induced by Cadmium Chloride Inhalation in Healthy Dogs and Evaluation of the Effects of Salbutamol and Prednisolone." *Veterinary Journal* 179(3): 443–50.
- Boucher, J., A. Kleinriders, and C. R. Kahn. 2014. "Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(1): a009191–a009191. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384568> (April 10, 2019).
- Brown, Michael S, and Joseph L Goldstein. 2008. "Selective versus Total Insulin Resistance: A Pathogenic Paradox." *Cell metabolism* 7(2): 95–96. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413107003828> (April 9, 2019).
- Buha, Aleksandra et al. 2020. "Emerging Links between Cadmium Exposure and Insulin Resistance: Human, Animal, and Cell Study Data." *Toxics* 8(3): 63. [www.mdpi.com/journal/toxics](http://www.mdpi.com/journal/toxics) (January 5, 2021).
- Cacho, J et al. 2008. "Validation of Simple Indexes to Assess Insulin Sensitivity during Pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley Rats." *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 295(5): E1269–76. <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.90207.2008> (April 8, 2019).
- Chao, C C et al. 1992. "Activated Microglia Mediate Neuronal Cell Injury via a Nitric Oxide Mechanism." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 149(8): 2736–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1383325> (April 8, 2019).
- Chapatwala, K D, M Hobson, D Desai, and B Rajanna. 1982. "Effect of Cadmium on Hepatic and Renal Gluconeogenic Enzymes in Female Rats." *Toxicology letters* 12(1): 27–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7112599> (April 15, 2019).
- Chapatwala, K D, B Rajanna, and D Desai. 1980. "Cadmium Induced Changes in Gluconeogenic Enzymes in Rat Kidney and Liver." *Drug and chemical toxicology* 3(4): 407–20. <http://www.informapharmascience.com/doi/abs/10.3109/01480548009030129> (April 15, 2019).
- Chen, Long, Lei Liu, and Shile Huang. 2008. "Cadmium Activates the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway via Induction of Reactive Oxygen Species and Inhibition of Protein Phosphatases 2A and 5." *Free Radical Biology and Medicine* 45(7): 1035–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703135> (April 12, 2019).
- Chuengsamarn, Somlak et al. 2012. "Curcumin Extract for Prevention of Type 2 Diabetes." *Diabetes Care* 35(11): 2121–27.

- Cone, Roger D. 2005. "Anatomy and Regulation of the Central Melanocortin System." *Nature Neuroscience* 8(5): 571–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15856065> (April 8, 2019).
- Courtney, C. Hamish, and Jerrold M. Olefsky. 2007. "Insulin Resistance." In *Mechanisms of Insulin Action: Medical Intelligence Unit*, Springer New York, 185–209. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507839/> (January 4, 2021).
- Cruz-Topete, Diana, and John A. Cidlowski. 2014. "One Hormone, Two Actions: Anti- And pro-Inflammatory Effects of Glucocorticoids." *NeuroImmunoModulation* 22(0): 20–32.
- Czock, David, Frieder Keller, Franz Maximilian Rasche, and Ulla Häussler. 2005. "Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Systemically Administered Glucocorticoids." *Clinical Pharmacokinetics* 44(1): 61–98.
- Das, Sandra Concepcion, and Hamda A. Al-Naemi. 2019. "Cadmium Toxicity: Oxidative Stress, Inflammation and Tissue Injury." *Occupational Diseases and Environmental Medicine* 07(04): 144–63. <https://www.scirp.org/journal/odem> (January 6, 2021).
- DeFronzo, R A. 2010. "Insulin Resistance, Lipotoxicity, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis: The Missing Links. The Claude Bernard Lecture 2009." *Diabetologia* 53(7): 1270–87. <http://link.springer.com/10.1007/s00125-010-1684-1> (April 15, 2019).
- Dover, E. Nicole, Naishal Y. Patel, and Miroslav Stýblo. 2018. "Impact of in Vitro Heavy Metal Exposure on Pancreatic  $\beta$ -Cell Function." *Toxicology Letters* 299: 137–44. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427418319465?via%3Dihub> (April 8, 2019).
- Đukić-Čosić, Danijela et al. 2020. "An Overview of Molecular Mechanisms in Cadmium Toxicity." *Current Opinion in Toxicology* 19: 56–62.
- Eaton, D L, and M G Cherian. 1991. "Determination of Metallothionein in Tissues by Cadmium-Hemoglobin Affinity Assay." *Methods in enzymology* 205: 83–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1779827> (April 8, 2019).
- Edwards, Joshua, and Christopher Ackerman. 2016. "A Review of Diabetes Mellitus and Exposure to the Environmental Toxicant Cadmium with an Emphasis on Likely Mechanisms of Action." *Current diabetes reviews* 12(3): 252–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26264451> (April 8, 2019).
- Edwards, Joshua R., and Walter C. Prozialeck. 2009. "Cadmium, Diabetes and Chronic Kidney Disease." *Toxicology and Applied Pharmacology* 238(3): 289–93. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X09001173> (April 15, 2019).
- Ehrchen, Jan M., Johannes Roth, and Katarzyna Barczyk-Kahlert. 2019. "More than Suppression: Glucocorticoid Action on Monocytes and Macrophages." *Frontiers in Immunology* 10(AUG).
- Esterbauer, H, and H Zollner. 1989. "Methods for Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products." *Free radical biology & medicine* 7(2): 197–203. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2680787> (April 8, 2019).
- Eybl, Vladislav, Dana Kotyzová, and Monika Bludovská. 2004. "The Effect of Curcumin on Cadmium-Induced Oxidative Damage and Trace Elements Level in the Liver of Rats and Mice." *Toxicology Letters* 151(1): 79–85.
- Ficková, M et al. 2003. "Long Lasting Cadmium Intake Is Associated with Reduction of Insulin Receptors in Rat Adipocytes." *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 16(4): 561–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12779241> (April 15, 2019).
- Figueiredo-Pereira, M E, S Yakushin, and G Cohen. 1998. "Disruption of the Intracellular Sulfhydryl Homeostasis by Cadmium-Induced Oxidative Stress Leads to Protein Thiolation and Ubiquitination in

- Neuronal Cells." *The Journal of biological chemistry* 273(21): 12703–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9582293> (April 12, 2019).
- Flohé, L, and W A Günzler. 1984. "Assays of Glutathione Peroxidase." *Methods in enzymology* 105: 114–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727659> (April 8, 2019).
- Fougère, Bertrand et al. 2017. "RETRACTED: Chronic Inflammation: Accelerator of Biological Aging." *The Journals of Gerontology: Series A* 72(9): 1218–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28003373> (April 12, 2019).
- Galazyn-Sidorczuk, Malgorzata et al. 2012. "Effect of Zinc Supplementation on Glutathione Peroxidase Activity and Selenium Concentration in the Serum, Liver and Kidney of Rats Chronically Exposed to Cadmium." *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 26(1): 46–52. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0946672X11002677> (April 15, 2019).
- García-Niño, Wylly Ramsés, and José Pedraza-Chaverrí. 2014. "Protective Effect of Curcumin against Heavy Metals-Induced Liver Damage." *Food and Chemical Toxicology* 69: 182–201.
- Genchi, Giuseppe et al. 2020. "The Effects of Cadmium Toxicity." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(11). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3312803/> (January 4, 2021).
- Gual, Philippe, Yannick Le Marchand-Brustel, and Jean-François Tanti. 2005. "Positive and Negative Regulation of Insulin Signaling through IRS-1 Phosphorylation." *Biochimie* 87(1): 99–109. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908404001981> (April 15, 2019).
- Haas, Joel T et al. 2012. "Hepatic Insulin Signaling Is Required for Obesity-Dependent Expression of SREBP-1c mRNA but Not for Feeding-Dependent Expression." *Cell metabolism* 15(6): 873–84. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413112001957> (April 8, 2019).
- Hall, Catherine, Hongtao Yu, and Eunhee Choi. 2020. "Insulin Receptor Endocytosis in the Pathophysiology of Insulin Resistance." *Experimental and Molecular Medicine* 52(6): 911–20. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32576931/> (January 5, 2021).
- Han, Jin C et al. 2003. "Cadmium Induces Impaired Glucose Tolerance in Rat by Down-Regulating GLUT4 Expression in Adipocytes." *Archives of biochemistry and biophysics* 413(2): 213–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12729619> (April 15, 2019).
- Hectors, T L M et al. 2011. "Environmental Pollutants and Type 2 Diabetes: A Review of Mechanisms That Can Disrupt Beta Cell Function." *Diabetologia* 54(6): 1273–90. <http://link.springer.com/10.1007/s00125-011-2109-5> (April 15, 2019).
- Holland, E G, and A T Taylor. 1991. "Glucocorticoids in Clinical Practice." *The Journal of family practice* 32(5): 512–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2022941> (May 11, 2020).
- Hosseini-Khannazer, Nikoo et al. 2020. "The Effects of Cadmium Exposure in the Induction of Inflammation." *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 42(1): 1–8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31793820/> (January 6, 2021).
- Hotamisligil, G S et al. 1995. "Increased Adipose Tissue Expression of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Human Obesity and Insulin Resistance." *Journal of Clinical Investigation* 95(5): 2409–15. <http://www.jci.org/articles/view/117936> (April 8, 2019).
- Hotamisligil, G S, and B M Spiegelman. 1994. "Tumor Necrosis Factor Alpha: A Key Component of the Obesity-Diabetes Link." *Diabetes* 43(11): 1271–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926300> (April 8, 2019).
- Houstis, Nicholas, Evan D. Rosen, and Eric S. Lander. 2006. "Reactive Oxygen Species Have a Causal Role in Multiple Forms of Insulin Resistance." *Nature* 440(7086): 944–48.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16612386> (April 8, 2019).
- Hutchins, Andrew P, Diego Diez, and Diego Miranda-Saavedra. 2013. "The IL-10/STAT3-Mediated Anti-Inflammatory Response: Recent Developments and Future Challenges." *Briefings in functional genomics* 12(6): 489–98. <https://academic.oup.com/bfg/article-lookup/doi/10.1093/bfgp/elt028> (April 15, 2019).
- Ikediobi, Christopher O et al. 2004. "Response of Antioxidant Enzymes and Redox Metabolites to Cadmium-Induced Oxidative Stress in CRL-1439 Normal Rat Liver Cells." *International journal of molecular medicine* 14(1): 87–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15202021> (April 12, 2019).
- Ingram, Sonia, Marina Diotallevi, and ( Brighton. 2017. *Reactive Oxygen Species: Rapid Fire in Inflammation*. <https://portlandpress.com/biochemist/article-pdf/39/4/30/852022/bio039040030.pdf> (November 27, 2019).
- Jacquet, Adeline et al. 2016. "Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Diabetes: Role of Oxidative Stress and Comparison with Polychlorinated Biphenyls." *Current Drug Targets* 17(12): 1385–1413. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26028051/> (January 6, 2021).
- Järup, Lars, and Agneta Akesson. 2009. "Current Status of Cadmium as an Environmental Health Problem." *Toxicology and applied pharmacology* 238(3): 201–8. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X09001690> (April 8, 2019).
- Jiménez-Osorio, Angélica Saraí, Adriana Monroy, and Silvestre Alavez. 2016. "Curcumin and Insulin Resistance-Molecular Targets and Clinical Evidences." *BioFactors* 42(6): 561–80. <http://doi.wiley.com/10.1002/biof.1302> (November 22, 2019).
- Karmakar, R, A Banerjee, S Datta, and M Chatterjee. 1999. "Influence of Cadmium Intoxication on Hepatic Lipid Peroxidation, Glutathione Level, and Glutathione S-Transferase and Gamma-Glutamyl Transpeptidase Activities: Correlation with Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells." *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* 18(4): 277–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15281238> (April 12, 2019).
- Kato, Hironori, Ryohei Katoh, and Masanori Kitamura. 2013. "Dual Regulation of Cadmium-Induced Apoptosis by MTORC1 through Selective Induction of IRE1 Branches in Unfolded Protein Response." [www.plosone.org](http://www.plosone.org) (April 15, 2019).
- Kim, Francis et al. 2005. "Free Fatty Acid Impairment of Nitric Oxide Production in Endothelial Cells Is Mediated by IKKbeta." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25(5): 989–94. <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.0000160549.60980.a8> (April 8, 2019).
- Klaassen, Curtis D, Jie Liu, and Bhalchandra A Diwan. 2009. "Metallothionein Protection of Cadmium Toxicity." *Toxicology and applied pharmacology* 238(3): 215–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19362100> (April 14, 2019).
- Kuo, Taiyi, Allison McQueen, Tzu Chieh Chen, and Jen Chywan Wang. 2015. "Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 872: 99–126.
- Kyriakis, John M, and Joseph Avruch. 2012. "Mammalian MAPK Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation: A 10-Year Update." *Physiological reviews* 92(2): 689–737. <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00028.2011> (April 12, 2019).
- Lee, J., and P. F. Pilch. 1994. "The Insulin Receptor: Structure, Function, and Signaling." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 266(2): C319–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8141246> (April 9, 2019).
- Lei, L J et al. 2019. "[Relationship between Urinary Cadmium and Type 2 Diabetes Mellitus in Adults]." *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi* 40(2): 207–11.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30744274> (April 8, 2019).
- Leon Chavez, B A et al. 2001. "Regional and Temporal Progression of Reactive Astrocytosis in the Brain of the Myelin Mutant Taiep Rat." *Brain research* 900(1): 152–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325359> (April 8, 2019).
- Liu, Jie, Wei Qu, and Maria B Kadiiska. 2009. "Role of Oxidative Stress in Cadmium Toxicity and Carcinogenesis." *Toxicology and applied pharmacology* 238(3): 209–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236887> (April 14, 2019).
- Liu, Ting, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, and Shao-Cong Sun. 2017. "NF-KB Signaling in Inflammation." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2: 17023. <http://www.nature.com/articles/sigtrans201723> (April 12, 2019).
- Loh, Kim et al. 2009. "Reactive Oxygen Species Enhance Insulin Sensitivity." *Cell Metabolism* 10(4): 260–72.
- López, E et al. 2006. "Cadmium Induces Reactive Oxygen Species Generation and Lipid Peroxidation in Cortical Neurons in Culture." *Free radical biology & medicine* 40(6): 940–51. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584905006738> (April 12, 2019).
- de Luca, Carl, and Jerrold M. Olefsky. 2008. "Inflammation and Insulin Resistance." *FEBS Letters* 582(1): 97–105.
- de Luca, Carl, and Jerrold M Olefsky. 2006. "Stressed out about Obesity and Insulin Resistance." *Nature Medicine* 12(1): 41–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397561> (April 8, 2019).
- Maccarrone, M., and B. Brüne. 2009. "Redox Regulation in Acute and Chronic Inflammation." In *Cell Death and Differentiation*, , 1184–86.
- Maithilikarpagaselvi, Nachimuthu, Magadi Gopalakrishna Sridhar, Rathinam Palamalai Swaminathan, and Bobby Zachariah. 2016. "Curcumin Prevents Inflammatory Response, Oxidative Stress and Insulin Resistance in High Fructose Fed Male Wistar Rats: Potential Role of Serine Kinases." *Chemico-Biological Interactions* 244: 187–94.
- Matović, Vesna, Aleksandra Buha, Zorica Bulat, and Danijela Dukić-Ćosić. 2011. "Cadmium Toxicity Revisited: Focus on Oxidative Stress Induction and Interactions with Zinc and Magnesium." *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 62(1): 65–76.
- Matsuda, M, and R A DeFronzo. 1999. "Insulin Sensitivity Indices Obtained from Oral Glucose Tolerance Testing: Comparison with the Euglycemic Insulin Clamp." *Diabetes care* 22(9): 1462–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480510> (April 9, 2019).
- Merali, Z., and R. L. Singhal. 1980. "Diabetogenic Effects of Chronic Oral Cadmium Administration to Neonatal Rats." *British Journal of Pharmacology* 69(1): 151. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2044180/> (April 15, 2019).
- Mohajeri, Mohammad, Mehdi Rezaee, and Amirhossein Sahebkar. 2017. "Cadmium-Induced Toxicity Is Rescued by Curcumin: A Review." *BioFactors* 43(5): 645–61. <http://doi.wiley.com/10.1002/biof.1376> (November 20, 2019).
- Morgan, Michael J, and Zheng-gang Liu. 2011. "Crosstalk of Reactive Oxygen Species and NF-KB Signaling." *Cell Research* 21(1): 103–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187859> (April 8, 2019).
- El Muayed, Malek et al. 2012. "Accumulation of Cadmium in Insulin-Producing  $\beta$  Cells." *Islets* 4(6): 405–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466887> (April 8, 2019).
- Na Ayutthaya, Devakul W, and Naovararat Tarasub. 2008. 23 Thai J Toxicology *Effects of Curcumin on Cadmium-Induced Hepatotoxicity in Rats*.

- Nandipati, Kalyana C., Saravanan Subramanian, and Devendra K. Agrawal. 2017. "Protein Kinases: Mechanisms and Downstream Targets in Inflammation-Mediated Obesity and Insulin Resistance." *Molecular and Cellular Biochemistry* 426(1–2): 27–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27868170> (April 11, 2019).
- Nathan, Carl, and Aihao Ding. 2010. "Nonresolving Inflammation." *Cell* 140(6): 871–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303877> (April 12, 2019).
- Negera, Edessa et al. 2018. "The Effects of Prednisolone Treatment on Cytokine Expression in Patients with Erythema Nodosum Leprosum Reactions." *Frontiers in Immunology* 9(FEB): 189. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00189/full> (May 11, 2020).
- Nelson, D P, and L A Kiesow. 1972. "Enthalpy of Decomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase at 25 Degrees C (with Molar Extinction Coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Solutions in the UV)." *Analytical biochemistry* 49(2): 474–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5082943> (April 8, 2019).
- Nemmiche, Saïd. 2016. "Oxidative Signaling Response to Cadmium Exposure." *Toxicological Sciences* 156(1): kfw222. <http://toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfw222> (April 12, 2019).
- Olszowski, Tomasz, Irena Baranowska-Bosiacka, Izabela Gutowska, and Dariusz Chlubek. 2012. *Pro-Inflammatory Properties of Cadmium*. [www.actabp.pl](http://www.actabp.pl) (April 12, 2019).
- Ozougwu, K C Obimba, and Unakalamba. 2013. "Journal of Physiology and Pathophysiology The Pathogenesis and Pathophysiology of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus." 4(4): 46–57. <http://www.academicjournals.org/JPAP> (April 8, 2019).
- Petersen, Max C. et al. 2016. "Insulin Receptor Thr1160 Phosphorylation Mediates Lipid-Induced Hepatic Insulin Resistance." *Journal of Clinical Investigation* 126(11): 4361–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27760050> (April 9, 2019).
- Petersen, Max C., and Gerald I. Shulman. 2018. "Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance." *Physiological Reviews* 98(4): 2133–2223. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30067154/> (January 5, 2021).
- Pillay, T S, and K Siddle. 1991. "Insulin-Stimulated Serine/Threonine Phosphorylation of the Insulin Receptor: Paucity of Threonine 1348 Phosphorylation in Vitro Indicates the Involvement of More than One Serine/Threonine Kinase in Vivo." *Biochemical and biophysical research communications* 179(2): 962–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1654905> (April 9, 2019).
- Poolsup, Naline, Naeti Suksomboon, Putu Dian Marani Kurnianta, and Kulchalee Deawjaroen. 2019. "Effects of Curcumin on Glycemic Control and Lipid Profile in Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis" ed. Stephen L. Atkin. *PLOS ONE* 14(4): e0215840. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0215840> (November 22, 2019).
- Rahimzadeh, Mehrdad Rafati, Mehravar Rafati Rahimzadeh, Sohrab Kazemi, and Ali Akbar Moghadamnia. 2017. "Cadmium Toxicity and Treatment: An Update." *Caspian Journal of Internal Medicine* 8(3): 135–45. [/pmc/articles/PMC5596182/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC5596182/?report=abstract) (January 4, 2021).
- Rahman, Irfan, Aruna Kode, and Saibal K Biswas. 2006. "Assay for Quantitative Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Levels Using Enzymatic Recycling Method." *Nature Protocols* 1(6): 3159–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406579> (April 8, 2019).
- Rennolds, Jessica et al. 2012. "Curcumin Regulates Airway Epithelial Cell Cytokine Responses to the Pollutant Cadmium." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417(1): 256–61.
- Rikans, Lora E., and Tetsuo Yamano. 2000. "Mechanisms of Cadmium-Mediated Acute Hepatotoxicity." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 14(2): 110–17. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1099-0461\(2000\)14:2%3C110::AID-](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1099-0461(2000)14:2%3C110::AID-)

JBT7%3E3.0.CO;2-J (March 30, 2021).

- Ronchetti, Simona, Graziella Migliorati, Stefano Bruscoli, and Carlo Riccardi. 2018. "Defining the Role of Glucocorticoids in Inflammation." *Clinical Science* 132(14): 1529–43.
- Rorsman, Patrik, and Matthias Braun. 2013. "Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets." *Annual Review of Physiology* 75: 155–79. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22974438/> (February 17, 2021).
- Roura-Guiberna, Adriana et al. 2019. "Isomers of Conjugated Linoleic Acid Induce Insulin Resistance through a Mechanism Involving Activation of Protein Kinase C $\epsilon$  in Liver Cells." *Cellular Signalling* 53: 281–93. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656818302626?via%3Dihub> (May 7, 2019).
- Roytblat, L et al. 2000. "Raised Interleukin-6 Levels in Obese Patients." *Obesity research* 8(9): 673–75. <http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2000.86> (April 8, 2019).
- Sabolić, Ivan, Davorka Breljak, Mario Škarica, and Carol M. Herak-Kramberger. 2010. "Role of Metallothionein in Cadmium Traffic and Toxicity in Kidneys and Other Mammalian Organs." *BioMetals* 23(5): 897–926. <http://link.springer.com/10.1007/s10534-010-9351-z> (April 14, 2019).
- Samuel, Varman T., and Gerald I. Shulman. 2012. "Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links." *Cell* 148(5): 852–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22385956> (April 8, 2019).
- Samuel, Varman T., and Gerald I. Shulman. 2016. "The Pathogenesis of Insulin Resistance: Integrating Signaling Pathways and Substrate Flux." *Journal of Clinical Investigation* 126(1): 12–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26727229> (April 9, 2019).
- Sarafidis, P A et al. 2007. "Validity and Reproducibility of HOMA-IR, 1/HOMA-IR, QUICKI and McAuley's Indices in Patients with Hypertension and Type II Diabetes." *Journal of Human Hypertension* 21(9): 709–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17443211> (April 9, 2019).
- Sarmiento-Ortega, Victor Enrique et al. 2017. "Changes on Serum and Hepatic Lipidome after a Chronic Cadmium Exposure in Wistar Rats." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 635: 52–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29066246> (April 13, 2019).
- . 2017. "Evaluación Del Desarrollo de Resistencia a Insulina Hepática y Su Relación En La Ruta Lipogénica En Ratas Wistar Expuestas a Cd." Benemerita Universidad Autonoma de Puebla.
- Selypes, A., R. Lorencz, and P. Serényi. 1986. "The Preventive Effect of Prednisolone on the Adrenal Toxicity of Cadmium." *Journal of Applied Toxicology* 6(5): 377–78. <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.2550060513> (May 12, 2020).
- SESTI, GIORGIO et al. 2001. "Defects of the Insulin Receptor Substrate (IRS) System in Human Metabolic Disorders." *The FASEB Journal* 15(12): 2099–2111. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11641236> (April 15, 2019).
- Shanik, M. H. et al. 2008. "Insulin Resistance and Hyperinsulinemia: Is Hyperinsulinemia the Cart or the Horse?" *Diabetes Care* 31(Supplement 2): S262–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18227495> (April 15, 2019).
- Shoelson, Steven E., Jongsoon Lee, and Allison B. Goldfine. 2006. "Inflammation and Insulin Resistance." *Journal of Clinical Investigation* 116(7): 1793–1801. [/pmc/articles/PMC1483173/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC1483173/?report=abstract) (January 5, 2021).
- Shum, Michael, Kerstin Bellmann, Philippe St-Pierre, and André Marette. 2016. "Pharmacological Inhibition of S6K1 Increases Glucose Metabolism and Akt Signalling in Vitro and in Diet-Induced Obese Mice." *Diabetologia* 59(3): 592–603. <http://link.springer.com/10.1007/s00125-015-3839-6> (April 9, 2019).

- Sidhu, M et al. 1993. "Effect of Chronic Cadmium Exposure on Glutathione S-Transferase and Glutathione Peroxidase Activities in Rhesus Monkey: The Role of Selenium." *Toxicology* 83(1–3): 203–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8248946> (April 12, 2019).
- Smith, I K, T L Vierheller, and C A Thorne. 1988. "Assay of Glutathione Reductase in Crude Tissue Homogenates Using 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoic Acid)." *Analytical biochemistry* 175(2): 408–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3239770> (April 8, 2019).
- Solinas, Giovanni, and Barbara Becattini. 2017. "JNK at the Crossroad of Obesity, Insulin Resistance, and Cell Stress Response." *Molecular metabolism* 6(2): 174–84. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212877816302447> (April 12, 2019).
- Stammler, Ingo et al. 2002. "Evaluation of the Carcinogenic Potential of Insulin Glargine (LANTUS) in Rats and Mice." *International Journal of Toxicology* 21(3): 171–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055018> (April 15, 2019).
- Straczkowski, Marek et al. 2002. "Plasma Interleukin-8 Concentrations Are Increased in Obese Subjects and Related to Fat Mass and Tumor Necrosis Factor-Alpha System." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87(10): 4602–6. <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2002-020135> (April 8, 2019).
- Tangvarasittichai, Surapon. 2015. "Oxidative Stress, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Type 2 Diabetes Mellitus." *World Journal of Diabetes* 6(3): 456. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25897356> (April 8, 2019).
- Taniguchi, Cullen M, Brice Emanuelli, and C Ronald Kahn. 2006. "Critical Nodes in Signalling Pathways: Insights into Insulin Action." *Nature reviews. Molecular cell biology* 7(2): 85–96. <http://www.nature.com/articles/nrm1837> (April 8, 2019).
- Tavaré, J M, B Zhang, L Ellis, and R A Roth. 1991. "Insulin-Stimulated Serine and Threonine Phosphorylation of the Human Insulin Receptor. An Assessment of the Role of Serines 1305/1306 and Threonine 1348 by Their Replacement with Neutral or Negatively Charged Amino Acids." *The Journal of biological chemistry* 266(32): 21804–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1939203> (April 9, 2019).
- Thévenod, Frank. 2009. "Cadmium and Cellular Signaling Cascades: To Be or Not to Be?" *Toxicology and Applied Pharmacology* 238(3): 221–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19371614> (April 8, 2019).
- Thévenod, Frank, and Wing-Kee Lee. 2013. "Toxicology of Cadmium and Its Damage to Mammalian Organs." In , 415–90. [http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-5179-8\\_14](http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-5179-8_14) (April 8, 2019).
- Thota, Rohith N. et al. 2018. "Curcumin Alleviates Postprandial Glycaemic Response in Healthy Subjects: A Cross-over, Randomized Controlled Study." *Scientific Reports* 8(1).
- Tiganis, Tony. 2011. "Reactive Oxygen Species and Insulin Resistance: The Good, the Bad and the Ugly." *Trends in Pharmacological Sciences* 32(2): 82–89. <http://www.cell.com/article/S0165614710002075/fulltext> (January 6, 2021).
- Tinkov, Alexey A. et al. 2017. "The Role of Cadmium in Obesity and Diabetes." *Science of The Total Environment* 601–602: 741–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28577409> (April 8, 2019).
- Treviño, Samuel et al. 2015. "Chronic Cadmium Exposure in Rats Produces Pancreatic Impairment and Insulin Resistance in Multiple Peripheral Tissues." *Archives of biochemistry and biophysics* 583: 27–35. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000398611530014X> (April 8, 2019).
- . 2015. "Efecto de La Administración Crónica de Cadmio En Tejido Pancreático de Ratas Wistar Como Factor de Alteración En El Metabolismo de Los Carbohidratos." Benemerita Universidad Autonoma de Puebla.

- Tsai, Jia-Shiuan, Cheng-Han Chao, and Lih-Yuan Lin. 2016. "Cadmium Activates Multiple Signaling Pathways That Coordinately Stimulate Akt Activity to Enhance C-Myc mRNA Stability" ed. Michal Hetman. *PLOS ONE* 11(1): e0147011. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0147011> (April 10, 2019).
- Ulusu, N, N Acan, Belma Turan, and E Tezcan. 2003. "Inhibition of Glutathione Reductase by Cadmium Ion in Some Rabbit Tissues and the Protective Role of Dietary Selenium." *Biological trace element research* 91(2): 151–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12719610> (April 15, 2019).
- Vangipurapu, J., A. Stančáková, T. Kuulasmaa, J. Paananen, J. Kuusisto, E. Ferrannini, M. Laakso, et al. 2011. "A Novel Surrogate Index for Hepatic Insulin Resistance." *Diabetologia* 54(3): 540–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21107521> (April 8, 2019).
- . 2011. "A Novel Surrogate Index for Hepatic Insulin Resistance." *Diabetologia* 54(3): 540–43. <http://link.springer.com/10.1007/s00125-010-1966-7> (April 9, 2019).
- Williams, K H et al. 2013. "Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Pathogenic Duo." *Endocrine reviews* 34(1): 84–129. <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/er.2012-1009> (April 8, 2019).
- Willms, A., P. M. Schumm-Draeger, and T. Siegmund. 2016. "Glucocorticoids and Diabetes." *Diabetologie* 12(2): 127–38.
- Yecies, Jessica L et al. 2011. "Akt Stimulates Hepatic SREBP1c and Lipogenesis through Parallel MTORC1-Dependent and Independent Pathways." *Cell metabolism* 14(1): 21–32. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413111002208> (April 8, 2019).
- Yoon, Mee-Sup. 2017. "The Role of Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) in Insulin Signaling." *Nutrients* 9(11). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29077002> (April 9, 2019).
- Youngren, J. F. 2007. "Regulation of Insulin Receptor Function." *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(7–8): 873–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17347799> (April 8, 2019).
- Zaheri, Zahra et al. 2019. "Curcumin Exerts Beneficial Role on Insulin Resistance through Modulation of SOCS3 and Rac-1 Pathways in Type 2 Diabetic Rats." *Journal of Functional Foods* 60.
- Zhang, Jin et al. 2008. "S6K Directly Phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to Promote Insulin Resistance in Response to TNF-(Alpha) Signaling through IKK2." *The Journal of biological chemistry* 283(51): 35375–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952604> (April 13, 2019).
- Zhang, Yuanyuan, Yajie Zhang, and Yonghao Yu. 2017. "Global Phosphoproteomic Analysis of Insulin/Akt/MTORC1/S6K Signaling in Rat Hepatocytes." *Journal of proteome research* 16(8): 2825–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28689409> (April 9, 2019).