

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

---



Facultad de Ciencias Químicas – Instituto de Ciencias  
Posgrado En Ciencias Químicas

Tesis de maestría:

“Evaluación del desarrollo de resistencia a Insulina hepática y su relación en la ruta lipogénica en ratas Wistar expuestas a Cd”

Presenta:

QFB Víctor Enrique Sarmiento Ortega

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias Químicas  
Area: Bioquímica y Biología Molecular

Lugar de realización:

Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas

Directores de Tesis

D.C. Eduardo Brambila Colombres

D.C. Samuel Treviño Mora

Marzo 2017



**BUAP**

**A QUIEN CORRESPONDA:**

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Bertha Alicia León Chávez, Dra. Patricia Aguilar Alonso, Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas y Dr. Alfonso Díaz Fonseca, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Evaluación del desarrollo de resistencia a Insulina hepática y su relación en la ruta lipogénica en ratas Wistar expuestas a Cd”**, que presenta el alumno **Víctor Enrique Sarmiento Ortega** con número de matrícula **215470407** para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veintiún días del mes de marzo del año dos mil diecisiete.

**ATENTAMENTE**

Dra. Bertha Alicia León Chávez

Dra. Patricia Aguilar Alonso

Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas

Dr. Alfonso Díaz Fonseca

# Contenido

.....	1
<b>Abreviaturas</b> .....	4
<b>1.- Introducción</b> .....	7
<b>2.- Marco teórico</b> .....	8
<b>2.1. Resistencia a insulina</b> .....	8
<b>2.2. Relación Resistencia a insulina y lipogénesis hepática</b> .....	8
<b>2.3. Teorías acerca de la lipogénesis hepática en resistencia a insulina</b> .....	10
<b>2.3.1 Localización anatómica de los procesos metabólicos en el hígado</b> .....	10
<b>2.3.2 Lipogénesis hepática independiente de insulina</b> .....	12
<b>2.4. Lipogénesis hepática.</b> .....	13
<b>2.5. Regulación de la lipogénesis hepática</b> .....	17
<b>2.6. Fisiopatología de resistencia a insulina</b> .....	19
<b>2.7. Cadmio como factor de riesgo para el desarrollo de resistencia a insulina</b> .....	19
<b>2.8. Generalidades del cadmio</b> .....	20
<b>2.9. Fuentes de exposición a cadmio</b> .....	21
2.9.1 Fuentes naturales.....	21
2.9.2. Fuentes Ocupacionales .....	21
<b>2.10. Vías de entrada del Cd al organismo</b> .....	22
<b>2.11. Distribución</b> .....	24
<b>2.12. Cadmio en páncreas</b> .....	25
<b>2.13. Cadmio en hígado</b> .....	27
<b>2.14. Cadmio, Resistencia a insulina y lípidos</b> .....	28
<b>3.- Planteamiento del problema</b> .....	30
<b>4.- Justificación</b> .....	31
<b>5.- Objetivo General</b> .....	32
<b>6.- Objetivos particulares</b> .....	32
<b>7.- Diseño experimental</b> .....	33
<b>8.- Materiales y Métodos</b> .....	34
<b>9. – Resultados</b> .....	41
<b>10.- Discusión de resultados</b> .....	69
<b>11.- Conclusiones</b> .....	91

<b>12.- Bibliografía</b> .....	92
<b>13.- Anexos</b> .....	109

## **Abreviaturas**

ACC	Acetil CoA Carboxilasa
AGPAT	Acilglicerol-fosfato acil transferasa
AGL	Ácidos grasos libres
AG	Ácidos grasos
Akt	Proteína quinasa B
apoB100	Apolipoproteína B 100
ATSDR ambientales	Agencia para sustancias tóxicas y el Registro de enfermedades ambientales
AMPK	Quinasa activada con monofosfato de adenosina
CAT	Catalasa
Cd	Cadmio
Cd-MT	Complejo cadmio metalotioneína
Cu	Cobre
CT	Colesterol total
ChREBP	Proteína de unión a elementos de respuesta de carbohidratos
DG	Diacilglicerol acil transferasa
DNL	Lipogénesis de Novo
DMT1	Transportadores de metales divalentes
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FAS	Sintasa de ácidos grasos
Fe	Hierro
FoxO1	Proteína de la caja de forkhead O1
G3P	Gliceraldehído 3-fosfato

GLUT2	Transportador de glucosa tipo 2
GSH	Glutación
GST	Glutación S transferasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LXR	Receptor del hígado X
HOMA-IR	Modelo de evaluación de la homeostasis de Resistencia a Insulina
IARC	Agencia Internacional para investigación en Cáncer
JNK	Cinasa Jun N-terminal
LOAEL	Nivel más bajo de efecto adverso observado
LPA	Ácido lisofosfatídico
NAFLD	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
Ni	Níquel
NOAEL	Nivel de efecto adverso no observado
MAPK	Proteína de actividad mitógena cinasa
mGPAT	Glicerol-fosfato acil transferasa mitocondrial
MT	Metalotioneína
MTP	Proteína de transferencia de triglicéridos microsomales
Mn	Magnesio
PA	Ácido fosfatídico
PAP	Fosfatidato fosfatasa
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKB	Proteína quinasa B
PL	Fosfolípidos
RE	Retículo endoplásmico
RI	Resistencia a insulina
SOD	Superóxido dismutasa

SREBP1c	Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c
TG	Triglicéridos
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
Zn	Zinc

## 1.- Introducción

El cadmio (Cd) es un metal tóxico, y ha sido considerado como uno de los 5 mayores contaminantes por la Agencia para sustancias Tóxicas y el Registro de enfermedades ambientales [ATSDR, 2012]; 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 [Martelli et al., 2006; Klaassen et al., 2009]. 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 [Waalkes and Rhem, 1992; Shimada et al., 2000].

Reportes previos han puesto de manifiesto que una de las consecuencias de la intoxicación por Cd es la presencia de hiperglicemias, las cuales han sido asociadas a la disminución de la tolerancia a los carbohidratos con incremento en la insulino resistencia por alteraciones en la secreción de insulina e incluso daño pancreático [Han et al., 2003; Lei et al., 2007; Edwards and Prozialeck, 2009; Chang et al., 2013; Treviño et al., 2015], aunado a esto se tienen reportes que ante la exposición al metal, se presentan alteraciones en el metabolismo lipídico presentándose dislipidemias. Sin embargo, no existen reportes hasta la fecha del papel del cadmio sobre la vía de señalización de insulina y su relación con la lipogénesis en el tejido hepático, en el estado conocido como resistencia a insulina. Por lo que en el presente trabajo nos enfocamos a estudiar el efecto del Cd en relación al desarrollo de resistencia a insulina por modificaciones o alteraciones en la cascada de señalización, y su relación con la lipogénesis hepática, y las posibles alteraciones bioquímicas de carbohidratos por una exposición crónica al metal; tanto a nivel periférico (sérico), como a nivel tisular (hepático).

## 2.- Marco teórico

### 2.1. Resistencia a insulina

Aunque la insulina comúnmente se asocia con la regulación de carbohidratos, también tiene efecto sobre el metabolismo de lípidos. Los hepatocitos responden a la hormona, inhibiendo la gluconeogénesis y produciendo una síntesis *de novo* lipídica. Bajo condiciones fisiológicas, la ingesta de carbohidratos produce liberación de insulina, sin embargo, en estados de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la insulina no es capaz de suprimir la producción de glucosa hepática, mientras que, paradójicamente la inducción de la lipogénesis hepática es sostenida, contribuyendo, tanto a estados hiperglucémicos como hiperlipémicos, [Haas et al., 2012; Yecies et al., 2011].

La resistencia a la insulina es un concepto bioquímico-molecular que se traduce en una menor eficiencia de la acción biológica de la insulina. Durante el post-prandio, la secreción de insulina desencadena en tejidos como músculo, hígado y adiposo, una serie de respuestas que permiten la captación, obtención energética y el resguardo de la glucosa en forma de glucógeno.

### 2.2. Relación Resistencia a insulina y lipogénesis hepática

En 1992, se propuso una interpretación diferente de cómo el paradigma de la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperglucemia e hipertrigliceridemia pueden estar interrelacionados. Sugiriéndose que, en lugar de una patología centrada en el metabolismo de la glucosa, quizás la patogénesis de la resistencia a la insulina se entiende mejor como una desregulación del metabolismo de los lípidos, una parte integral de este argumento original es el aumento de las tasas de lipogénesis hepática [McGarry, 1992].

Si bien este punto de vista se centró en los tejidos periféricos, se acepta que la resistencia a la insulina se asocia con alteraciones en el metabolismo de los lípidos hepáticos [Korenblat et al., 2008; Li et al., 2010, Shulman et al., 2010, Moore, 2012, Hijmans et al., 2013]. Bajo esta hipótesis, el círculo vicioso propuesto sigue siendo centrado en procesos de hiperinsulinemia que conducen al aumento de lipogénesis de *novo* (DNL, por sus siglas en inglés), la cual induce una mayor resistencia a la insulina [Williams et al., 2013], con fracaso en la supresión de gluconeogénesis, e hiperglucemias sostenidas, las cuales estimulan más secreción de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas. Esta es una visión muy simplificada del proceso, ya que los mecanismos moleculares involucrados en los múltiples tejidos asociados a la homeostasis de glucosa y lípidos son complejos y poco entendidos y parecen desempeñar un papel en el desarrollo de la DM2 [Galadari et al., 2013].

Por otro lado, el receptor de insulina también colabora con la activación de una cascada de señalización de cinasas divergentes dentro del citosol, implicando a fosfoinositol-3 quinasa (PI3K) y proteína quinasa B (PKB) (Guo, 2014). Como resultado, la proteína forkhead box O1 (FoxO1) es fosforilada, evitando su translocación al núcleo y la transcripción de sus genes diana, específicamente los implicados en la gluconeogénesis [Jitrapakdee, 2012]. Por otra parte, por la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c (SREBP1c) factor de transcripción es activado lo cual redundará en la transcripción de genes lipogénicos [Ferré and Fofelle, 2010].

En individuos sanos la insulina estimula la lipogénesis y suprime la gluconeogénesis. En contraste con los sujetos resistentes a insulina, en el que se la señalización de insulina permanece estimulando la lipogénesis, pero no suprime la gluconeogénesis [Li et al., 2008]; Este fenómeno es conocido como resistencia selectiva a la insulina, y explica las principales características de la DM2, hiperglucemia, hiperinsulinemia, la hipertrigliceridemia, y su coexistencia en lipodistrofia, esteatosis hepática y problemas cardiovasculares [Li et al., 2008; Garg, 2000; Semple et al., 2009].

Bajo el esquema de resistencia selectiva a la insulina, la señalización del receptor de insulina a través del sustrato de receptor de insulina (IRS)/PI3K/PKB/FoxO1 para suprimir la gluconeogénesis es disfuncional, pero se mantiene la señalización a través de SREBP1c. Sin embargo, en estudios dirigidos en ratones con inhibición del receptor de insulina específicos del hígado (LIRKO) se desarrolla una resistencia severa a la insulina, pero carecen de esteatosis hepática, lo que sugiere vías de señalización divergentes en la estimulación de la lipogénesis y la inhibición de la gluconeogénesis [Li et al., 2008]. Esto sugiere que la divergencia en la señalización de insulina puede ser río abajo de PI3K/PKB. En humanos, las mutaciones en el receptor de insulina conducen a un fenotipo similar al de los ratones LIRKO, con severa resistencia a la insulina, hiperinsulinemia e hiperglucemia, pero no niveles elevados de Triglicéridos (TG) séricos [Semple et al., 2009]. Sin embargo, las mutaciones en PKB en seres humanos llevan a la resistencia a la insulina en términos de fracaso para suprimir la gluconeogénesis, pero con elevación de DNL hepática, con esteatosis hepática asociada e hipertrigliceridemia [Semple et al., 2009]. Considerando a este conjunto de fenómenos bioquímicos como “la paradoja de los lípidos”.

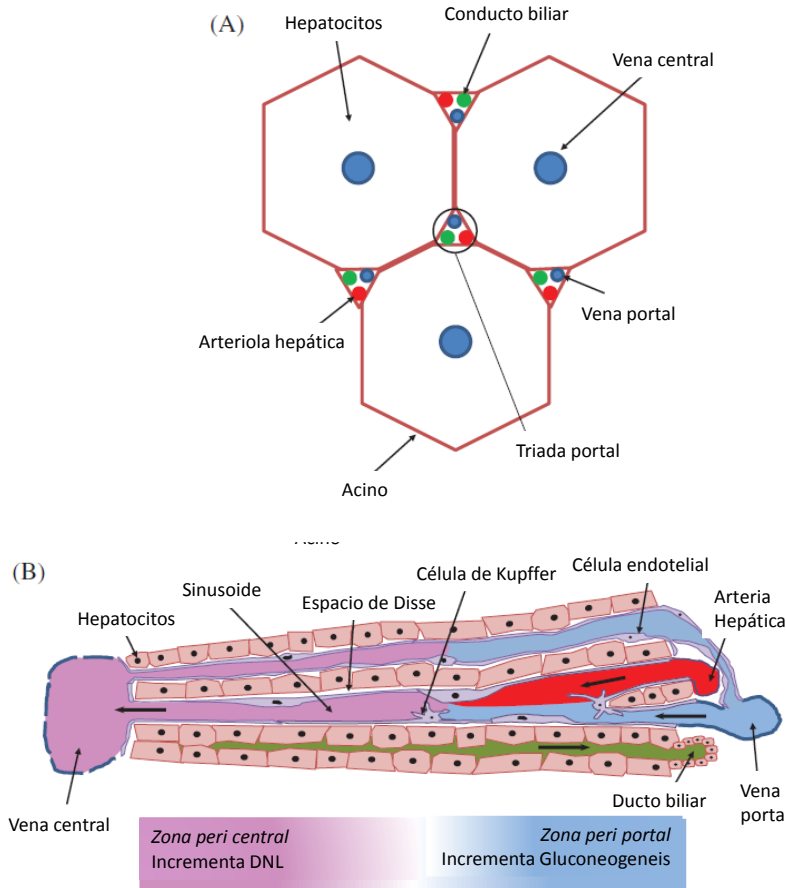
### 2.3. Teorías acerca de la lipogénesis hepática en resistencia a insulina

#### 2.3.1 *Localización anatómica de los procesos metabólicos en el hígado*

Recientemente se ha propuesto una teoría de localización anatómica para explicar la sensibilidad mantenida de la DNL hepática a la estimulación de insulina en presencia de resistencia a la insulina, cuando falta la supresión de la gluconeogénesis hepática [Hijmans et al., 2013]. En ésta propuesta, la glucosa y el metabolismo de las grasas están "localizados" a lo largo del eje peri central de las unidades funcionales del hígado; los acinos [Katz, 1992; Jungermann and Keitzmann, 1996]. Para entender esto, se delimita la anatomía del flujo sanguíneo hepático, con la sangre que fluye desde la vena portal y la arteriola hepática en los límites del acino hepático, a lo largo de los sinusoides para salir por las venas

centrales de los acinos [Esquema 1; Ishibashi et al., 2009]. Las células alrededor de las venas porta se describen como periportales, y las que rodean la vena central como pericentrales [Jungermann and Keitzmann, 1996; Ishibashi et al., 2009]. Esta alternativa a la vía de señalización intracelular dicotómica de la resistencia selectiva a la insulina abarca a la DNL pericentral, la resistencia a la insulina periportal y la falta de supresión de gluconeogénesis [Hijmans et al., 2013].

Para apoyar esta perspectiva de un eje portocentral de la resistencia a la insulina, existen pruebas en relación a la progresión de la enfermedad hepática grasa no alcohólica. Aunque los estudios sobre la localización de esteatosis hepática son limitados, en ratones genéticamente obesos [Wiegman et al., 2003, Hijmans et al., 2013], y en humanos, con depósitos de TG en áreas pericentrales, se ha descrito dicha progresión la cual involucra células intermedias y luego hepatocitos periportales a medida que avanza la enfermedad [Chalasani et al., 2008; Hijmans et al., 2013]. Esto lleva a la hipótesis de que hay una captación preferencial de ácidos grasos libres (AGL) por hepatocitos periportales más que por parte de los pericentrales, a través de un mecanismo conocido como de "primer paso" [Hijmans et al., 2013]. Estos AGL se liberan del tejido adiposo bajo la acción de la lipasa sensible a hormona, exponiéndose a hepatocitos por circulación periportal inicialmente, y después el propio flujo hepático los expone a las células pericentrales [Bass, 1990]. Sin embargo, al producirse una resistencia a la insulina de distribución zonal, habrá mayores tasas de lipogénesis en hepatocitos periportales, así como en hepatocitos pericentrales. Por lo que esta teoría sigue siendo una propuesta para explicar en parte el tan complejo mecanismo de formación lipídica en resistencia a insulina hepática.



**Esquema 1. El acino hepático y la localización de la DNL y gluconeogénesis.** (A) Citoarquitectura simple del parénquima hepático. Los lóbulos hepáticos consisten en acinos hexagonales con una vena central y triadas portales en las interfaces de los acinos. (B) Una sección transversal del tejido hepático a lo largo del eje portocentral, demuestra la localización propuesta de los procesos metabólicos, con la zona pericentral como el sitio principal de la lipogénesis de *novo* (DNL) y la zona periportal como el sitio principal para la gluconeogénesis. Las células endoteliales forman las paredes de la sinusoide que también contiene macrófagos conocidos como células de Kupffer. Según lo indicado por las flechas, la sangre fluye desde el área portal a través de la sinusoide hacia la vénula hepática. La bilis fluye en la dirección opuesta de los hepatocitos a través de los conductos biliares. Tomado y modificado de Sanders et al., 2016.

### 2.3.2 Lipogénesis hepática independiente de insulina

Se discute y se proporciona evidencias que clarifica el entorno de la paradoja lipídica, basados en la observación de que el hígado de pacientes con DM2 siguen sintetizando activamente los triglicéridos a pesar de ser resistentes a los efectos de la insulina, en base a la síntesis de triglicéridos y de ácidos grasos (AG) preformados en independencia de la señalización hepática de insulina [Vatner et al., 2015].

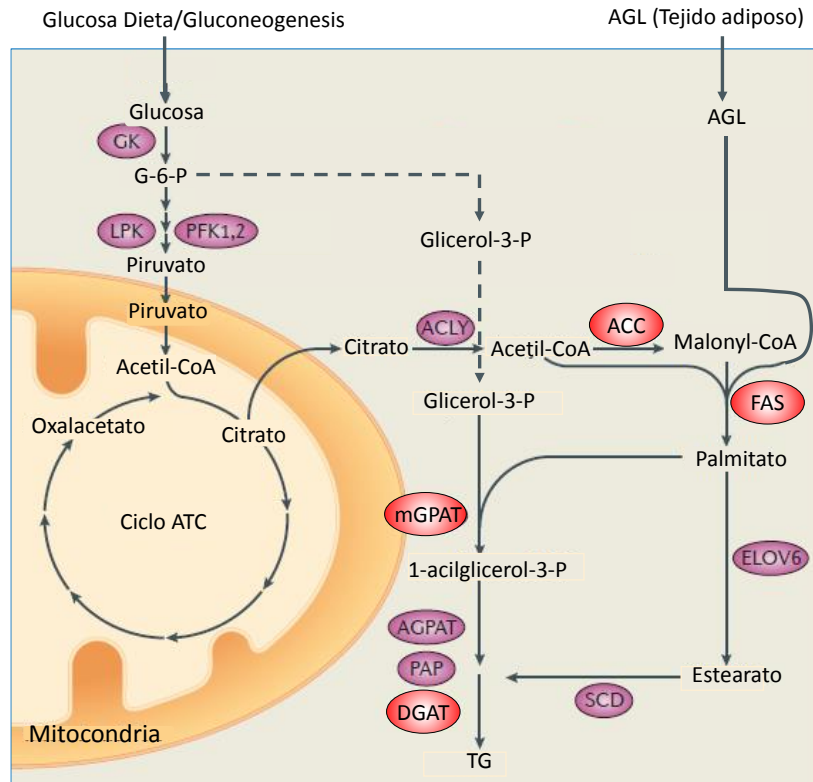
Estos investigadores desarrollaron un método de espectrometría de masa en tándem acoplado a cromatografía líquida, para medir las tasas de esterificación de AG *in vivo* variando niveles de estos en el plasma afectando sus tasas de esterificación hepática en modelos LIRKO resistentes a insulina y de baja expresión del receptor de la hormona en el tejido, encontrando que la tasa de transformación de AG a triglicéridos, dependen principalmente del flujo de AG preformados, lo cual se produce independientemente de la acción de la insulina en hígado [Vatner et al., 2015].

#### 2.4. Lipogénesis hepática.

La lipogénesis hepática *de novo* es una vía biosintética fundamental en el hígado, que contribuye al almacenado y secreción de lípidos por los hepatocitos [Jensen-Urstad and Semenkovich, 2012]. Este proceso es una extensión de las complejas redes metabólicas hepáticas, y se propicia por sustratos derivados principalmente de la glucólisis y el metabolismo de los hidratos de carbono. Es importante destacar que esto conduce a una acumulación de productos DNL, cadenas de acilos grasos ligadas a la coenzima A, que se pueden incorporar a una gran diversidad de especies lipídicas. Estos lípidos pueden entonces tener otras funciones metabólicas, que a su vez son nocivas en casos DNL elevada. Se ha sugerido que el aumento de DNL contribuye a la patogénesis de la enfermedad de hígado graso no alcohólico [Donnelly et al., 2005], una enfermedad metabólica con alta prevalencia, relacionada con el desarrollo de la DM2. La DNL también se incrementa en condiciones de resistencia a la insulina [Ameer et al., 2014]. Esto es especialmente importante, ya que la evidencia reciente sugiere que la prediabetes, un estado de glucemia ligeramente elevada, ha aumentado significativamente de 11.6% (2003) a 35.3% (2011) en adultos de Inglaterra [Mainous et al., 2014]. Por lo tanto, puede ser crucial para comprender y asignar el espectro completo de trastornos metabólicos asociados con la resistencia a la insulina, incluyendo las tasas de DNL.

La DNL es la síntesis de cadenas de AG a partir de subunidades acetil-CoA producidas durante la glicolisis [Smith and Tsai, 2007] y pueden sufrir posterior condensación a cadenas de glicerol [Coleman and Lee, 2004]. El mecanismo de reacción comienza con la producción de malonil-CoA a partir de un precursor de acetil-CoA, bajo la actividad catalítica regulada de acetil-CoA carboxilasa (ACC) [Bianchi et al., 1990]. El malonil-CoA mediante diferentes reacciones, que involucran al complejo multienzimático de la ácido graso sintasa tipo I (FAS) y otra molécula sustrato de acetil-CoA [Smith, 1994], producen acil coA, la incorporación de precursores marcados con isótopos estables de tritio a partir de  $3\text{H}_2\text{O}$  en hígado de seres humanos y de rata se exhiben como el producto principal DNL al pimitato. [Foster and Bloom, 1963].

Si bien, la glucólisis proporciona acetil-CoA como el principal sustrato para la DNL, existen intermediarios como el gliceraldehído que es posteriormente fosforilado por triquinasa para producir gliceraldehído 3-fosfato (G3P) [Mayes, 1993]. Durante la síntesis de *novo* de triacilglicerol se da la acilación de glicerol-3-fosfato, generando ácido lisofosfatídico (LPA). Este paso es catalizado por glicerol-fosfato acil transferasa (GPAT) [Coleman and Lee, 2004]. El LPA es acilado adicionalmente por otro acil-CoA, bajo la catálisis de acilglicerol-fosfato acil transferasa (AGPAT) [Aguado and Campbell, 1998], produciendo ácido fosfatídico (PA). Ésta es desfosforilada por la acción de Fosfatidato fosfatasa (PAP) para generar diacilglicerol (DG). Se utiliza una acil-CoA final para acilar el DG a un TG, por medio de la actividad catalítica de la diacilglicerol acil transferasa (DGAT), para así dar paso a la formación final de triacilgliceridos. [Shi and Cheng, 2008]. Este proceso se resume en el esquema 2.

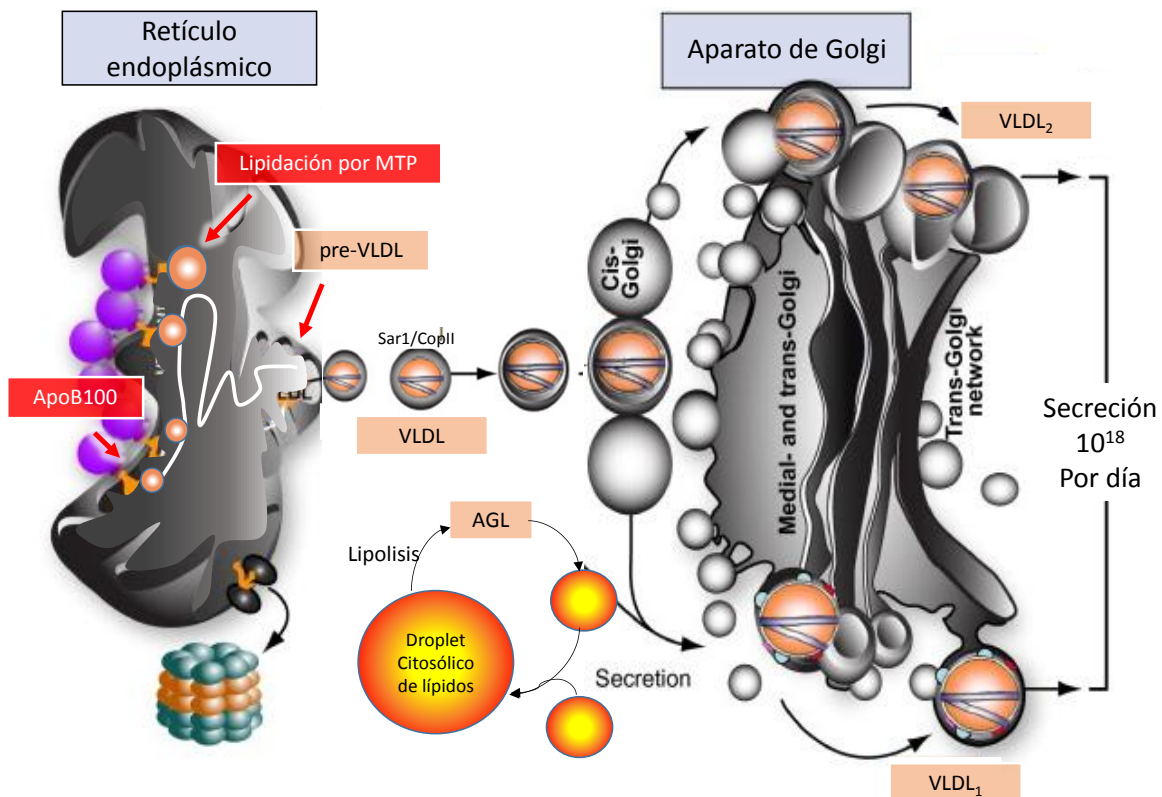


**Esquema 2. Vías metabólicas para la síntesis de ácidos grasos y Triglicéridos.** La glucosa absorbida por la célula se convierte en piruvato a través de la glucólisis. El piruvato se convierte además en acetil-CoA y entra en el ciclo de ácido tricarboxílico (TCA) (producción de energía). El exceso de acetil-CoA convertido en citrato puede salir de las mitocondrias y se convierte en el sustrato de las enzimas lipogénicas. Las principales enzimas implicadas incluyen a la acetil-CoA Carboxilasa (ACC) y la Sintasa de ácidos grasos (FAS). Las principales enzimas implicadas en la esterificación y producción de Triglicéridos (TG) incluye a la Glicerol-3-fosfato acil transferasa mitocondrial (mGPAT) y a la Diacil glicerol acil transferasa (DGAT). Tomado y modificado de Wang et al., 2015.

Una vez que se han sintetizados los TG, tienen que ser transportados hacia el exterior del hígado por medio de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Las VLDL son complejos que contienen tanto lípidos como proteínas, y sirven como vehículo de exportación lipídica de hepatocitos durante la DNL. Estas se componen de una monocapa externa de fosfolípidos (PLs) y colesterol no esterificado primordialmente, y en su núcleo de lípidos neutros (principalmente TGs) [Olofsson et al., 2000; Sundaram and Yao, 2010]. En la superficie de las VLDLs se encuentra apolipoproteína B 100 (apoB100) que es esencial en el montaje y producción de VLDL [Sparks, Sparks and Adeli, 2012]. Varias fuentes indican que la DNL puede conducir a un aumento del tamaño de VLDL (aproximadamente 130 nm) pero no al

número de partículas de VLDL segregadas [Grefhorst et al., 2002; Choi and Ginsberg, 2011].

La producción de VLDL es un proceso de dos etapas con una translocación inicial de apoB100 a través de la membrana del retículo endoplásmico (ER) [Rustaeus et al., 1999]. Durante este proceso interactúa con la proteína de transferencia de triglicéridos microsomales (MTP), que ayuda a la lipidación parcial del polipéptido apoB100 naciente, inhibiendo su degradación [Sparks et al., 2012]. Esta apoB100 parcialmente lipidica es la VLDL primordial, o pre-VLDL, que posteriormente forma la partícula VLDL propia de la segunda fase de biogénesis [Rustaeus et al., 1999]. Esto ocurre mediante una lipidación posterior de apoB100. En este proceso la mayor parte de la lipidación se produce a través de la fusión con gotitas de lípidos neutros en el lumen ER [Wang et al., 2007]. La producción y maduración de VLDL se resume en el esquema 3.



**Esquema 3. Formación y maduración de VLDL.** Una vez formada la VLDL en el Retículo endoplásmico (RE), gracias a la lipidación de la Apoproteína B100 (apoB100) por la proteína de transferencia de triglicéridos microsomales (MTP). Desde el ER las VLDL son transportadas a la cis-Golgi por vesículas de transporte especializado VLDL (Sar1/CopII). Dentro del Golgi, la apoB100 es glicosilada y fosforilada. Las partículas de VLDL son segregadas a partir de hepatocitos en el espacio de Disse por fusión de vesículas secretoras con la

membrana sinusoidal. A partir de aquí, las VLDL fluyen hacia la circulación. Adaptado y modificado de Olofsson et al., 2007

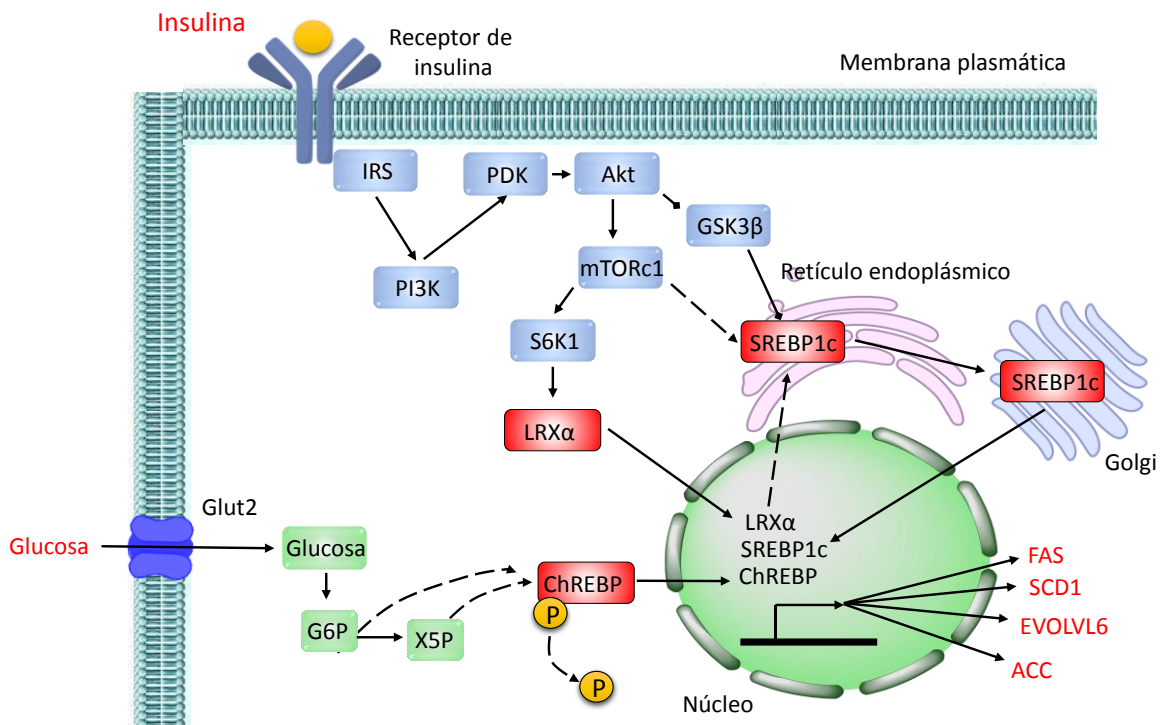
## 2.5. Regulación de la lipogénesis hepática

La vía lipogénica está dada por una doble regulación: la transcripción de enzimas integrantes de la síntesis de AG y la regulación alostérica de la ACC. La DNL particularmente, tiene dos principales vías de activación: SREBP1c, y por la proteína de unión a elementos de respuesta de carbohidratos (ChREBP). Estas dos vías se activan por medio de la señalización por insulina y el aumento de las concentraciones de glucosa, respectivamente; Ambos inducidos por la ingesta de alimentos [Kawano and Cohen, 2013; Oosterveer and Schoonjans, 2014].

En el contexto de la DNL, la actividad de SREBP1c es regulado por la insulina, aunque su mecanismo aún no es completamente elucidado. Sin embargo, se conoce que la activación de SREBP1c ocurre a través de dos vías principales río abajo del receptor de insulina, ambas implican la ruta PI3K/PKB, aunque una es resultado de la fosforilación en el SREBP1c naciente, y la otra resulta de la activación del receptor hepático X (LXR), predominantemente la isoforma LXR $\alpha$  en el hígado (Esquema 4) [Kawano and Cohen, 2013]. La acción de la insulina a través de esta vía de PI3K/PKB promueve así la fosforilación naciente de SREBP1c en el Aparato de Golgi, llevando a una acumulación de la forma madura de SREBP1c en núcleo [Hegarty et al., 2005]. SREBP1c a su vez activa DNL a través de la transcripción de varios genes implicados en la síntesis de AG, incluyendo FAS y ACC [Magaña et al., 1996; 1997]. (Figura 3)

ChREBP, en contraste con SREBP1c, se activa por el aumento postprandial de glucosa en hepatocitos. La tasa de glucólisis en éstas células aumenta debido al equilibrio citosólico - plasmático de glucosa a través de la proteína de la familia del transportador de glucosa independiente de la insulina, GLUT2 [Mueckler y Thorens, 2013]. La activación de ChREBP parece ser estimulada por una serie de moléculas generadas durante la glicólisis, aunque el mecanismo exacto no está claro; se ha sugerido que la regulación principal de ChREBP es a través de la desfosforilación

de Ser196 y otros sitios de fosforilación de la proteína quinasa A (PKA) o quinasa activada con monofosfato de adenosina (AMPK), lo que conduce a la disociación de la proteína en el citosol, la translocación a núcleo y activación de genes que contienen el elemento de respuesta a los carbohidratos (ChoRE) [Uyeda and Repa, 2006]. Sin embargo, los cambios en el estado de fosforilación pueden no ser el único mecanismo de regulación. El resultado de esta ruta aún no definida es la regulación positiva de genes que contienen el ChoRE, incluyendo aquellos genes que codifican proteínas integrales de la vía DNL tales como FAS, ACC y también piruvato quinasa, que proporciona el precursor de acetil CoA como sustrato lipogénico a través de la actividad de la piruvato deshidrogenasa [Ma et al., 2005]. (Esquema 4)



**Esquema 4. Regulación de la lipogénesis de *novo* por LXR- $\alpha$ , SREBP1c y ChREBP.** La activación del receptor de insulina conduce a la fosforilación del sustrato 1 del receptor a insulina (IRS1), que posteriormente activa la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), a cinasa dependiente de fosfoinositido (PDK1), diana del complejo 1 de rapamicina de mamífero (mTORC1), la cual activa a la proteína ribosómica S6 quinasa 1 (S6K1), que conduce a la localización nuclear del receptor X del hígado  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ), así de manera directa o indirecta mTORC1 ayuda a la maduración de SREBP1c desde RE hasta Golgi, promoviendo su translocación a núcleo. Por otro lado, la vía glicolítica produce intermediarios que conducen a la desfosforilación de ChREBP y disocian a la proteína citosólica, conduciendo a ChREBP nuclear y la posterior transcripción de sus genes lipogénicos diana. Líneas continuas (vía directa), líneas discontinuas (vía indirecta). (Tomado y modificado de Sanders et al., 2016.).

## 2.6. Fisiopatología de resistencia a insulina

La resistencia a insulina es un síndrome heterogéneo caracterizado por anomalías en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Las causas de estas patologías son multifactoriales e incluyen tanto elementos genéticos y ambientales que afectan la función de las células beta y tejidos (músculo, hígado, tejido adiposo, páncreas) sensibles a la insulina. Aunque existe un considerable debate en cuanto a las contribuciones relativas de la disfunción de las células beta y la reducción de la sensibilidad a la insulina en la patogénesis de la diabetes, se acepta en general que estos dos factores juegan un papel importante. Sin embargo, los mecanismos que controlan la interacción de estos dos trastornos no son claros. Un número de factores ambientales han sido relacionados y sugeridos como posibles factores de riesgo para el desarrollo de resistencia a la insulina y la disfunción de las células beta; entre los principales se encuentran: el envejecimiento, el sedentarismo, la obesidad, el consumo de alcohol, el tabaquismo. [Ozougwu et al., 2013]. Sin embargo en la última década, un número de estudios han demostrado los efectos nocivos de los contaminantes de metales pesados y el desarrollo de patologías metabólicas. También hay informes de que la contaminación ambiental, causada por estos contaminantes del aire, suelo y agua, es un factor de riesgo importante para la enfermedad de hígado graso aunque la mayoría de estos datos se obtuvieron a partir de modelos animales o en estudios *in vitro*, cada vez hay más interés en cómo la exposición a sustancias ambientales pueden contribuir al desarrollo de diabetes que está dada principalmente por la presencia de resistencia a insulina, estudios epidemiológicos y experimentales muestran que la exposición contaminante ambiental de cadmio (Cd), está asociada con la hiperglucemia, diabetes y resistencia a insulina.

## 2.7. Cadmio como factor de riesgo para el desarrollo de resistencia a insulina

Numerosos estudios a corto plazo y largo plazo en modelos *in vivo* de exposición a Cd han demostrado causar hiperglucemia e interrumpir la homeostasis de la

glucosa en los animales de experimentación, mostrando efectos diabetogénicos [Edwards and Prozialeck, 2009; Lei et al., 2007]. Sin embargo, los resultados de estudios poblacionales sobre el cadmio y el riesgo de desarrollo de diabetes, síndrome metabólico y resistencia a insulina debido a que la mayor parte de estos estudios encuentran relación entre niveles séricos de cadmio con el desarrollo de dichas patologías en trabajadores ocupacionales expuestos al metal, que por otro lado, diversos trabajos no encontraron una relación estadísticamente significativa [Feng et al., 2015; Liu et al., 2015; Menke et al., 2016; Son et al., 2015; Swaddiwudhipong et al., 2010a; Swaddiwudhipong et al. 2010b]. El mecanismo exacto de acción de interrupción inducida por Cd sobre la homeostasis de la glucosa y lípidos es desconocido, sin embargo está claro la asociación que tiene la exposición de cadmio con el desarrollo de patologías metabólicas.

## 2.8. Generalidades del cadmio

El Cd forma parte del grupo 12 de la tabla periódica, pertenece a los metales de transición y su valencia es de 2, de número atómico 48 y masa atómica de 112.4 g/mol, comparte características con zinc (Zn) y mercurio en sus propiedades químicas y físicas, de hecho, el Cd se aisló primero y se identificó como una impureza en carbonatos de Zn (por ejemplo,  $\text{ZnCO}_3(s)$ ). El cadmio se presenta como un metal divalente de color blanco azulado que es suave y maleable. Así mismo, este metal tiene una configuración electrónica  $d^{10}$  estable ( $[\text{Kr}] 4d^{10}5s^2$ ) y puede existir en el estado de oxidación +1, pero se encuentra casi exclusivamente con valencia +2, en el entorno natural. El punto de fusión es  $321,07^\circ\text{C}$ , mientras que el punto de ebullición corresponde a  $767^\circ\text{C}$ , con una densidad igual a  $8.65\text{ g/cm}^3$  a  $20^\circ\text{C}$ . Sus vapores son 3.88 veces más pesados que el aire, ya que la presión de vapor es relativamente alta, pasa fácilmente a este estado (gaseoso), oxidándose rápidamente a óxido de Cd que permanece en el aire. Cuando en la atmósfera hay gases o vapores reactivos, como el bióxido de carbono o de azufre, vapor de agua, trióxido de azufre o ácido clorhídrico, el óxido de Cd reacciona con ellos y produce respectivamente carbonato, sulfito, sulfato, hidróxido y cloruro de Cd, [ATSDR, 2008; 2012; IARC 2008; Williams, 2002].

## 2.9. Fuentes de exposición a cadmio

### 2.9.1 Fuentes naturales

El Cd se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre en una concentración promedio de 0.1 mg/kg; que es aproximadamente 650 veces menor que su vecino del grupo 12, el Zn; sin embargo, en las rocas sedimentarias su concentración es más elevada, normalmente asociándose a sulfuros de Zn con niveles promedio de 500 mg/Kg [Irving and Williams, 1948]. Gracias a la erosión, los ríos y principalmente los océanos reciben al Cd movilizado de la corteza terrestre y el flujo atmosférico. La forma predominante de Cd en el océano se encuentra en la fase disuelta con concentraciones que van de 1 a 1000 pmol/kg. [González et al., 1997], asociado a este hecho, las descargas de desechos biológicos por la industria hacen a la flora y fauna marina un blanco principal de contaminación de grandes cantidades de Cd, por lo que su ingesta en el humano es una condición “natural”, siendo los de mayor aporte: el pescado, crustáceos y mariscos [González et al., 1997]. El estimado mundial de emisiones de Cd a la atmósfera sugieren que de los ~1,400 toneladas al año liberadas, un 60% del total puede atribuirse a emisiones volcánicas [Nriagu, 1990]

### 2.9.2. Fuentes Ocupacionales

El hombre colabora con un promedio de ~2,983 toneladas por año, contaminando primordialmente suelos de cultivo, propiciando la aparición del metal en la dieta del humano y animales de consumo [Nriagu, 1988]. Esta contaminación con Cd se produce indirectamente a través del procesamiento de minerales no ferrosos, la combustión de combustibles fósiles, la incineración de basura y directamente a través de la fabricación, uso y eliminación de productos que contienen Cd. La liberación del Cd al ambiente está ligada al procesamiento de minerales primarios ricos en cobre, plomo y principalmente Zn, de forma que los

niveles de producción son en gran medida independientes de la demanda mundial de Cd. [Chizhikov et al., 1966; Nriagu, 1980]

La fabricación de baterías recargables (níquel-cadmio, Ni-Cd) sigue siendo la principal aplicación industrial de Cd. Esta batería goza de uso generalizado porque, en comparación con otras tecnologías recargables, el Ni-Cd puede; 1) soportar una descarga profunda sin dañar, 2) tolerar ciclos de recarga-descarga durante su vida útil. [Nriagu, 1980].

Otra fuente no ocupacional de suma importancia, es el tabaquismo; en este producto de consumo el metal se inhala principalmente como óxido de cadmio. La acumulación de Cd en las plantas de tabaco puede variar ampliamente: las concentraciones medias son 1-2 mg/g de peso seco o 0.5-1 mg por cigarrillo. La concentración de Cd en los fumadores, es 4-5 veces mayor en la sangre en comparación con los no fumadores [Jarup et al., 1998; Elinder et al., 1983].

Dadas las condiciones de contaminación del ambiente por el xenobiótico, es inminente su presencia en alimentos de diversa naturaleza, y por lo tanto la presencia en el humano. Los alimentos son la fuente de exposición más importante al metal en personas no expuestas de forma ocupacional. Aunque, el consumo de alimentos es en general menos eficiente que el consumo de agua o la exposición al aire contaminado, en los diversos alimentos el metal se une a péptidos y proteínas de bajo y alto peso molecular, lo cual facilita su absorción, encontrándose en un amplio intervalo de concentraciones. Sin embargo, los productos marinos los que contienen mayor cantidad de Cd/g de tejido, seguidos de vísceras de mamíferos y carne de aves, cereales, así como en vegetales. Los alimentos con menor contenido son el huevo y la leche [González et al., 1997; ATSDR, 2012; IARC, 2008].

## 2.10. Vías de entrada del Cd al organismo

El Cd puede acceder al organismo a través de pulmones, piel y tracto gastrointestinal (GI). La vía dérmica se ha descrito como una forma de contaminación, la piel bajo ciertas circunstancias es un órgano que se ha descrito se encuentra ampliamente expuesto, trabajos *in vitro* ha demostrado mejores

efectos del metal; sin embargo, *in vivo* la exposición es extremadamente baja. La absorción per cutánea de cloruro de Cd presente en agua y suelo, se ha demostrado a través de la piel humana utilizando muestras de piel de cadáver, sin embargo, el resultado no excede el 0.6%. Por lo tanto, esta vía de entrada puede ser motivo de preocupación sólo en situaciones en las que, soluciones concentradas estén en contacto con la piel durante varias horas en inclusive días o meses. [Wester et al., 1992]

Por otro lado, la absorción de Cd por pulmones es más efectiva que en el intestino. Después de la exposición por inhalación, la absorción de los compuestos Cd varía en dependencia de sus propiedades físico-químicas, el sitio de depósito en los pulmones y el tamaño de partícula [Misra et al., 1996]. Las partículas grandes, como los polvos (> 10  $\mu\text{m}$  de diámetro) tienden a depositarse en las vías respiratorias superiores, mientras que partículas pequeñas, tales como el humo de cigarrillo o de combustibles fósiles (aproximadamente 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro) penetran en los alvéolos, que son el sitio principal de absorción. Entre 50-100% de Cd presente en los alvéolos se transfieren a la sangre.

En la población humana, la cantidad promedio de Cd absorbida por los pulmones no es mayor que  $\sim 0.2 \mu\text{g}$  por día basado en la suposición de que hasta el 50% del Cd retenido es absorbido [Morgan et al., 1997]. El Cd inhalado se disuelve parcialmente en el recubrimiento del tracto respiratorio, en el cual se puede encontrar al Cd en partículas, o como ion libre o en complejos proteicos para ser secretados unidos al glutatión [Blum et al., 2014]. El glutatión es un antioxidante propio de la respuesta celular, actuando como un quelante del metal y otros xenobióticos. En principio el cadmio puede ser absorbido de forma transcelular, vía canales, transportadores y endocitosis, o de forma paracelular. Así mismo, el transporte transcelular de Cd libre se ha asociado a transportadores de metales divalentes tipo 1 (DMT1), así como a transportadores de Fe y Zn, como es el caso de ZIP8. Adicionalmente, el flujo de Cd de manera paracelular, es un tanto más limitado ya que su absorción por esta vía implica disrupción de uniones adherentes, lo cual lleva a la pérdida del tejido o a inflamación severa [Jumarie, 2002; Napolitano et al., 2012].

En este mismo sentido el tracto GI es una ruta continuamente expuesta en los humanos. El consumo de bajas concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  (5 mg/kg de peso), ha mostrado incrementos en la proliferación celular e inflamación, mientras que concentraciones de exposición mayores a los 80 mg/kg de peso disminuye el número de células y causa disfunción del sistema inmune [Kundu et al., 2009; Blum et al., 2014]. El mecanismo completo de absorción del metal en el intestino permanece sin ser dilucidado, sin embargo, se conoce que Cd puede competir con metales esenciales como el hierro y su la deficiencia, el cadmio este puede ser mejor absorbido en el GI, los sitios anatómicos asociados a la mayor absorción son principalmente el íleon y el duodeno [Brako et al., 2003; Ohrvik et al., 2013]. Esto puede ser explicado debido a la correlación entre el incremento de la absorción intestinal del metal y la expresión de DMT1, el cual precisamente es inducido por la disminución de Fe sérico o de reserva, y que por mecanismos compensatorios el intestino expresa un mayor número de transportadores DMT1 [Zoller et al., 2001].

Otras proteínas que parecen ser buenos candidatos para la absorción de Cd a nivel de duodeno son las proteínas transportadoras de zinc en su isoforma 14 (ZIP14), la cual tiene la facultad de transportar al Cd con alta afinidad [Girijashanker et al., 2008], y los canales TRPV6 selectivos de Ca [Kovacs et al., 2011]. Además de la absorción de Cd, este metal puede ser absorbido en forma de complejos entre el Cd con péptidos y proteínas ricas en cisteínas, como Cd-MT (Cd-Metalotioneina), Cd-fitoquelatinas (Cd-PC) y Cd-glutación (Cd-GSH), las cuales pueden ser absorbidas de forma intacta por los enterocitos, posiblemente por transcitosis [Langelueddecke et al., 2014].

## 2.11. Distribución

Toda vez que el Cd es absorbido por la barrera intestinal, entra al flujo sanguíneo. El cadmio en sangre puede estar unido tanto a proteínas séricas y eritrocitarias. Los principales órganos en donde el cadmio se acumula son el hígado y los riñones, representando conjuntamente alrededor del 50-75% de cadmio corporal [Nordberg and Kjellström, 1979]. La concentración y la acumulación más

alta en tejido, en exposiciones crónicas se da en riñones. Secundariamente el depósito del metal se da en músculo y hueso en concentraciones relativamente superiores, con respecto a los que se encuentran en testículo y bazo. Adicionalmente se conoce que, el cadmio tiene una vida media biológica muy larga en los tejidos, que ha sido estimado en más de diez años para la mayoría de ellos [Tsuchiya, 1976; Nordberg, 2004].

En circulación el cadmio se une principalmente a albúmina, metalotioneínas, así como a proteínas de alto y bajo peso molecular que contengan tioles; la proporción plasmática de cada una de ellas dependerá del tiempo y del tipo de exposición. Durante una fase temprana, la unión de Cd se da con proteínas de pesos de entre los 40 – 60 kDa (mayoritariamente, albúmina) [Trisak et al., 1990], mientras que en las fases tardías de una exposición este metal se encuentra primordialmente unido a proteínas de bajo peso molecular como MT's y glutatión, [Erk and Raspor, 1998]

## 2.12. Cadmio en páncreas

La presencia de complejos proteicos con Cd en circulación, no sólo afectan las funciones hepáticas y renales si no que, otros órganos y tejidos son expuestos y también lo pueden recapturar, aunque en menor medida, tal es el caso de corazón, sistema linfático, neuronas, cerebro, pulmones y páncreas. Siendo éste último un órgano poco estudiado ante los efectos crónicos de la exposición a Cd [Nordberg, 2004].

La glándula endócrina o islotes de Langerhans del páncreas constituyen del 1 al 2% de su volumen total. Las distintas células endócrinas que componen al islote producen y secretan diferentes hormonas: las células beta ( $\beta$ ) secretan insulina, las células alfa ( $\alpha$ ) glucagón, las células delta ( $\delta$ ) somatostatina, las células PP polipéptido pancreático, y las células épsilon ( $\epsilon$ ) que secretan ghrelina. La absorción y distribución de Cd en páncreas es poco entendido, no existe evidencia contundente del transporte del mismo al órgano, debido a que los estudios al respecto son limitados. Sin embargo la participación de transportadores de metales

divalentes tipo 1 (DMT1) se ha podido demostrar en páncreas, sin embargo, se ha observado que el mecanismo de captura en otros órganos también involucra a transportadores de Zn, como ZIP14, ZIP8, y canales de calcio voltaje dependiente (VGCC, por sus siglas en inglés), que se encuentran altamente expresados tanto en las células  $\alpha$ , como en las  $\beta$  pancreáticas. Una vez transportado el metal al interior de las células pancreáticas, actúa como un potente inductor de MT's. En páncreas, la homeostasis del Zn y Ca se ve alterada por la presencia de Cd, dicho aumento influye directamente en la dinámica de secreción de insulina y por lo tanto en la homeostasis de glucosa. Existe una dinámica directamente proporcional entre la cantidad de MT en páncreas y la inhibición en la secreción de insulina. [Waalkes et al., 1992; Schwartz and Reis, 2000].

En modelos animales, se ha observado que ante exposiciones sub-crónicas a Cd (0.5-2.0 mg/kg/día), propician destrucción de islotes pancreáticos, relacionándose con eventos de necrosis y apoptosis en páncreas [Prozialeck and Edwards, 2010; Chang et al., 2013]. La disminución en la secreción de insulina por efectos del Cd se ha tratado de explicar de diferentes formas, una de las teorías con mayor aceptación refiere que al acumularse el metal en la células  $\beta$ -pancreáticas, puede difundir hacia las vesículas de preproinsulina, e incluso en las que contienen insulina, desplazando al Zn de los enlaces disulfuro que unen a las fracciones peptídicas de la hormona. Este cambio estructural produce una insulina no funcional, afectando la regulación de los niveles séricos de glucosa. Dicha hipótesis fue comprobada al lograr la cristalización del complejo insulina-Cd y retar dicho complejo a un modelo animal insulino requiriente en el cual no presentó acción biológica positiva en relación a la regulación de la glucosa [Treviño et al, 2015].

Así mismo Treviño en 2015 [Tesis Doctoral] ante exposiciones sub-crónicas del metal en modelos murinos (2mg /kg/día) durante 3, 4 y 5 meses, observó que las células  $\beta$  mostraron una dinámica antioxidante importante en cuanto al manejo de los agentes agresores incrementando la concentración de GSH y MT; adicionalmente la actividad de las enzimas SOD, CAT y GST se incrementó dependiente del tiempo de exposición, evitando de esta manera la senescencia y

muerte del tejido, el cual inducía la respuesta MAPK de p38, JNK y ERK 1/2, en donde esta última fue la de mayor relevancia ya que se encuentra íntimamente relacionada con la sobrevivencia celular, conllevando en la hiperplasia no maligna de las células  $\beta$ .

### 2.13. Cadmio en hígado

El hígado es un importante órgano metabólico para el manejo *in vivo* del Cd, pero se sabe poco sobre los transportadores metálicos y los mecanismos moleculares implicados en la captación del metal. En trabajos con hepatocitos aislados y líneas celulares de hígado humano se han demostrado dos posibles vías de captación: una es para la forma libre (iónica) de Cd ( $\text{Cd}^{2+}$ ) y la otra para la forma complejada de  $\text{Cd}^{2+}$  [Pham et al., 2004]. El  $\text{Cd}^{2+}$  es más probable que sea absorbido por los mismos transportadores metálicos que las células del hígado usan para adquirir metales fisiológicamente esenciales, especialmente  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ . Entre este tipo de transportadores se encuentra el DMT-1, que se expresa débilmente en el hígado [Gunshin et al., 1997; Fujishiro et al., 2009]. Los transportadores metálicos de la familia de proteínas similares a Zrt/Irt, tales como ZIP8 y ZIP14 [Girijashanke et al., 2008, Fujishiro et al., 2009] también se expresan en el hígado, y pueden movilizar al metal. Adicionalmente, existen informes que han postulado la captación de  $\text{Cd}^{2+}$  por canales de calcio dependientes del voltaje en las células hepáticas [Hughes et al., 1993]. Complementariamente, algunos estudios *in vitro* han demostrado que el complejo Cd-MT puede acceder a las células del hígado por endocitosis mediada por receptores [Hao et al., 2007].

Recientemente Sabolić et al., en 2010 demostraron que el complejo Cd-MT no es movilizado por hepatocitos de rata *in vivo* por el mecanismo antes mencionado [Sabolić et al., 2010]; dicho fenómeno es mediado por las células de Kupffer, que endocitan al Cd-MT, lo que podría conducir a la liberación de diversas citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Sin embargo, hasta ahora no se ha identificado ningún mecanismo molecular concreto para este proceso. Por lo tanto, no se sabe mucho sobre la absorción de Cd por el hígado, aunque es bien conocido que el tejido hepático lo

almacena. El Cd en hígado de humanos varía entre 1.5 - 8 mg/g peso seco dependiendo de edad, sexo, exposición ambiental, etc., que es 10-20 veces más bajo que en el riñón [Elinder et al., 1976; Satarug et al., 2002; Vuori et al. 1979]. Esta diferencia es sorprendente teniendo en cuenta que el hígado es el primer órgano al que se dirige después de la captación oral a Cd.

Tomando en cuenta que el Cd es hepatotóxico después de una exposición crónica, el daño es menos prominente que el renal [Friberg, 1950; Nomiya et al., 1979; Stowe et al., 1972]. La inducción de MT y GSH sirven como hepatoprotectores, por lo que sólo se han reportado ligeras alteraciones morfológicas y funcionales, asociadas con la exposición crónica a Cd, estas proteínas quelan (y por lo tanto inactivan) al Cd, evitando el estrés oxidativo [Habeebu et al., 200; Zahir et al., 1999]. Por otra parte, los complejos Cd-MT y Cd-GSH pueden ser liberados a la circulación y a la bilis [Dudley et al., 1985; Chan et al., 1993]. Liu et al., 2009, cuestionaron el papel de la formación de ROS en la hepatotoxicidad crónica (y carcinogénesis), durante la exposición a largo plazo a Cd a dosis bajas, concluyendo que los mecanismos adaptativos, incluyendo la inducción de MT, GSH, y antioxidantes celulares podrían disminuir el estrés oxidativo inducido por Cd. En resumen, el hígado tiene una gran capacidad de reserva e inducción de sistemas antioxidantes, además de poseer mecanismos capaces de excretar complejos de Cd luminalmente en la bilis y basolateralmente a la circulación. Esto puede explicar el menor contenido de Cd del hígado en comparación con el riñón (el cual es limitado en dicho proceso), además de explicar por qué la hepatotoxicidad ligada a Cd no se ha informado en los seres humanos. Sin embargo, no se pueden excluir que las alteraciones sutiles de la función hepática, que se pueden producir durante la exposición crónica a Cd, y que no pueden ser detectadas por biomarcadores hepáticos.

#### 2.14. Cadmio, Resistencia a insulina y lípidos

Diversos estudios en animales han demostrado que el Cd puede disminuir la función exocrina y endócrina del páncreas. En ratas y ratones la presencia del metal ha mostrado daño a las células  $\beta$  pancreáticas, reducción en la tolerancia a glucosa,

supresión de la secreción de insulina y efectos diabetógenos [Lei et al., 2007; Chang et al., 2013]. Así mismo, en fumadores se ha asociado el desarrollo de hiperglicemias o diabetes mellitus con el incremento de los niveles de Cd sanguíneo, respecto a los pacientes no fumadores [Afridi et al., 2008; Chen et al., 2009]. El mismo efecto ha sido observado en investigaciones epidemiológicas de trabajadores expuestos a aerosoles o polvos del metal [Lei et al., 2006; 2007].

Por otra parte, Treviño en 2015; mediante el uso de modelos matemáticos, determino como el Índice HOMA-IR mostró resistencia a insulina periférica, como una situación de multiresistencia en los tejidos insulino-dependientes e independientes (principalmente hígado). Así mismo, la exposición crónica a cadmio evidenció un cambio en la expresión de la insulina, lo cual correlacionó con los indicadores matemáticos de generación de la hormona y la pérdida de la función de las células  $\beta$ , sin embargo el uso de modelos matemáticos tiene sus limitaciones, y aunque se pone de manifiesto la presencia de resistencia a insulina, no se conoce a nivel molecular como se encuentra su vía de señalización [Treviño et al., 2015].

La exposición a cadmio se ha asociado también con alteraciones en la concentración de lípidos séricos y tisulares, en los que se incluyen AGL, TG, fosfolípidos y colesterol total (CT), en modelos experimentales agudos y crónicos [Alvarez et al., 2007; Larregle et al. 2008; Murugavel et al., 2007,b; Olisekodiaka et al. 2012; Rogalska et al. 2009; Treviño et al., 2015]. Estudios recientes en nuestro laboratorio se ha encontrado la existencia de dislipidemias en ratas expuestas a intoxicaciones crónicas a Cd, las cuales están caracterizadas por una hipercolesterolemia progresiva respecto al tiempo de exposición, e hipertrigliceridemia sostenida a lo largo del estudio, asociadas con la disminución progresiva de HDL-col, con cambios en su fenotipo y composición lipídica y un incremento proporcional de las fracciones LDL-col y VLDL-col [Sarmiento-Ortega et al., 2016].

### 3.- Planteamiento del problema

La prevalencia de la resistencia a insulina como uno de los primeros eventos involucrados en patologías crónico degenerativas como la DM2 se presenta en el 23.7% de la población mundial; esta puede variar ampliamente en diferentes poblaciones, llegando en las México-Americanas a ser de hasta el 58.3%. Por lo que, se han asociado diversos factores de riesgo en el curso temporal del desarrollo de la resistencia a insulina, en donde la exposición a contaminantes ambientales como el cadmio es poco estudiada, comprendida y contemplada por los organismos internacionales. Una de las principales consecuencias de la resistencia insulina es el hígado graso no alcohólico, que resulta por el incremento constante de los niveles de triglicéridos séricos y hepáticos; ya que este órgano es el encargado de la síntesis *de novo* lipídica; sin embargo, se desconoce si existe una desregularización en las vías de señalización lipogénicas en estados de resistencia a insulina ante la exposición oral y crónica de cadmio.

## **4.- Justificación**

Patologías como la resistencia a insulina (RI), dislipidemias y disglucemias cobran un alto impacto a la sociedad, a través de la pérdida de la salud y calidad de vida. La RI es punto clave y convergente en la mayoría de enfermedades crónicas degenerativas como síndrome metabólico, hígado graso no alcohólico, enfermedades cardiovasculares y DM2.

Debido a que la etiología de la RI es un conjunto de diferentes factores, dentro de los cuales nuestro grupo de trabajo ha mostrado evidencias de como la exposición a Cd está involucrada, a través de disglucemia, dislipidemia e hiperinsulinemia, la comprensión del mecanismo o mecanismos por los cuales se desarrolla RI, y como esta se halla íntimamente ligada a la paradoja lipogénica se vuelve de suma de importancia

## **5.- Objetivo General**

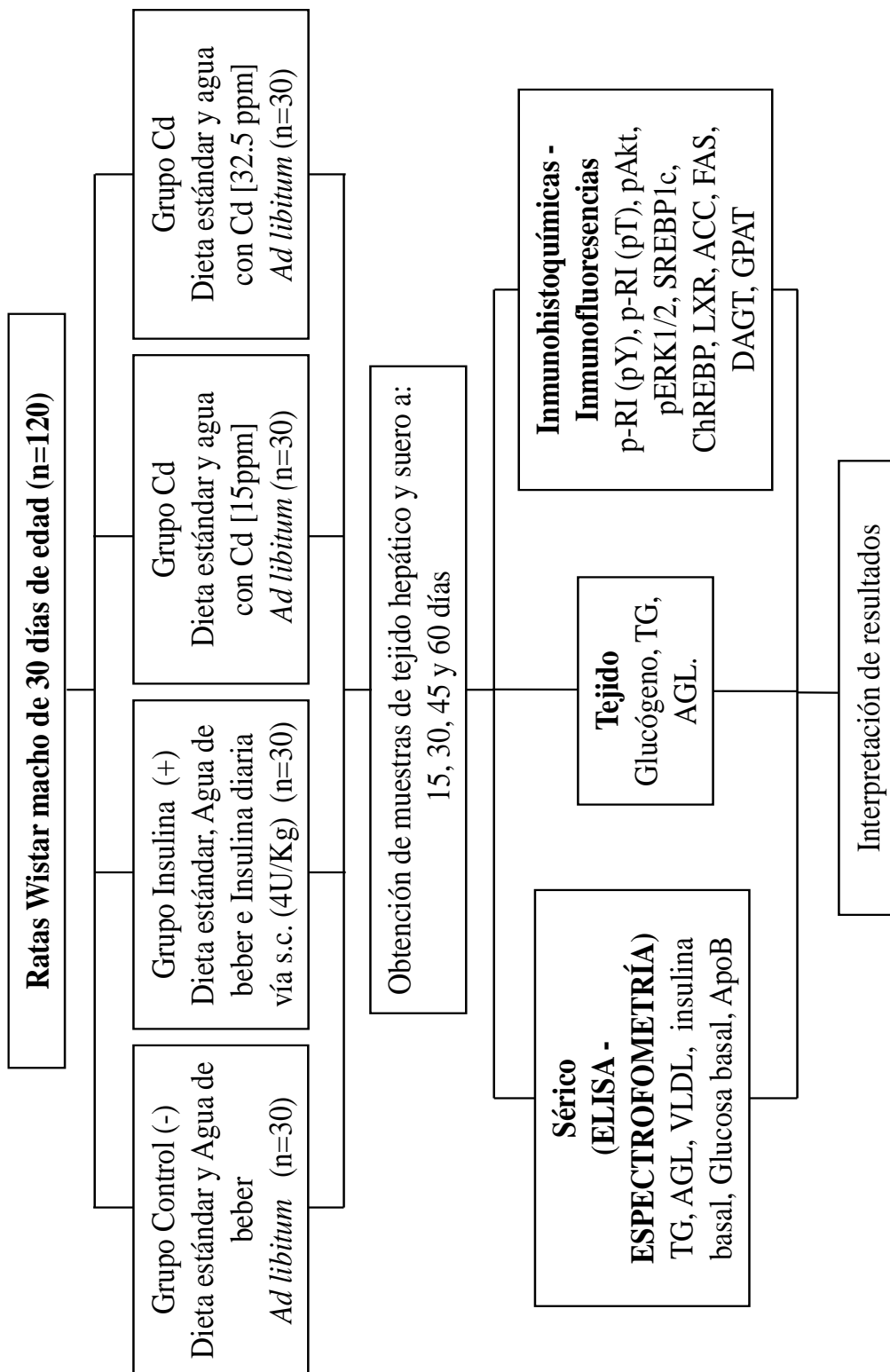
Evaluar el desarrollo de RI hepática y su relación en la ruta lipogénica en ratas Wistar expuestas a Cd en agua de consumo.

## **6.- Objetivos particulares**

En tejido hepático de ratas Wistar de los grupos experimentales expuestos a Cd:

- 1.- Evaluar el curso temporal del desarrollo de resistencia a insulina.
- 2.- Evaluar las proteínas afectadas en la ruta de señalización de insulina involucradas en la lipogénesis.
- 3.- Monitorear el comportamiento de los factores de transcripción que regulan la lipogénesis.
- 4.- Establecer el curso-temporal de la desregulación lipogénica hepática.

## 7.- Diseño experimental



## 8.- Materiales y Métodos

### Animales

Se emplearon 120 ratas de la cepa Wistar con un periodo de destete de 15 días y con un peso de 50 a 70 g. Los animales fueron obtenidos del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales se pesaron continuamente hasta que alcanzaron 100 g lo que equivalió aproximadamente a 15 días de acondicionamiento, se mantuvieron bajo condiciones controladas con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y temperatura de 19 – 26°C, en jaulas de polipropileno con una cama de aserrín con disponibilidad de alimento y agua “Ad libitum”. Todos los procedimientos efectuados siguieron las normas de acuerdo a la “Guía para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio” de México y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales.

### Conformación de grupos

Las 120 ratas se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos; un grupo control (n=30), un grupo expuesto a CdCl<sub>2</sub> en agua de consumo a una concentración de 15 ppm (n=30), un grupo expuesto a CdCl<sub>2</sub> en agua de consumo a una concentración de 32.5 ppm (n=30) y por último un cuarto grupo insulina, al cual se le aplicó insulina diaria de la marca “Glargina” que es un análogo de una insulina humana de larga duración a una dosis de 4U/kg de peso del animal por vía subcutánea. Estas condiciones fueron continuas durante 0, 15, 30, 45 y 60 días después del periodo de acondicionamiento.

### Zoometría (Peso, talla, índice de masa corporal y porcentaje de grasa)

Los animales de experimentación fueron monitoreados semanalmente respecto de sus medidas corporales. El peso fue medido con una balanza digital tarada con una caja de policarbonato y aserrín. La talla se midió con ayuda de una cinta métrica flexible, esta fue tomada de la base de la cola a la punta de la nariz. El índice de masa corporal (IMC), se calculó con la fórmula: peso/talla<sup>2</sup>. El

porcentaje de grasa fue determinado con base al Índice de Lee % de grasa corporal =  $[(\text{Peso (0.33) en g})/\text{talla en cm}] \times 100$  [Rogers and Webb, 1980].

## Obtención de las muestras

### Muestras sanguíneas

Un total de 5 animales de cada subgrupo fueron sacrificados a los 0, 15, 30, 45 y 60 días después de los diferentes tratamientos. 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 10000 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.

### Tejido hepático

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 8000 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, triglicéridos, colesterol total y sus fracciones lipoproteicas de alta y baja densidad (HDL y LDL) fueron analizadas en un espectrofotómetro automatizado AutoKemII con reactivos de la marca Spinreact, según las indicaciones del productor (Ver Anexos 4 y 5). Los niveles de lipoproteínas

de muy baja densidad VLDL, fueron obtenidas por la siguiente ecuación  $VLDL = CT - (HDL + LDL)$  [Warnick et al., 1990].

La concentración de insulina sérica fue determinada por inmunoensayo de ELISA (Diagnóstica Internacional, Mex) (Anexo 6), 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  $\mu\text{U/mL}$ . 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 respuesta pancreática.

La concentración de la apolipoproteína B (ApoB) se cuantificó a través de kit comercial (BioSystems) (Anexo 7) y se analizó con un equipo BTS-350 (Biosystem, Applied analizador). La concentración de AGL se determinó de acuerdo con el método descrito por Brunk y Swanson 1981 (Anexo 8), el análisis se realizó en un espectrofotómetro modelo Lambda EZ150 PerkinElmer a una longitud de onda de 620 nm.

## 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:

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

## Ensayos Tisulares

100 mg del tejido hepático se homogenizo en 800 µL de SSI y se procedió a la determinación de TG siguiendo el protocolo descrito en el kit comercial (Anexo 9), para la determinación de AGL se sigio la técnica Brunk y Swanson 1981 ya mencionada, después de una extracción de lípidos en 100 mg de tejido mediante la tecina de Folch en 1956 (Anexo 10). La concentración de Glucógeno se determinó mediante la técnica descrita por Bennett en 2007 (Anexo 11).

## Estudios Histológicos

Los tejidos obtenidos tras la hepatotectomía se fijaron en formalina buferada a pH de 7.4 al 4%. Paso seguido se procedió a la deshidratación de las muestras eliminando gradualmente el agua de los tejidos por medio de lavados con xilol y alcohol y finalmente se realiza la impregnación con parafina hasta la completa inclusión del tejido, tomando en cuenta la orientación del tejido. Los tejidos fueron cortados en un micrótopo Leica RM2125 a un grosor de 5 µm y colocados en portaobjetos previamente embebidos en poli-L-lisina al 0.1%, resguardándose hasta su uso para las diferentes técnicas utilizadas (Anexo 12).

## Inmunohistoquímica

Las laminillas con los tejidos se rotularon adecuadamente, se desparafinaron con calor seco en una estufa de 58–60°C, enseguida se llevó a cabo la hidratación, las muestras se sumergieron en xilol, para quitar el exceso de parafina (5 min),

nuevamente xilol (15 lavados), posteriormente alcohol 50%-xilol 50% (15 lavados), alcohol absoluto (15 lavados), alcohol absoluto (15 lavados), alcohol al 96% (15 lavados), y por último, se lava con agua destilada (3 lavados) y se mantuvo en hidratación en buffer de fosfatos (PBS 0.1M). Se procedió a la recuperación antigénica, la cual se realizó con Diva Decloaker de BioCare dilución 1:10 a 60°C por 30 min. Se prosiguió con la inactivación de la peroxidasa endógena. Las laminillas con las muestras, se les agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3 %, incubándolo durante 10 min. Se retiró el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se realizaron tres lavados con agua destilada. Se realizó el bloqueo con una solución de albúmina bovina libre de inmunoglobulinas al 2% en solución salina isotónica en frío. Después de lavar se colocó el anticuerpo primario diluido en albúmina libre de inmunoglobulina al 1%, por toda la noche, posteriormente se lavó el exceso del Ac primario y se colocó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa en las mismas condiciones de dilución por 2 horas, se lavó el exceso y se procedió al revelado con diaminobencidina (DAB). Para realizar el contraste de coloración de las muestras, se realizó el siguiente procedimiento: 1 baño en hematoxilina (tinción de núcleo); al término, se enjuagaron 3 veces en agua corriente hasta quitar el exceso de hematoxilina. Después, se realizaron 10 lavados en carbonato de litio, para un mejor contraste y más brillo y nitidez en la coloración de los núcleos. Luego, se llevó a cabo el proceso de deshidratación de las muestras de la siguiente manera: alcohol al 96% (15 lavados), alcohol al 96% (15 lavados), alcohol absoluto (15 lavados), alcohol absoluto (15 lavados), alcohol 50%-xilol 50% (15 lavados), xilol (15 lavados), xilol (15 lavados). En este último, se dejaron las laminillas listas para ser inmersas en resina sintética y cubiertos con cubreobjetos. Este protocolo fue aplicado para: **SREBP1-c** (sc-8984, Santa Cruz Biotechnology), **ChREBP** (sc-8984, Santa Cruz Biotechnology) y **LXR- $\alpha$**  (sc-34386, Santa Cruz Biotechnology). Las fotografías obtenidas fueron analizadas por el programa ImageJ, previa transformación a escalas de grises y posterior análisis de píxeles en la zona de interés. Previamente se construyeron curvas de calibración de píxeles para cada tejido con marca positiva. (Anexo 13).

## Inmunofluorescencia

Las laminillas con tejidos se rotularon adecuadamente, se desparafinaron con calor seco en una estufa de 58 – 60°C. Se llevó a cabo la desparafinación, sumergiendo las muestras en xilol, para quitar el exceso de parafina (5 min), enseguida nuevamente xilol (15 lavados), posteriormente alcohol 50%-xilol 50% (15 lavados), alcohol absoluto (15 lavados), alcohol absoluto (15 lavados), alcohol al 96% (15 lavados), y por último, se lavó con agua destilada (3 lavados) y se mantuvo en hidratación en buffer de fosfatos (PBS 0.1M). 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 deja enfriar. Se realizó el bloqueo con una solución de albúmina al 2% en solución salina isotónica en frío. Se lavó y se colocó el anticuerpo primario diluido en albúmina libre de inmunoglobulina al 1%, por toda la noche, posteriormente se lavó el exceso del Ac primario y se colocó el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo en las mismas condiciones de dilución, únicamente por 2 horas, siempre en oscuridad, para teñir los núcleos se utilizó DAPI y se protegen con vecta shield. Este protocolo fue aplicado para: **RI-pY1361** (Abcam, ab60946), **RI-pT1375** (Abcam, ab192657), **Akt-pS473** (sc-101629, Santa Cruz Biotechnology) **ERK1/2-pThr202/Tyr204** (sc-16982, Santa Cruz Biotechnology), **ACC- $\alpha$**  (sc-26817, Santa Cruz Biotechnology), **FAS** (sc-20140, Santa Cruz Biotechnology), **DGAT2** (sc-66859, Santa Cruz Biotechnology), **GPAM** (sc-162674, Santa Cruz Biotechnology). Las fotografías obtenidas fueron analizadas por el programa ImageJ, de acuerdo a su previa transformación a escalas de grises y posterior análisis de píxeles en la zona de interés; previamente se construyeron curvas de calibración de píxeles para cada tejido con marca positiva. (Anexo 14).

## 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 Origin versión 7.0, con el cual se realizó una comparación entre grupos control y grupos problema de cada uno de los tiempos de exposición a Cd

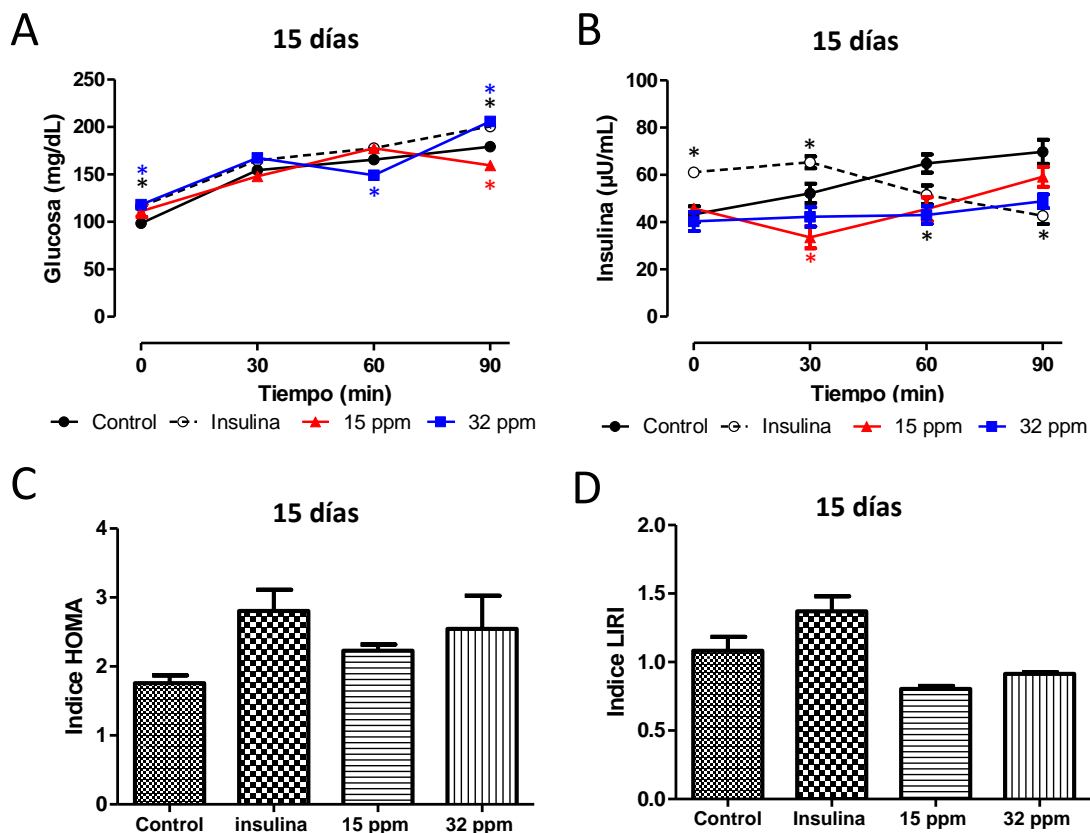
(0, 15, 30, 45 y 60 días respectivamente), por medio del estadístico ANOVA de una vía y posterior análisis de Bonferroni. Un nivel de significancia menor del 0.05 ( $p \leq 0.05$ ) fue considerado significativamente diferente.

## 9. – Resultados

### Tolerancia a la glucosa e índices de resistencia a insulina

El monitoreo del primer cohorte a 15 días de exposición en los diferentes grupos, (**Figura 1A**) mostró que durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa (TOG), los niveles basales de glucosa incrementaron para los grupos insulina (18%) y los expuestos con 32 ppm de Cd (20%). Así mismo al minuto 90 del análisis de TOG se observaron nuevamente incrementos significativos para el grupo insulina (12%) y 32 ppm (15%). La respuesta insulínica por su parte (**Figura 1B**), incrementó en el grupo insulina al tiempo 0 minutos en 41%, al minuto 30 en 25% con respecto al grupo control; mientras que los grupos expuestos a Cd en las dos concentraciones (15 y 32 ppm) exhibieron pendientes negativas desde el 0' hasta el 30'. El grupo con 32 ppm de Cd a los 30' mostró una disminución estadísticamente significativos del 36%, el resto de la curva fue similar en todos los grupos experimentales comparados con el control. Durante este periodo no se presentaron cambios significativos para los índices de resistencia HOMA-IR y LIRI respectivamente (**Figura 1C y 1D**).

Para el tiempo cohorte de 30 días de exposición, los grupos insulina, 15 y 32 ppm de Cd mostraron incrementos significativos de la concentración de glucosa basal (**Figura 2A**) que correspondieron a 17%, 26% y 15%, respectivamente; al minuto 30 de la post carga los animales expuestos a Cd exhibieron incrementos para los grupos con 15ppm (25%) y 32 ppm (30%). Para el monitoreo a los 60 y 90 minutos, se observaron incrementos en los grupos: insulina (35% y 18%), 15 ppm (29% y 11%) y 32 ppm (53% y 48%), comparado contra el grupo control. Por su parte, la curva de respuesta de insulina (**Figura 2B**), mostró un incremento significativo (82%) en ayuno (punto basal); al minuto 30, 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

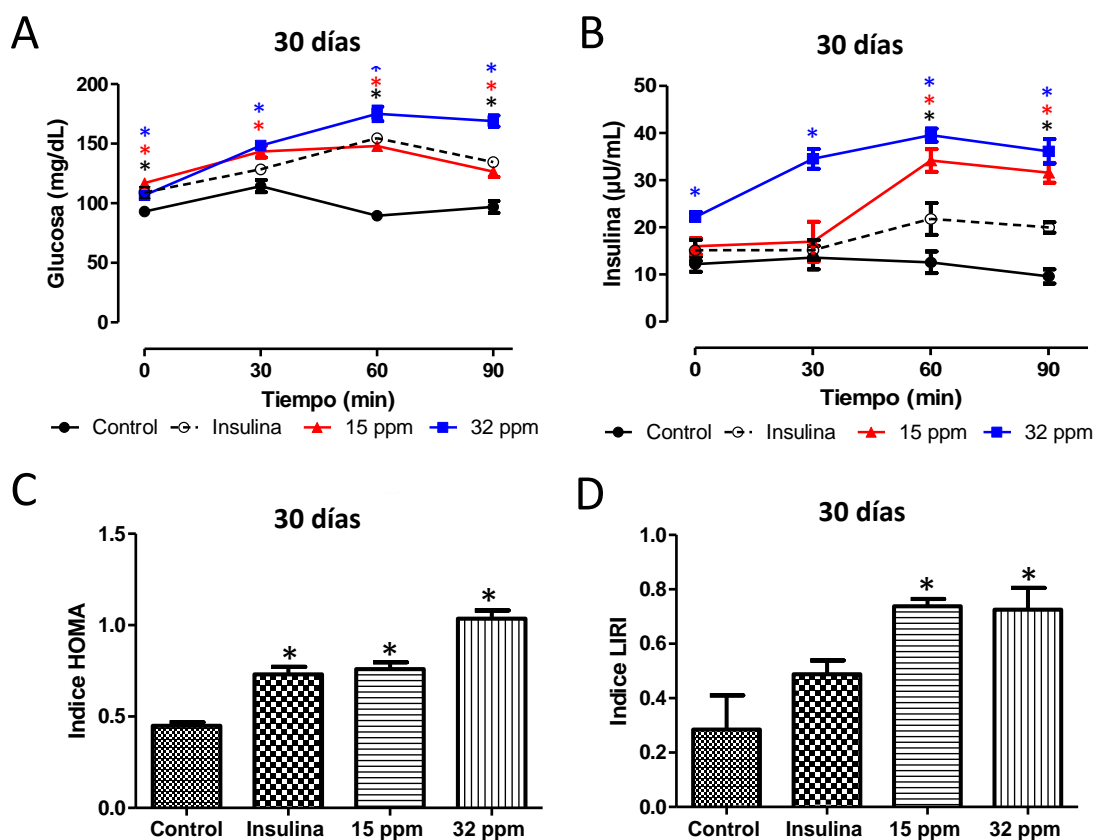


**Figura 1.- Tolerancia a la glucosa y Resistencia a la Insulina a los 15 días de exposición.** A) Tolerancia oral a la glucosa. B) Respuesta de insulina a glucosa. C) HOMA-IR D) LIRI. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos  $\pm$  EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

(172%) y 32 ppm (214%); por ultimo al minuto 90 del monitoreo, los grupos insulina, y Cd 15ppm y 32 ppm se mantuvieron incrementados en 108%, 230% y 276%, respectivamente. Mientras que el indicador de resistencia HOMA-IR (**Figura 2C**), 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 2D**), incrementó significativamente sólo en los grupos administrados con Cd 15 ppm (160%) y 32 ppm (157%) respecto al grupo control.

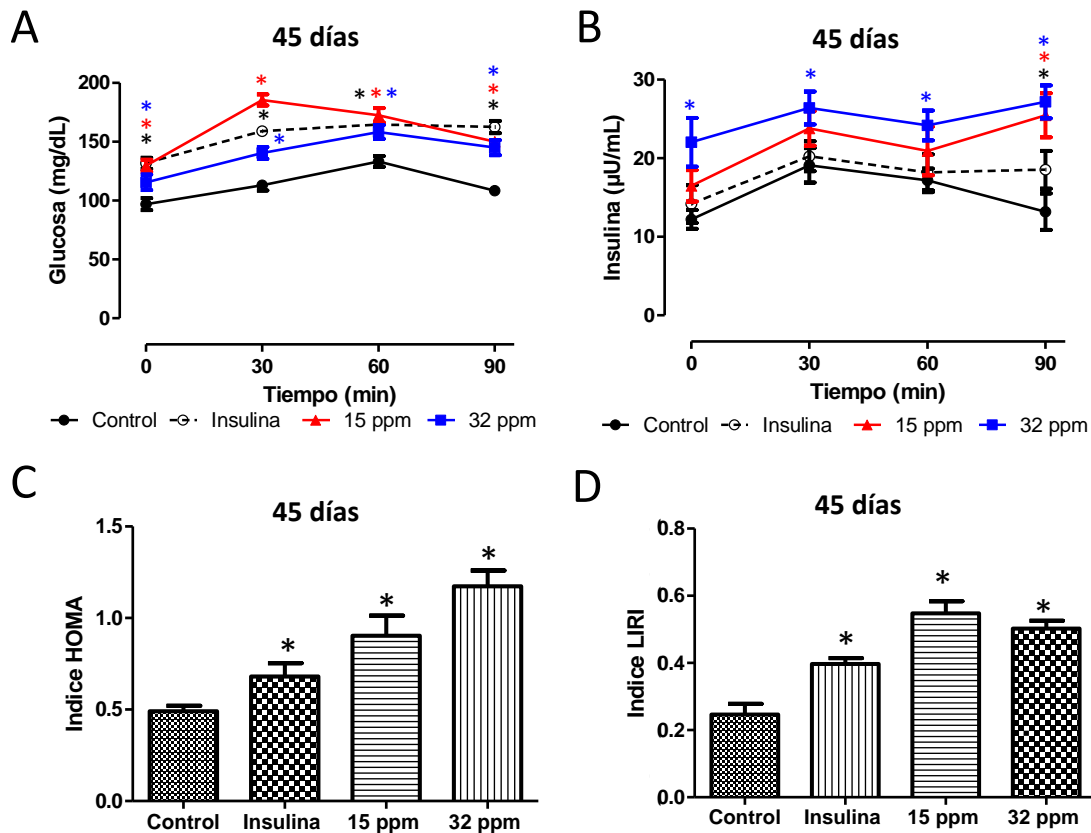
Al día 45 de exposición (**Figura 3A**) los grupos experimentales mostraron incrementos significativos en la concentración de la glucosa en ayuno que correspondieron a 36% (insulina), 34% (15 ppm) y 19% (32 ppm). Posterior a la carga de glucosa, los incrementos de glucosa observados fueron al minuto 30 en el grupo insulina (41%), 15 ppm (64%) y 32 ppm (24%); finalmente a los minutos 60 y

90 los animales mostraron incrementos del orden de 23% y 50%, 29% y 38%, 19% y 34% para los grupos insulina, 15 ppm y 32 ppm, respectivamente en relación al grupo control. Por su parte la concentración de insulina (**Figura 3B**) en ayuno mostró un incremento sólo en el grupo de 32 ppm en 81%, grupo en el cual se mantiene elevada el resto de la post-carga de glucosa, a los 30' (38%), 60' (41%) y 90' (105%). Mientras que, los grupos insulina y con 15 ppm de Cd mostraron únicamente tendencias a incrementar a los tiempos 30 y 60 minutos, mientras que al minuto 90 se mostraron incrementados en un 40% (insulina) y 93% (15 ppm).



**Figura 2.- Tolerancia a la glucosa y Resistencia a la Insulina a los 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. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.**

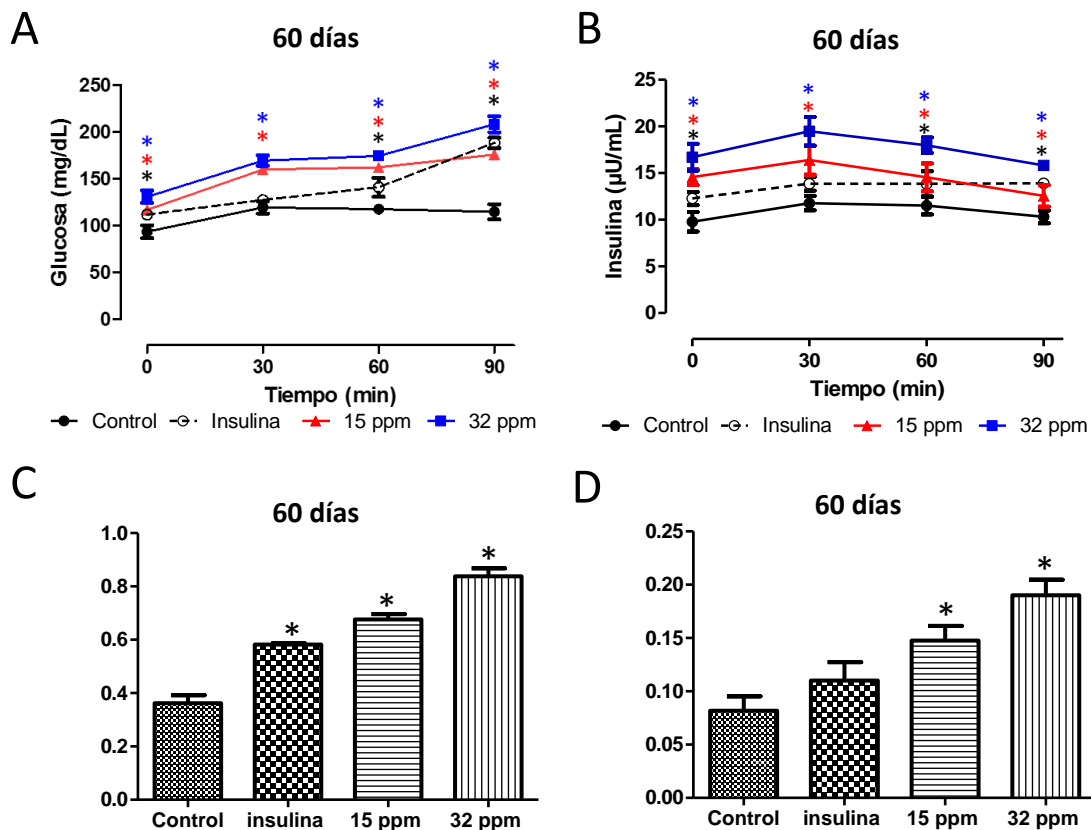
Debido a esto, el análisis de resistencia a insulina por el índice HOMA-IR (**Figura 3C**) mostró aumentos significativos en los diferentes grupos correspondiendo a 39% en el grupo insulina, a 84% en el grupo 15 ppm y 124% en el grupo 32 ppm, mientras que el índice LIRI (**Figura 3D**) incrementó significativamente en un 63%, 125% y 108%, respectivamente.



**Figura 3.- Tolerancia a la glucosa y Resistencia a la Insulina a los 45 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. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

En el último tiempo de experimentación 45 días (**Figura 4A**), se observaron incrementos en la concentración basal de glucosa de 20% (insulina), 25% (15 ppm) y 40% (32 ppm) para los diferentes grupos experimentales, mismos que se mantuvieron durante toda la curva en el caso de los grupos expuestos a cadmio, en 15 ppm correspondiendo a 34%, 42% y 53%, mientras que para 32 ppm correspondieron a 38%, 48% y 81%, a los minutos 30, 60 y 90 respectivamente. En

el grupo administrado con insulina el incremento se observó únicamente a los 60 (20%) y 90 (64%) minutos. Con respecto a la respuesta endógena de insulina, se observaron incrementos similares tanto en condiciones basales, como en el post prandio (**Figura 4B**), donde los cambios más importantes fueron en los grupos expuestos, los que correspondieron a 49%, 39%, 26% y 22% en los animales expuestos a 15 ppm y en los expuestos a 32 ppm fueron de 71%, 65%, 56% y 53% a los minutos 0, 30, 60 y 90. Por último, el grupo insulina tuvo incrementos de 26%, 18%, 20%, 35% respectivamente. El índice HOMA-IR (**Figura 4C**) mostró incrementos para los grupos insulina (61%), 15 ppm (86%) y 32 ppm (130%). Por último, el índice LIRI (**Figura 4D**) sólo mostró incrementos significativos respecto al grupo control en los grupos expuestos a cadmio con 15 ppm (133%) y 32 ppm (216%).

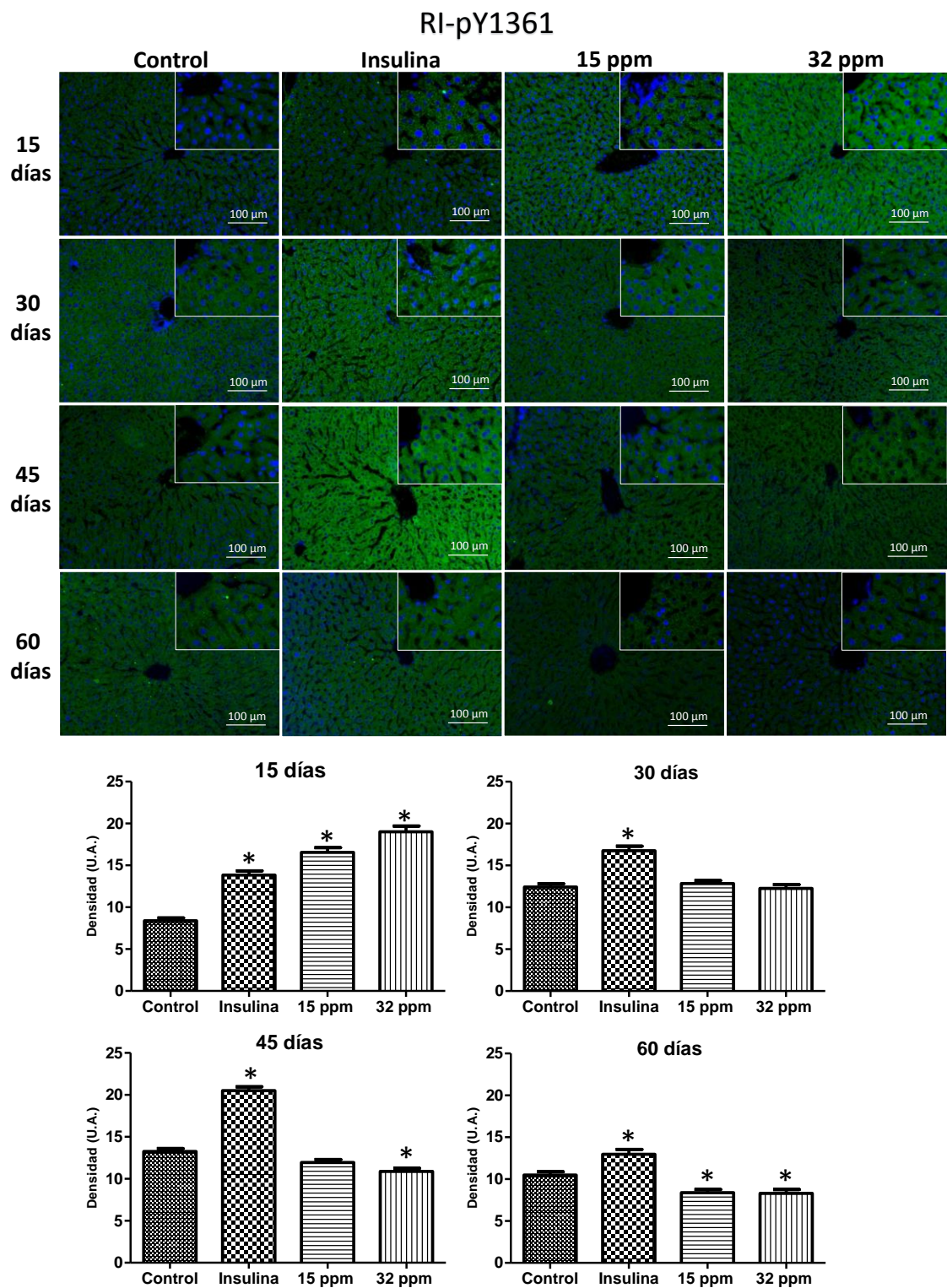


**Figura 4.- Tolerancia a la glucosa y Resistencia a la Insulina a los 60 días de exposición.** A) Tolerancia oral a la glucosa. B) Respuesta de insulina a glucosa. C) HOMA-IR D) LIRI. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos  $\pm$  EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

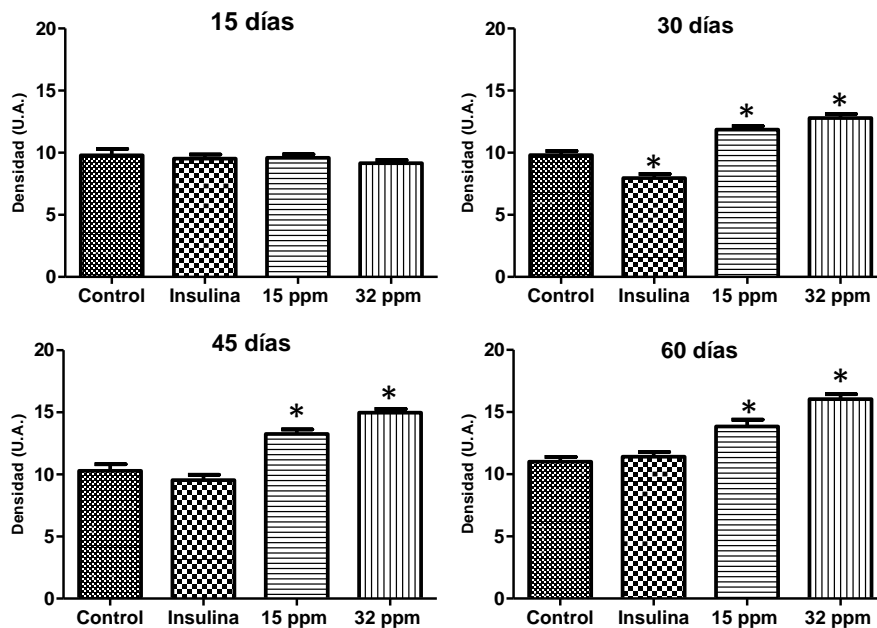
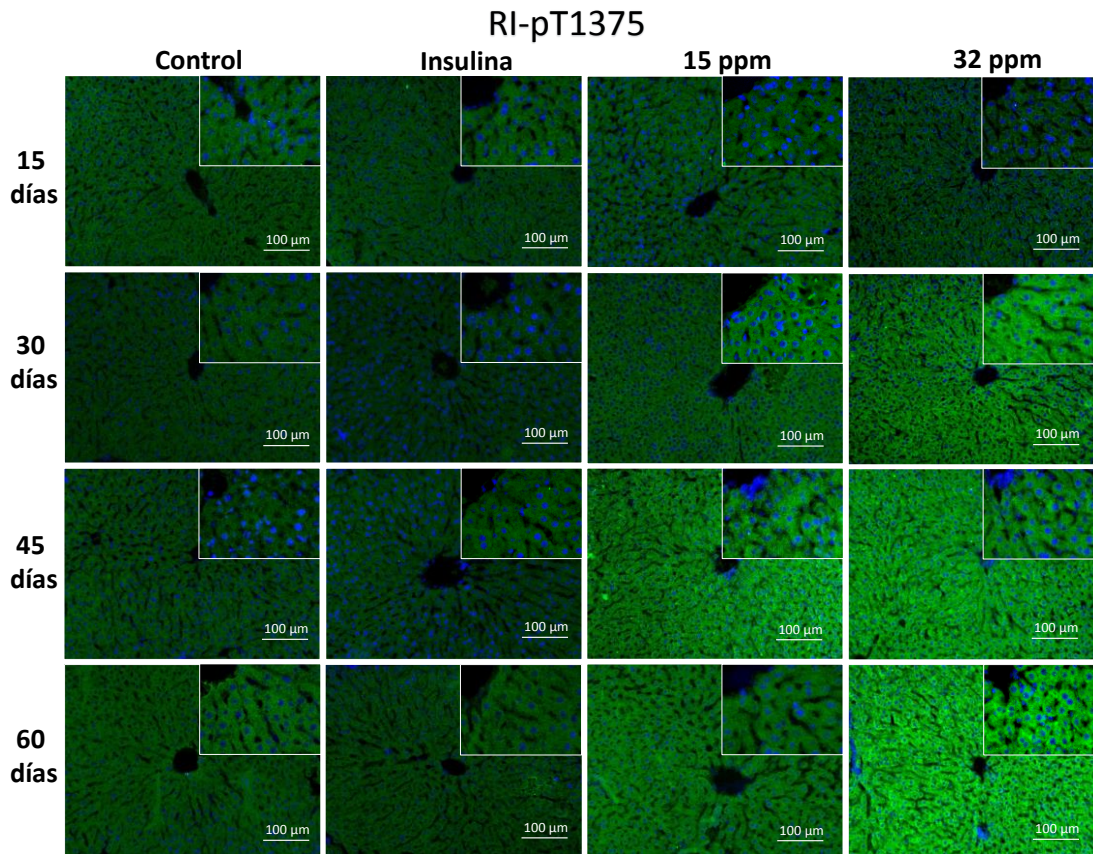
## Señalización de insulina

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 5**). En el tiempo cohorte de 15 días, se observaron incrementos significativos que correspondieron al 65% para el grupo insulina, 98% para el grupo 15 ppm y 128% para el grupo 32.5 ppm. A los 30 días de experimentación, se observó únicamente el incremento en el grupo insulina (35%), mientras los grupos expuestos a Cd no mostraron diferencia con respecto del control. El análisis de los 45 días, demostró una inmunoreactividad significativa en el grupo insulina (55%); sin cambios en el grupo 15 ppm y una disminución para grupo 32 ppm de 21% ( $p \leq 0.05$ ). Por último el análisis a los 60 días mostró que sólo el grupo insulina se mantiene hiperfosforilado en un 24%, mientras que por el contrario los grupos expuestos a 15 ppm y 32 ppm se encontraron hipofosforilados en un 20% y 21%, respectivamente.

El siguiente paso después de la fosforilación en residuos tirosina es la fosforilación de residuos treonina del receptor de insulina, cuya expresión fue evaluada (**Figura 6**). Los diferentes grupos a 15 días del protocolo experimental no se observaron diferencias significativas respecto del control. Mientras que a los 30 días, el grupo insulina exhibió un decremento del 19%, y por el contrario los grupos expuestos a 15 ppm y 32 ppm incrementaron significativamente en 21% y 30% respectivamente. Resultados similares se muestran a los 45 días del análisis, donde el grupo insulina no muestra cambios, pero los expuestos a 15 ppm y 32 ppm mantienen incrementos en la inmunoreactividad del orden de 29% y 45%, respectivamente. Por último, a los 60 días se mantiene dicho incremento que correspondiendo al 26% (15 ppm) y 45% (32 ppm) respecto al grupo control.



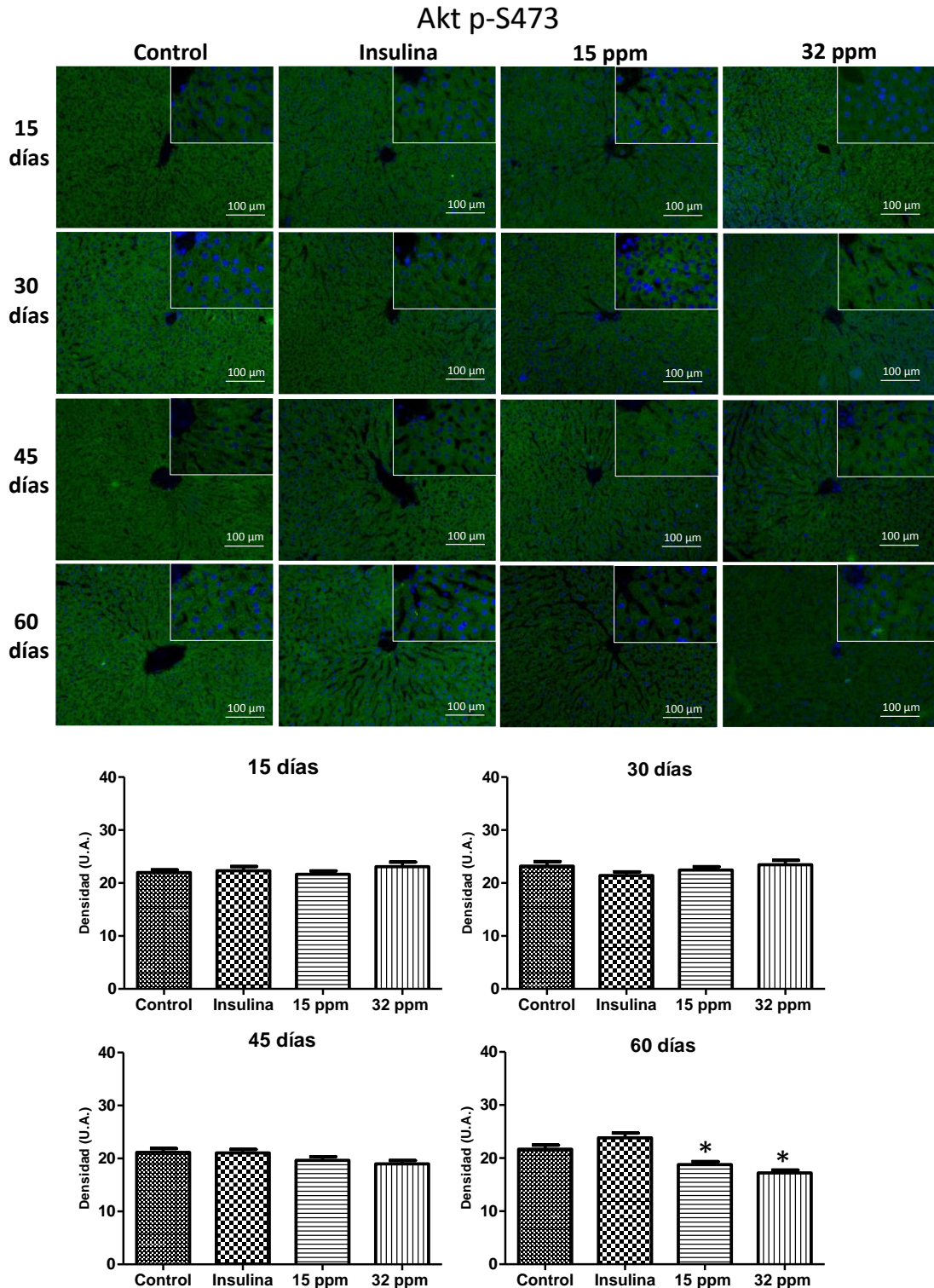
**Figura 5.- Inmunofluorescencia al Receptor de Insulina Fosforilado en Tirosina.** En la parte superior se muestran cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) de la inmunorreacción al receptor de insulina fosforilado en tirosina 1361 (RIpY) de los grupos experimentales. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de las fotomicrografías, las barras muestran el promedio de 45 campos diferentes. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.



**Figura 6.- Inmunofluorescencia al Receptor de Insulina Fosforilado en Treonina.** En la parte superior se muestran cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) de la inmunoreacción al receptor de insulina fosforilado en treonina 1375 (RIpT de los grupos experimentales). En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de las fotomicrografías, las barras muestran el promedio de 45 campos diferentes. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

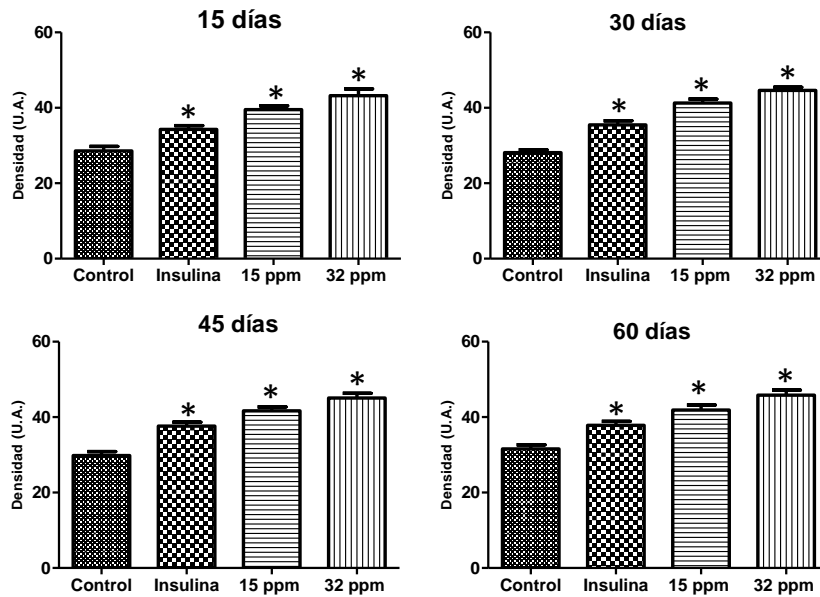
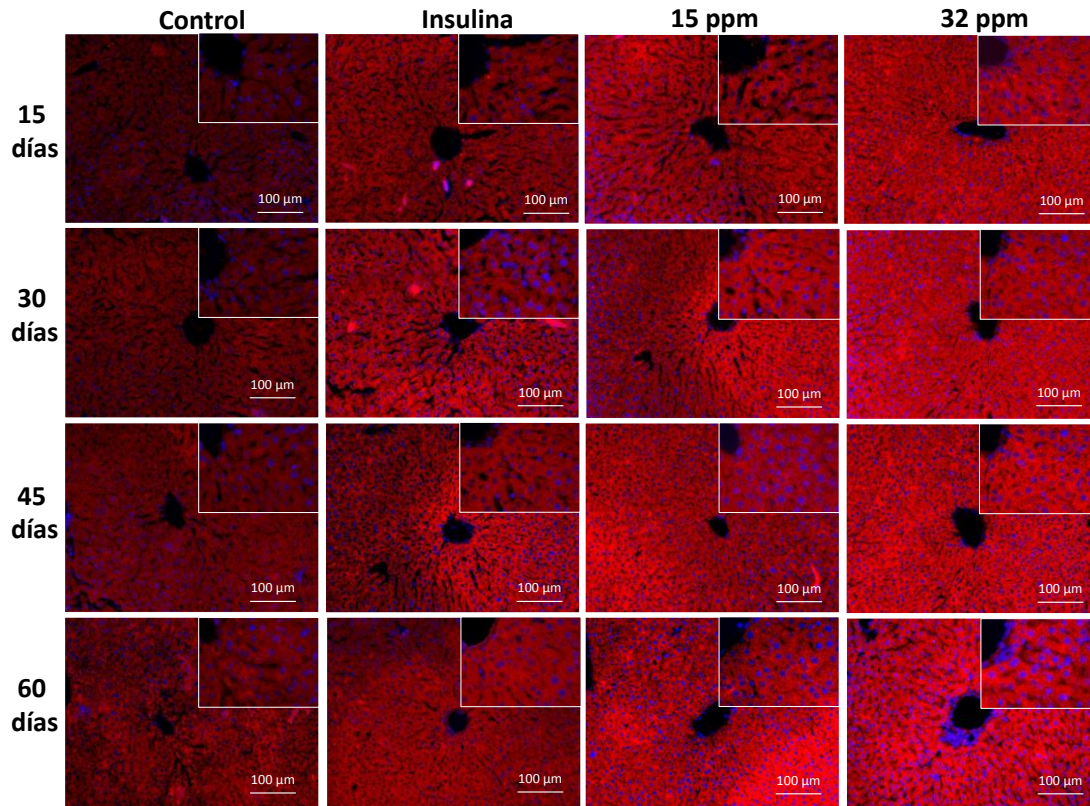
Siguiendo la cascada de fosforilación del receptor a insulina, una proteína clave en la vía de señalización es Akt. Al evaluar la fosforilación de Akt en su residuo de serina 473 por medio de inmunofluorescencia (**Figura 7**) durante los periodos de exposición, el análisis densitométrico de la inmunoreactividad de Akt S473, no mostró cambios significativos a los 15, 30, y 45 días en ninguno de los grupos experimentales; sin embargo, a los 60 días de tratamientos los grupos expuestos a 15 y 32 ppm con Cd exhibieron decrementos significativos que correspondieron al 13% y 21% respectivamente en comparación con el grupo control.

Otra proteína clave en la vía de señalización de insulina independiente de la vía de Akt es ERK1/2 (**Figura 8**), una MAP cinasa importante en la conducta bioquímica de los hepatocitos. Su evaluación demostró incrementos en su inmunoreactividad desde los 15 días de exposición para el grupo insulina (20%), 15 ppm (38%) y 32 ppm (51%); manteniéndose constante a los 30, 60 y 90 días en el grupo insulina (26%, 26% y 20%), 15 ppm (47%, 40% y 33%) y 32 ppm (59%, 51% y 45%), con respecto a su control.



**Figura 7.- Inmunofluorescencia de AKT S473.** En la parte superior se muestran cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) de la inmunorreacción a Akt p-S 473 de los grupos experimentales. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de las fotomicrografías, las barras muestran el promedio de 45 campos diferentes. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

## ERK1/2-pThr202/Tyr204

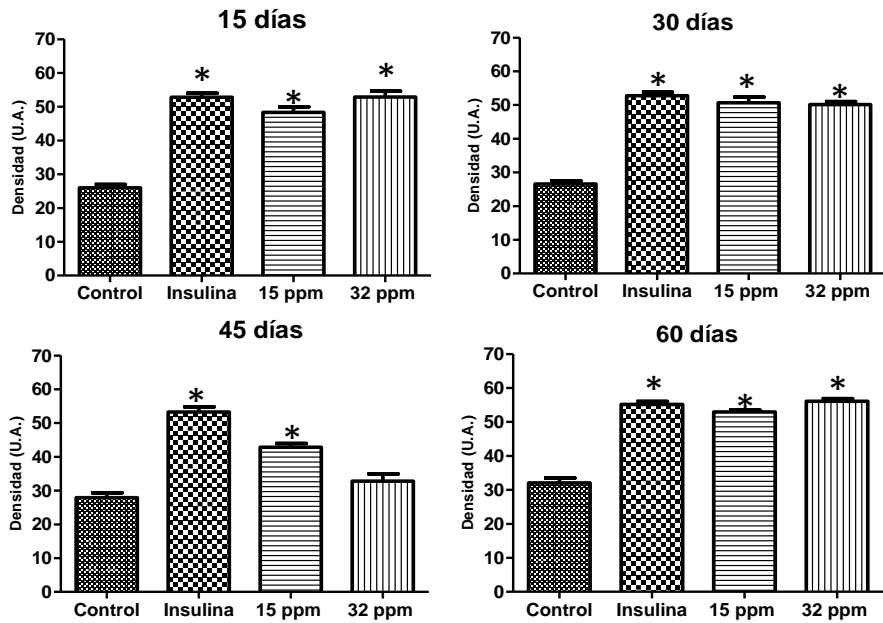
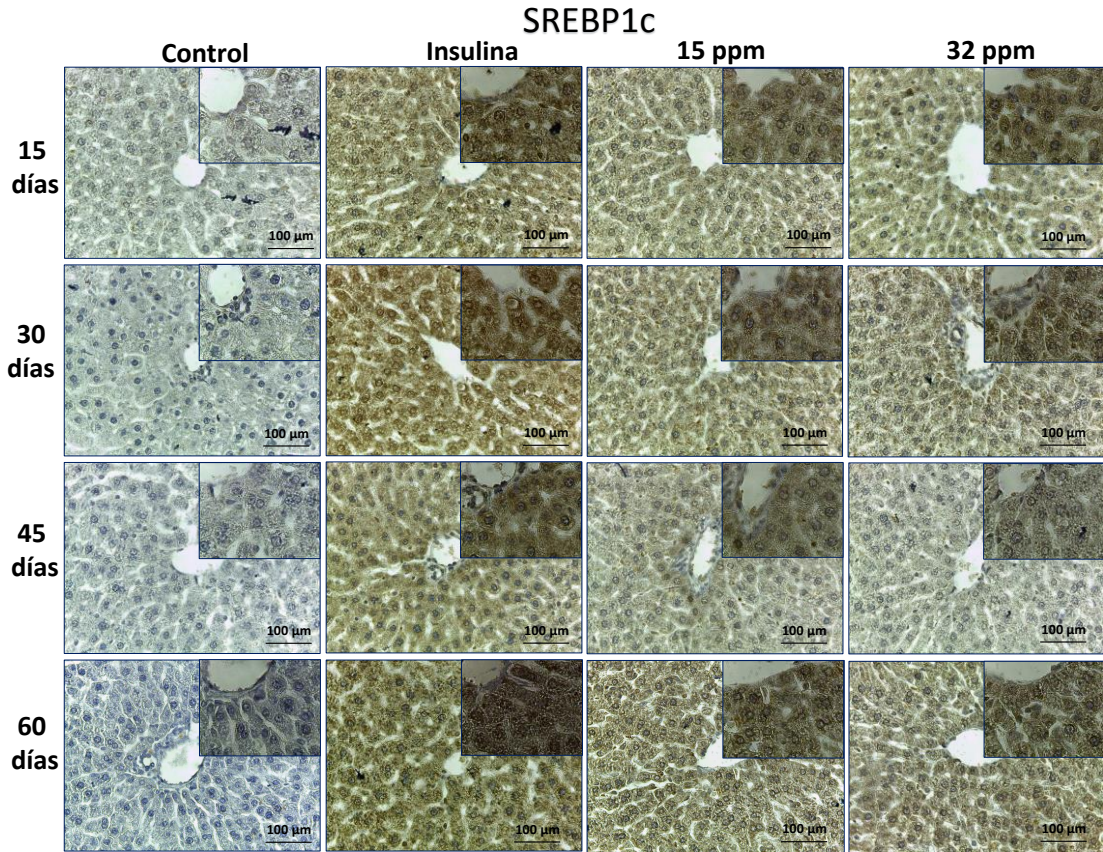


**Figura 8.- Inmunofluorescencia de ERK1/2.** En la parte superior se muestran cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) de la inmunorreacción a ERK1/2 de los grupos experimentales. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de las fotomicrografías, las barras muestran el promedio de 45 campos diferentes. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

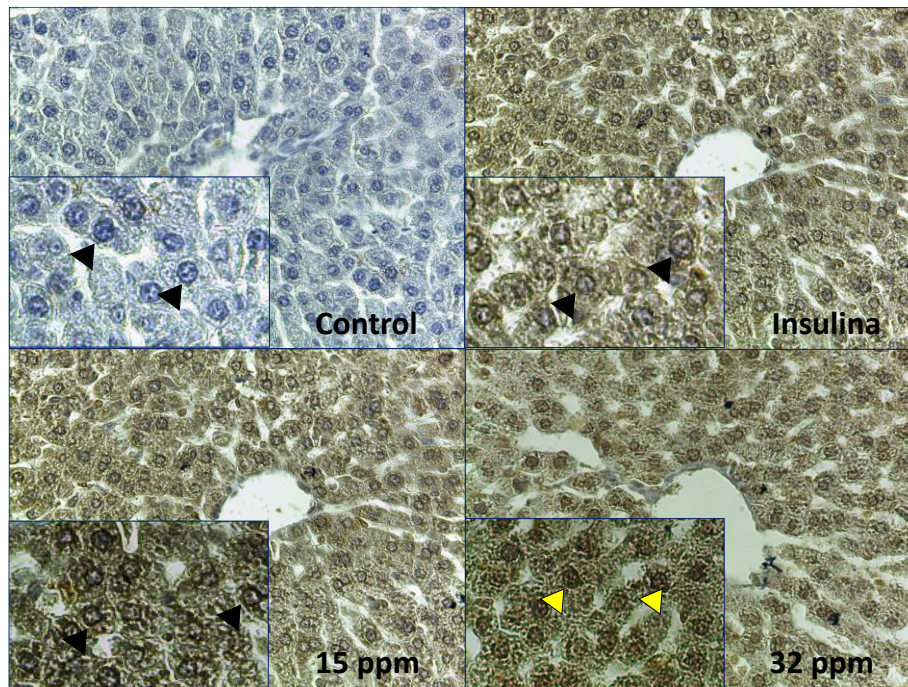
## **Factores de transcripción asociados a lipogénesis hepática en resistencia a insulina.**

La relación entre la resistencia a insulina y la lipogénesis hepática involucra los factores de transcripción responsables de la síntesis hepática de lípidos siendo SREBP1c como el factor de transcripción maestro de la lipogénesis. Por lo tanto, por medio de inmunohistoquímica evaluamos la presencia de SREBP1c en cortes de tejido hepático de los grupos control y los experimentales (**Figura 9**). El análisis densitométrico mostró incrementos significativos en el tiempo cohorte de 15 y 30 días, para el grupo insulina 103% y 113%, grupo 15 ppm de 86% y 91% y para el grupo 32 ppm del 100% y 88%. A los 45 días de experimentación sólo los grupos insulina y 15 ppm mostraron incrementos estadísticamente significativos que correspondieron a 91% y 54%, respectivamente. Por último el análisis a los 60 días, el incremento de SREBP1c se presentó en un 72%, 65% y 75% para los grupos insulina, 15 ppm y 32 ppm, respectivamente

. El análisis antes mencionado expresa mayoritariamente la marca del factor de transcripción a nivel citoplasmático. Sin embargo, a los 60 días de experimentación (**Figura 10**) se observó una importante presencia de marca nuclear, en dependencia del grupo experimental, siendo 32 ppm el cual muestra una completa positividad de marca nuclear de SREBP1c (denotado con flechas amarillas).



**Figura 9.- Inmunohistoquímica de SREBP1c.** En la parte superior se muestran cortes de tejido hepático (5µm) que muestran la inmunorreacción a Proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP1c) de los grupos experimentales. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de las fotomicrografías, las barras muestran el promedio de 45 campos diferentes. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

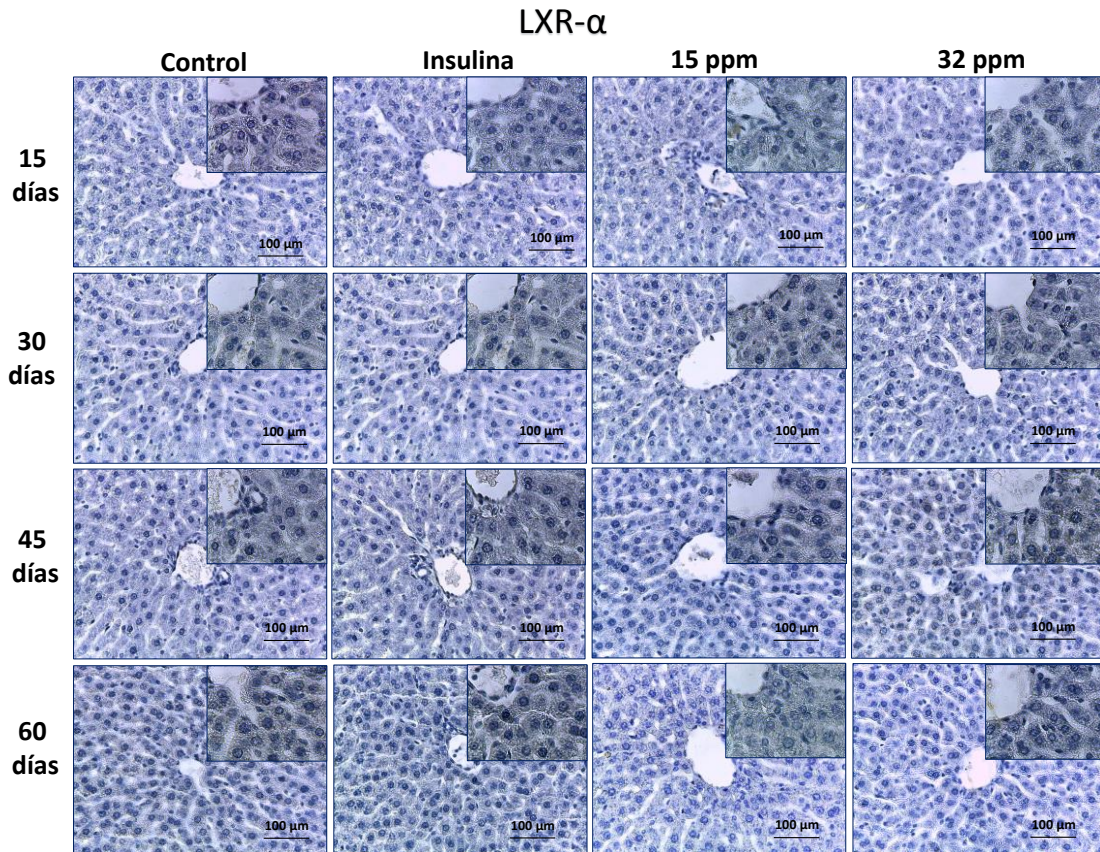


**Figura 10.- Inmunohistoquímica de SREBP1c a los 60 días de exposición.** En la parte superior se muestran cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) que muestran la inmunorreacción a Proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP1c) tanto su localización citoplasmática como nuclear de los grupos experimentales. Flecha negra muestra marca nuclear negativa. Flecha amarilla marca nuclear positiva.

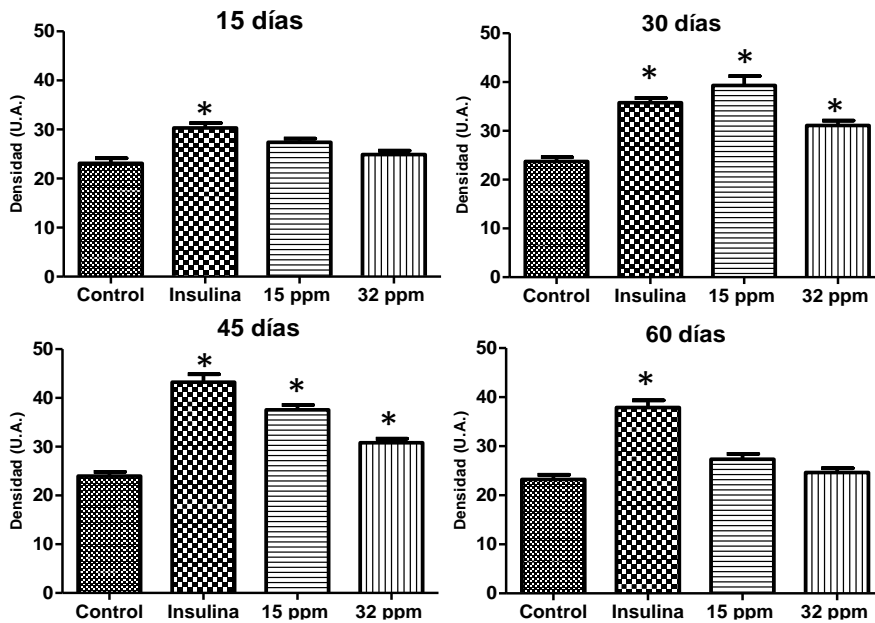
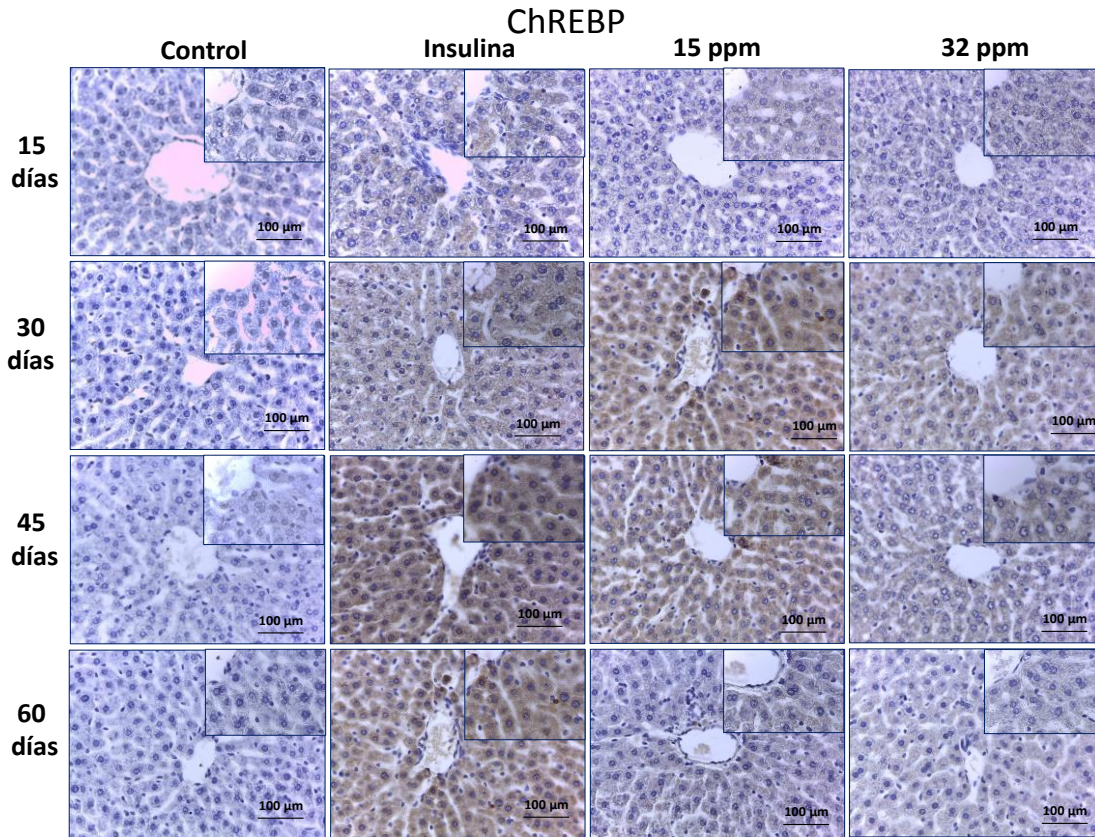
Otro factor de transcripción lipogénico importante es LXR- $\alpha$ , la **Figura 11** muestra el panel de fotomicrografías de los grupos de estudio y tiempos de análisis, en los resultados no se encontraron cambios en su expresión según el análisis densitométrico (datos no mostrados).

Así mismo, se analizó el factor de transcripción ChREBP, este es un factor independiente de la señalización de insulina, pero totalmente dependiente de la concentración de glucosa, su análisis inmunohistoquímico se muestra en la **Figura 12**. A 15 días de experimentación el análisis densitométrico mostró incremento sólo en el grupo administrado con insulina (30%), y una tendencia a incrementar en el grupo 15 ppm. A los 30 días del análisis todos los grupos mostraron incrementos significativos, grupo insulina (50%), grupo 15 ppm (65%) y grupo 32 ppm (30%). A 45 días de tratamientos se observó que en los diferentes grupos experimentales permanecieron incrementados los niveles de inmunoreactividad para ChREBP,

correspondiendo al 80%, 38% y 29% en los grupos insulina, 15 ppm y 32 ppm, respectivamente. Por último, el análisis del tiempo cohorte correspondiente a 60 días, únicamente el grupo insulina exhibió significativamente un aumento del 63% en la inmunoreactividad, con respecto a su grupo control.



**Figura 11.- Inmunohistoquímica de LXR- $\alpha$ .** Se muestran cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) que muestran la inmunorreacción a Receptor X Hepático por sus siglas en inglés (LXR)



**Figura 12 Inmunohistoquímica de ChREBP.** En la parte superior se muestran cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) de la inmunorreacción de la Proteína de unión al elemento de respuesta a Carbohidratos de los grupos experimentales. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de las fotomicrografías, las barras muestran el promedio de 45 campos diferentes. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

## Enzimas lipogénicas

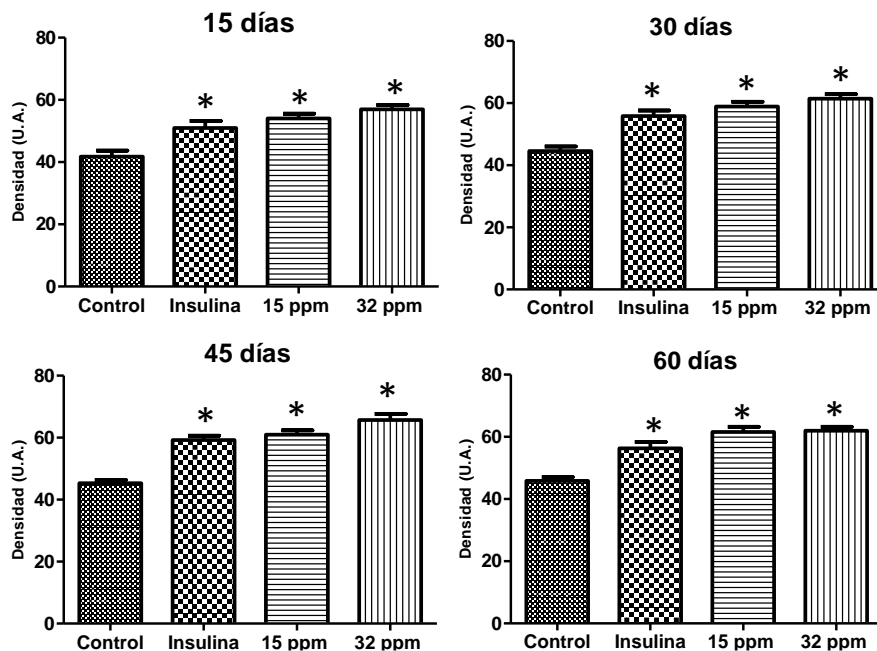
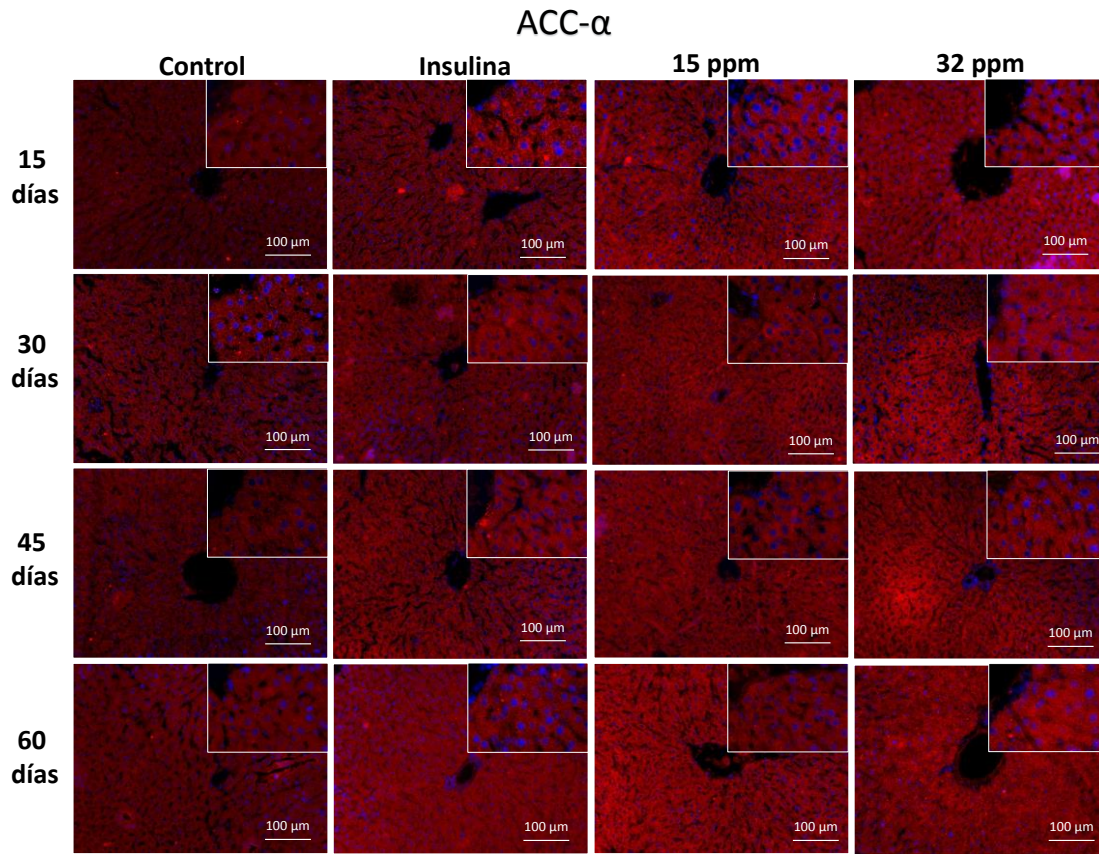
Una vez analizados los factores de transcripción lipogénicos, el siguiente paso fue evaluar por medio de inmunofluorescencia la expresión de las principales enzimas lipogénicas. La primera enzima evaluada fue la ACC- $\alpha$  (**Figura 13**). Los resultados mostraron que a los 15, 30, 45 y 60 días del proceso de experimentación, el análisis densitométrico presentó un incremento significativo en los grupos insulina (22%, 25%, 31% y 23%), 15 ppm (29%, 32%, 35% y 34%) y 32 ppm (36%, 38%, 45% y 35%).

Siguiendo la ruta lipogénica se analizó la enzima FAS (**Figura 14**); la cual a 15 y 30 días de tratamientos no presentó cambios significativos con respecto a nuestro grupo control. Sin embargo, a los 45 días del análisis tanto el grupo insulina, como el grupo 32 ppm incrementaron significativamente en un 16% y 26%, respectivamente. A los 60 días el incremento se presentó en todos los grupos experimentales siendo un 15% para el grupo Insulina, 13% para el grupo 15 ppm y 20% para el grupo 32 ppm.

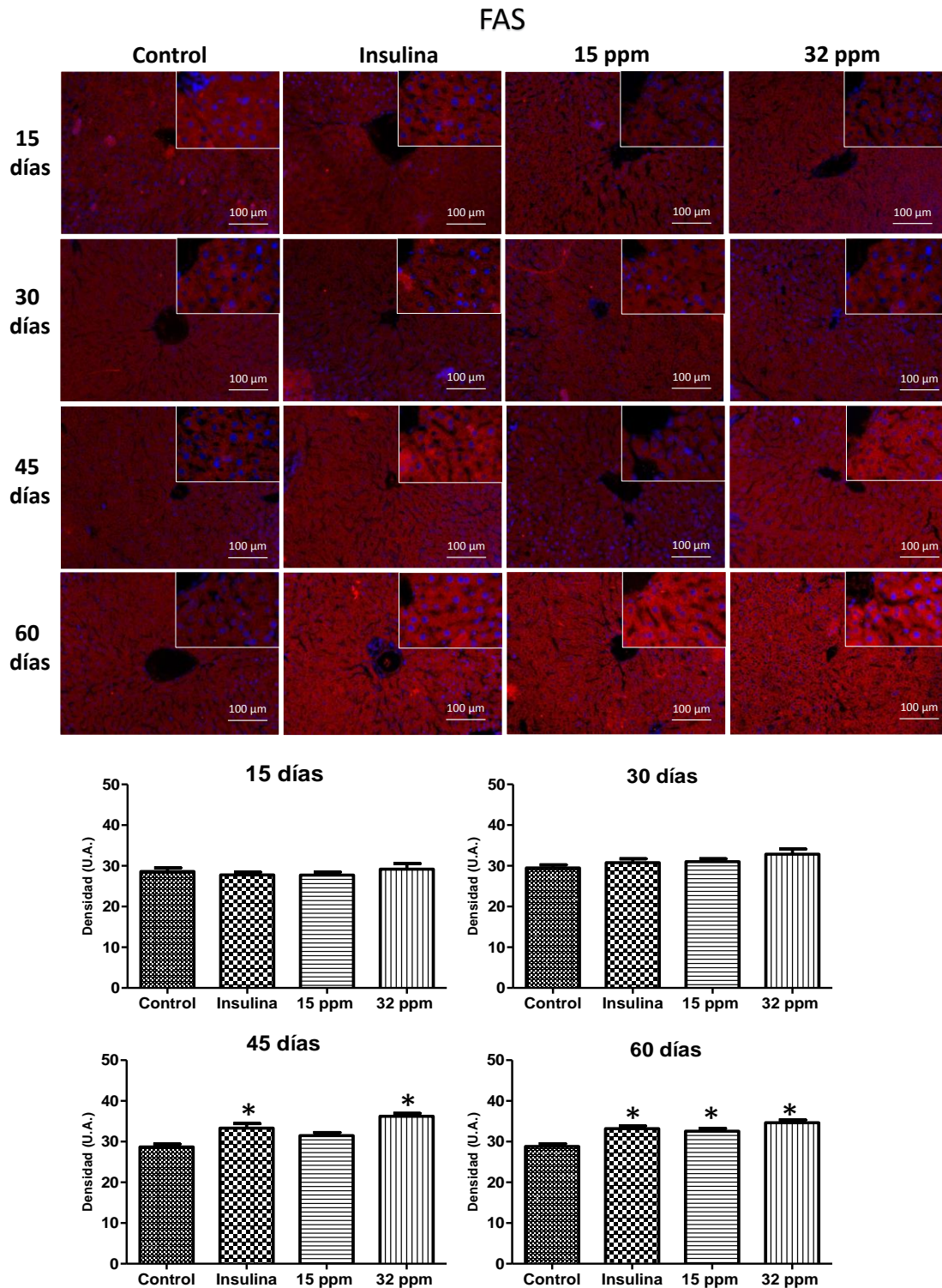
Otra enzima importante en la lipogénesis de triglicéridos a partir de glucosa es la mGPAT (**Figura 15**), el análisis de su expresión en tejido hepático mostró que a los 15 días sólo los grupos expuestos a cadmio mostraron incrementos significativos con respecto del grupo control, en un 23% tanto para el grupo 15 ppm como para el grupo 32 ppm. El análisis para el tiempo cohorte 30 días demostró que todos los grupos experimentales incrementaron significativamente, 21% (insulina), 40% (15 ppm) y 41% (32 ppm). A los 60 días de exposición el grupo insulina exhibió un máximo de inmunoreactividad (31%), mientras que en los grupos cadmio la densitometría mostró que para 15ppm correspondió a 22% y para 32 ppm 15%. Por último a 60 días, únicamente el grupo insulina se mantuvo incrementado en un 24%,

mientras que los grupos expuestos a cadmio no presentan cambios estadísticamente significados respecto al grupo control.

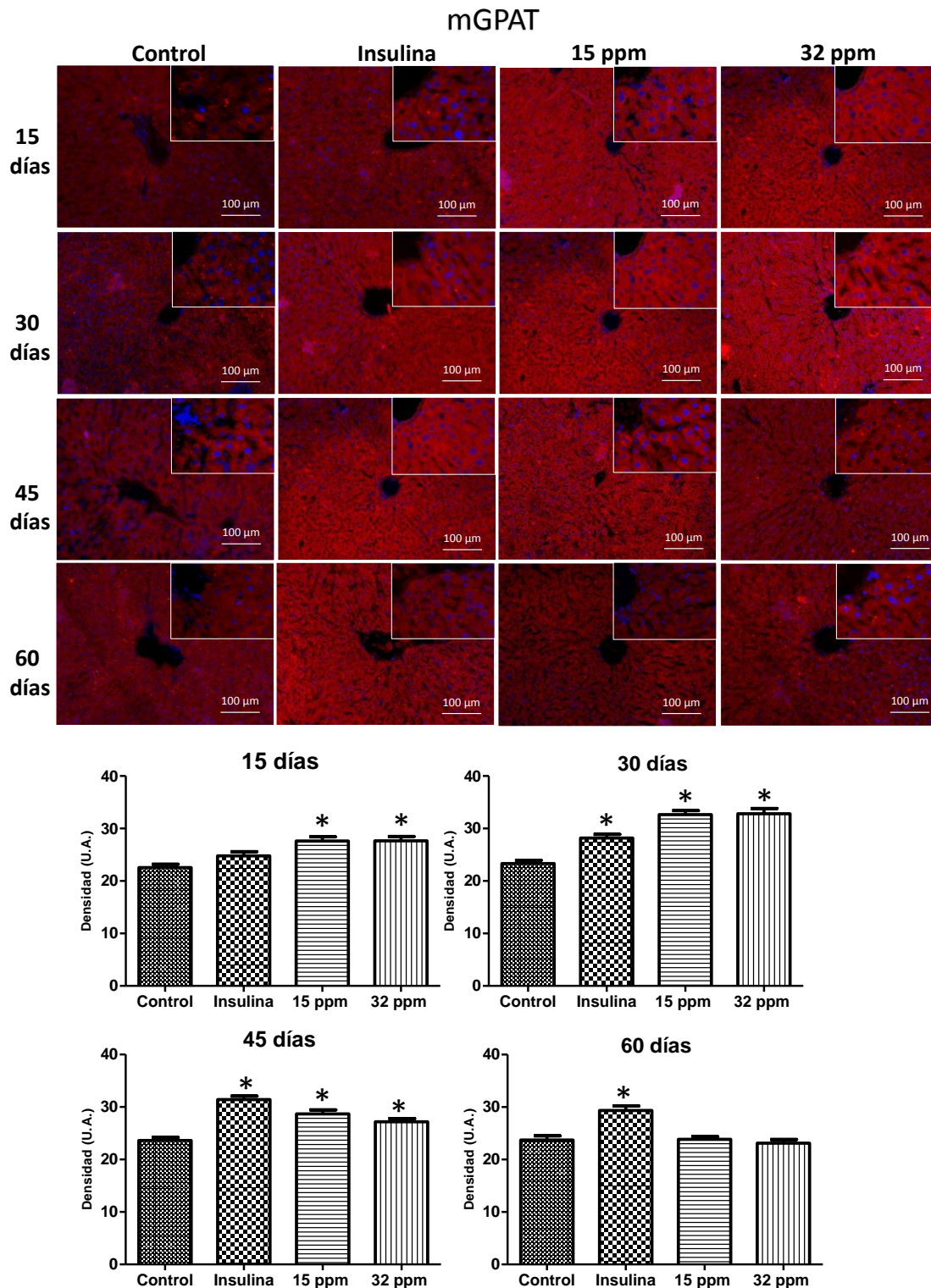
Finalmente, la expresión de la DGAT2 una enzima clave para la esterificación de triglicéridos (**Figura 16**), desde los primeros 15 días de exposición mostró un claro incremento en la inmunoreactividad, correspondiendo a 11%, 26% y 44% para los grupos insulina, 15 ppm y 32 ppm, respectivamente. El análisis consecutivo del tiempo 30 días exhibió aumentos para los grupos insulina (17%), 15 ppm (49%) y 32 ppm (78%), mientras que al tiempo 45 días fue de 22% (insulina), 52% (15 ppm) y 82% (32 ppm); finalmente, a los 60 días el incremento correspondió a 51%, 76% y 94% en los grupos insulina, 15 ppm y 32 ppm respectivamente, comparando contra su grupo control.



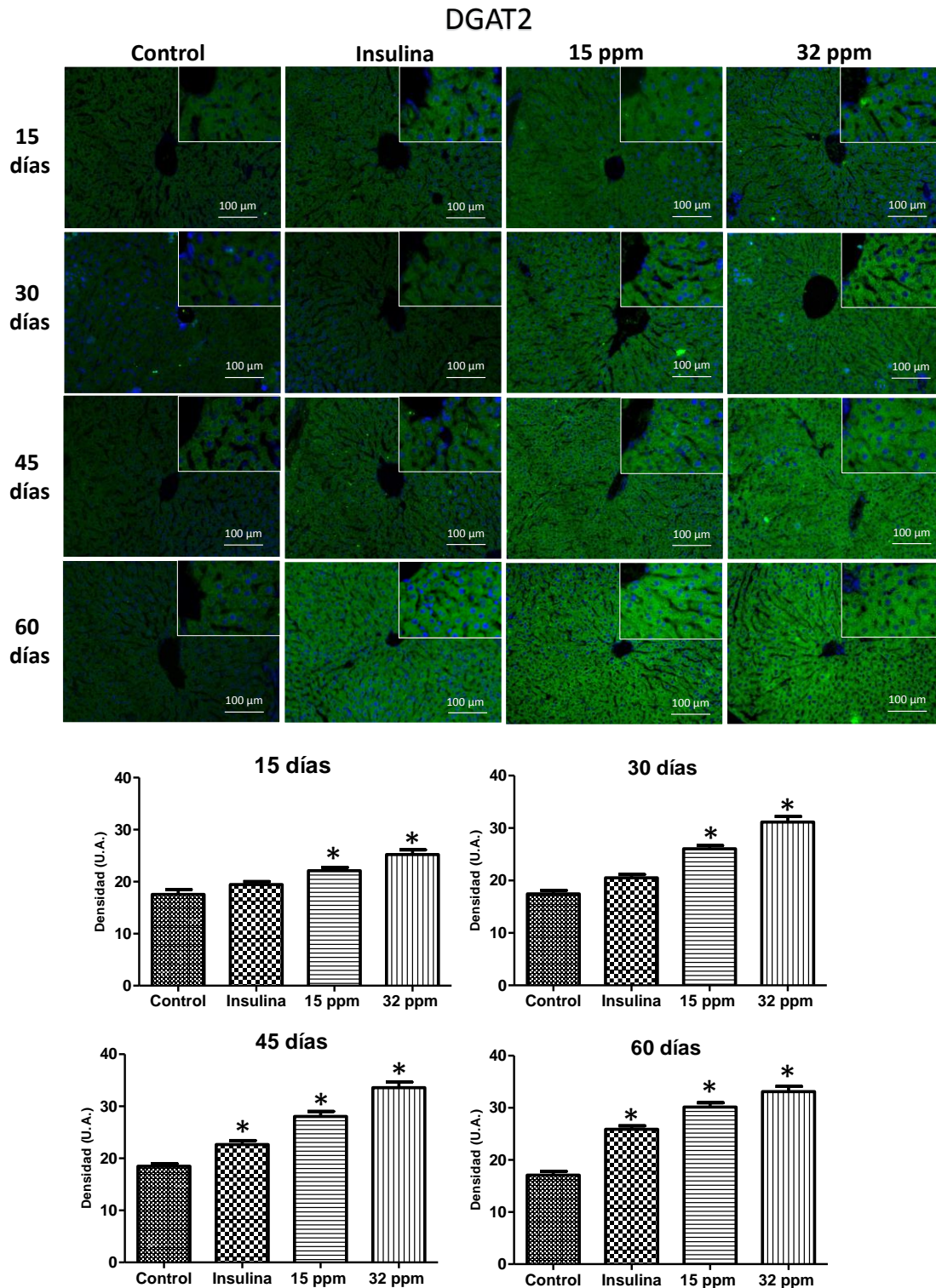
**Figura 13.- Inmunofluorescencia de ACC- $\alpha$ .** En la parte superior se muestran cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) de la inmunorreacción a Acetil CoA Carboxilasa de los grupos experimentales. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de las fotomicrografías, las barras muestran el promedio de 45 campos diferentes. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.



**Figura 14.- Inmunofluorescencia de FAS.** En la parte superior se muestran cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) de la inmunorreacción a Sintasa de Ácidos Grasos de los grupos experimentales. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de las fotomicrografías, las barras muestran el promedio de 45 campos diferentes. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.



**Figura 15.- Inmunofluorescencia de mGPAT.** En la parte superior se muestran cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) de la inmunorreacción a la Glicerol Fostato Acil transferasa mitocondrial de los grupos experimentales. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de las fotomicrografías, las barras muestran el promedio de 45 campos diferentes. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

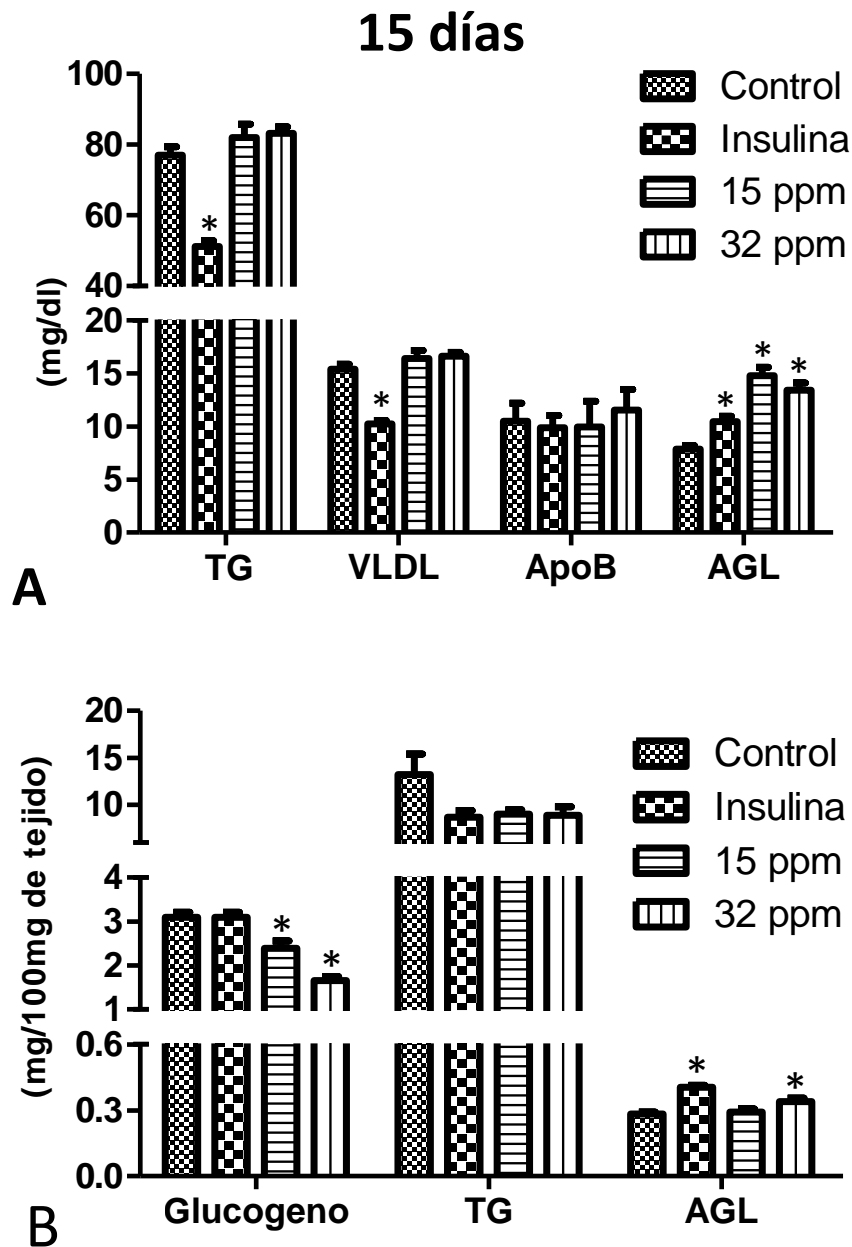


**Figura 16.- Inmunofluorescencia de DGAT2.** En la parte superior se muestran cortes de tejido hepático (5μm) de la inmunorreacción a la Diacil Glicerol Acil transferasa de los grupos experimentales. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de las fotomicrografías, las barras muestran el promedio de 45 campos diferentes. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

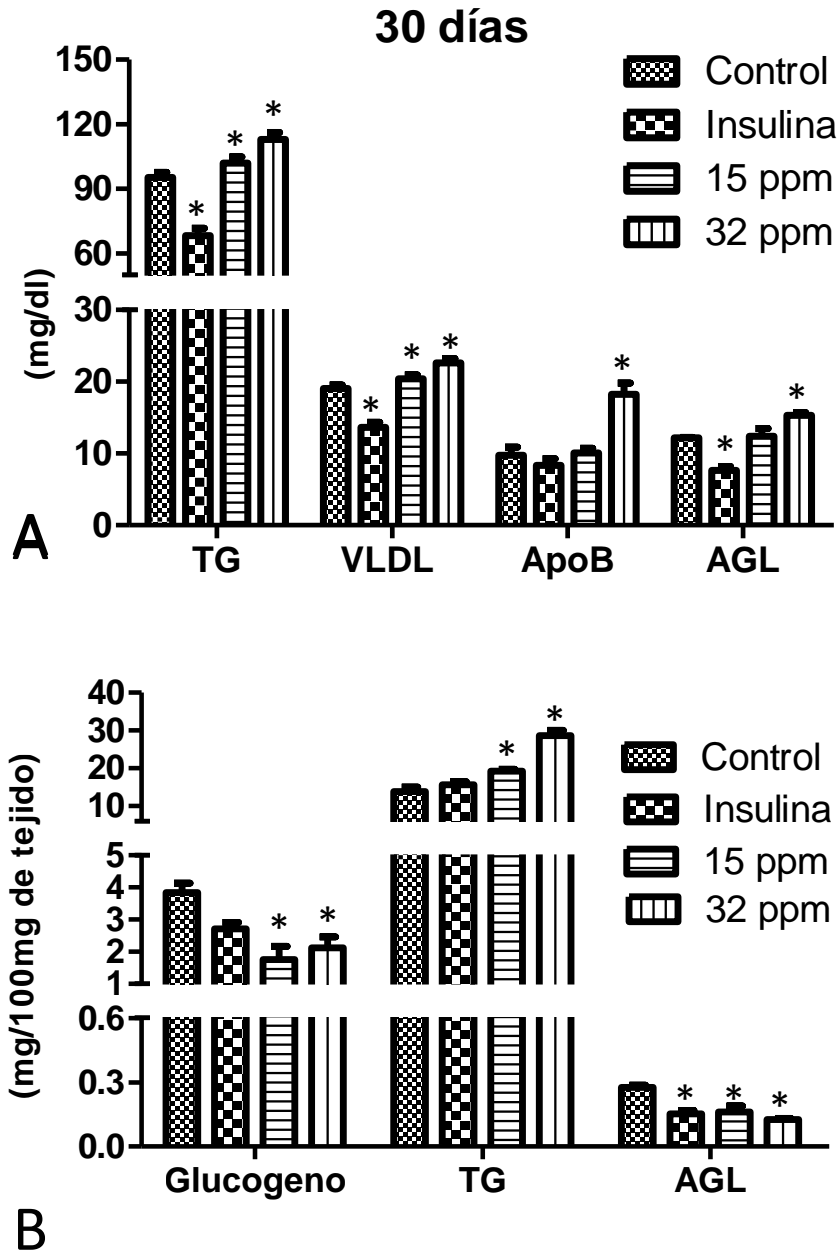
## Metabolitos séricos y hepáticos

Toda vez que fue evaluada la vía de señalización de insulina, los factores de transcripción lipogénicos y la expresión de las principales enzimas encargadas de la síntesis de lípidos a nivel hepático, fue evaluada la dinámica sérica - hepática de la movilización y resguardo de lípidos, así como el resguardo de glucógeno, involucrados en los procesos de resistencia a insulina. La dinámica sérica de lípidos en los grupos experimentales al cohorte de 15 días (**Figura 17A**), mostró una disminución significativa en la concentración de TG (30%) y de VLDL (34%) el grupo insulina. Sin embargo, en todos los grupos experimentales incrementó la concentración de AGL en 33%, 50% y 70% para los grupos insulina, 15 ppm y 32 ppm. Mientras que en tejido hepático (**Figura 17B**), se observan decrementos importantes en las concentraciones de glucógeno de 23% y 46% en los grupos 15 ppm y 32 ppm expuestos a Cd. Por su parte la concentración de TG no mostró cambios estadísticamente significativos, sin embargo igual que al nivel sérico, la concentración de AG hepáticos se encontró incrementada en los grupos insulina y 32 ppm en 42.9% y 19.8% respectivamente.

Al día 30 de exposición, la concentración de TG y de VLDL séricos (**Figura 18A**) se mantuvo por debajo del control en el grupo insulina. Sin embargo, los grupos expuestos a cadmio mostraron incrementos estadísticamente significativos de 7% (15 ppm) y 18% (32 ppm) para TG y de 7% (15 ppm) y 19% (32 ppm) para VLDL, mientras que para apoB y AGL, únicamente el grupo 32 ppm incrementó significativo en un 87% y 26%, respectivamente. A nivel hepático (**Figura 18B**), fue evidente el decremento en la concentración de glucógeno tisular en 54% y 45% para los grupos 15 ppm y 32 ppm, aunque en el grupo insulina no fue estadísticamente significativo, presentándose incremento en TG hepáticos en los grupos 15 ppm (39%) y 32 ppm (107%), en AG tisulares la disminución fue significativa correspondiendo a 31%, 26% y 20% para los grupos insulina, 15 ppm y 32 ppm respectivamente, comparando con su grupo control.



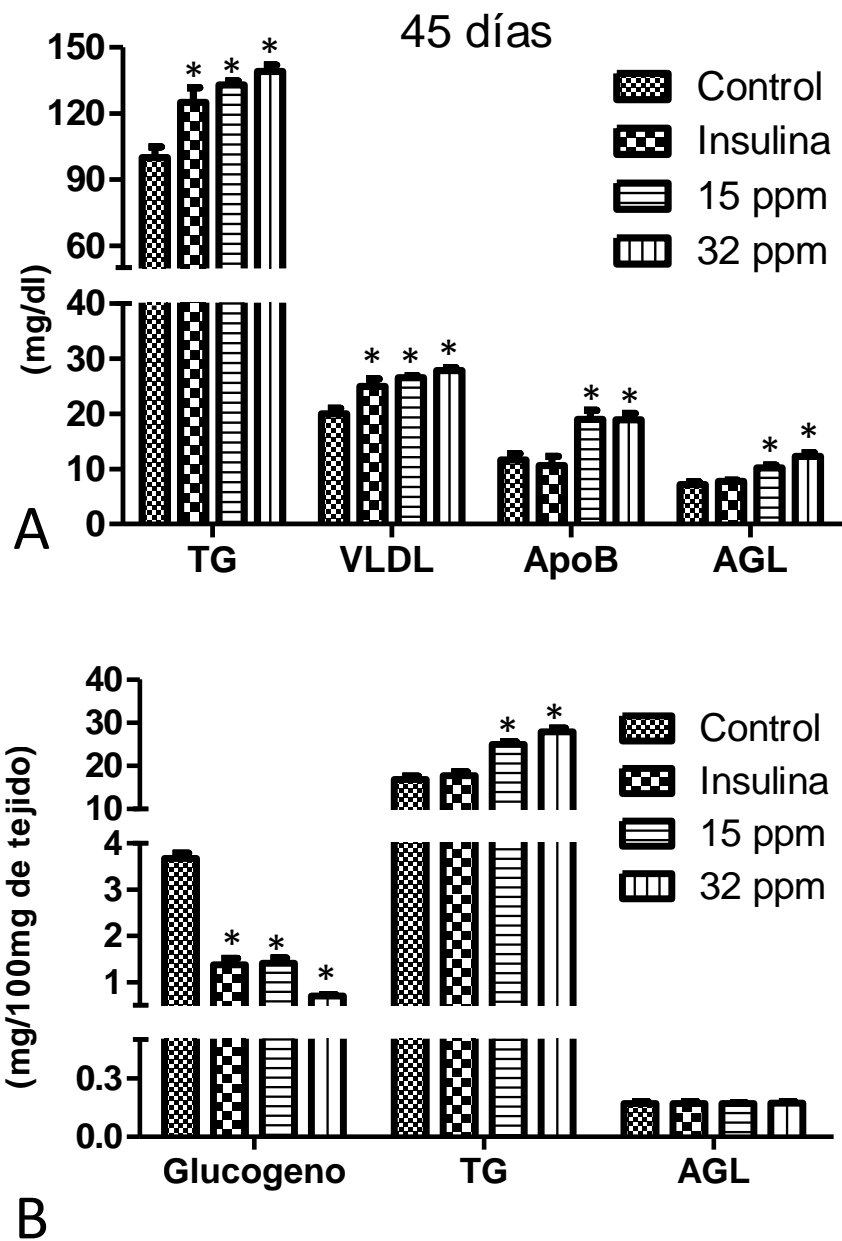
**Figura 17.- Concentración de Metabolitos a 15 días de exposición. A) Mediciones Séricas. B) Mediciones Hepáticas.** Triglicéridos (TG), Lipoproteína de muy baja de densidad (VLDL), Apolipoproteína B (ApoB), Ácidos Grasos Libres (AGL). Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos  $\pm$  EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.



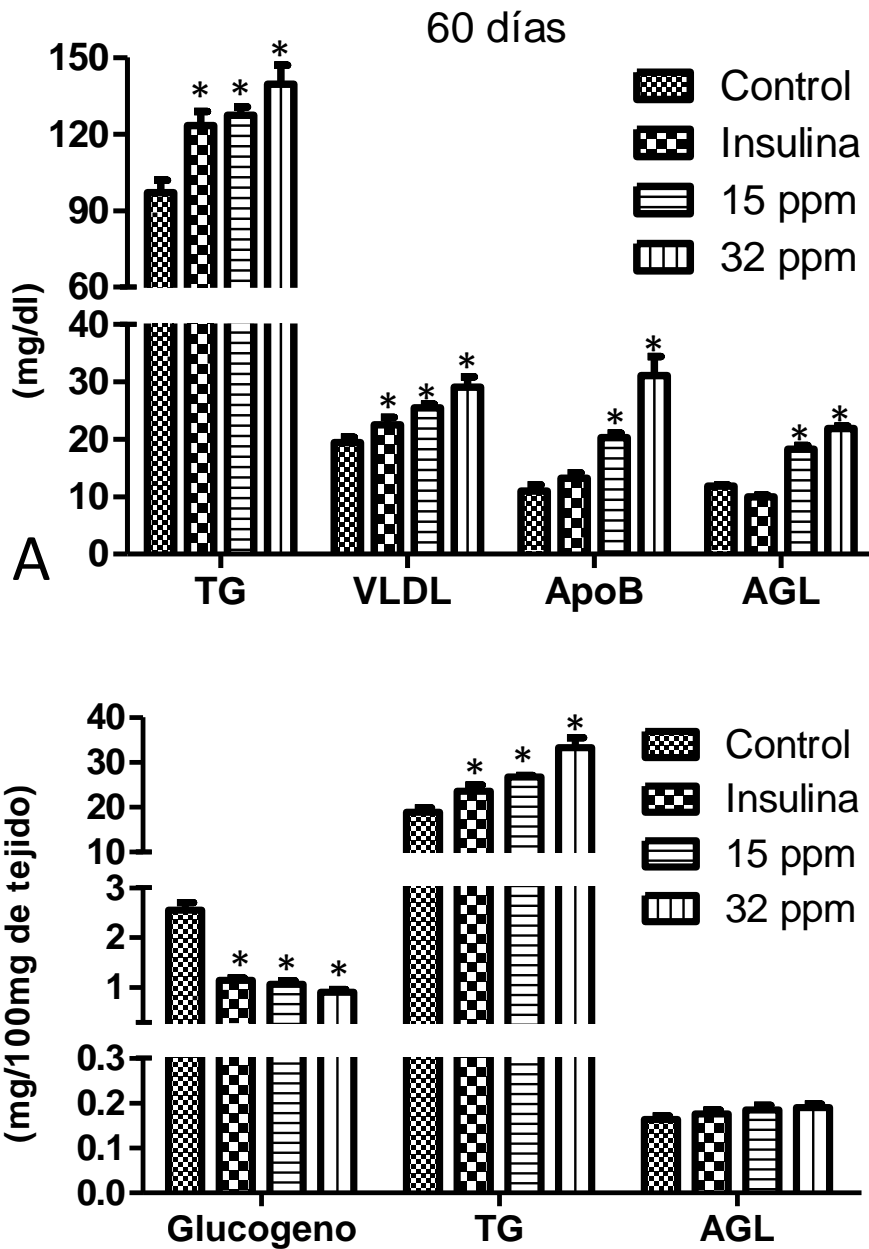
**Figura 18.- Concentración de Metabolitos a 30 días de exposición. A) Mediciones Séricas. B) mediciones Hepáticas.** Triglicéridos (TG), Lipoproteína de muy baja de densidad (VLDL), Apolipoproteína B (ApoB), Ácidos Grasos Libres (AGL). Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos  $\pm$  EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$  por ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

Para los 45 días experimentales a nivel sérico (**Figura 19A**), todos los grupos exhibieron incrementos significativos en la concentración de TG y VLDL correspondiendo a 25% y 26% en el grupo insulina, 32% y 34% en el grupo 15 ppm, 35% y 38% en el grupo 32 ppm. La concentración de apoB y AGL sólo se incrementó estadísticamente en los grupos expuestos a cadmio, 64 y 41% en el grupo 15 ppm y 63% y 71% en el grupo 32 ppm, respecto de su control. Por su parte a nivel tisular (**Figura 19B**), el decremento de glucógeno mantuvo en todos los grupos experimentales presentando concentraciones del 63% (insulina), 62% (15 ppm), y 81% (32 ppm); Por el contrario la concentración de TG hepáticos se mantuvo incrementada en los grupos 15 ppm y 32 ppm en 48% y 65%, respectivamente. La concentración de AG hepáticos no mostró diferencias significativas en ningún grupo respecto al grupo control.

En el tiempo cohorte final a 60 días (**Figura 20A**), la concentración de TG séricos se mantuvo incrementada en todos los grupos; 27%, 31% y 44% (insulina, 15 ppm y 32 ppm), en el mismo sentido se comportó la concentración de VLDL para los grupos Insulina (30%), 15 ppm (32%) y 32 ppm (44%). En cuanto respecta a la concentración de apoB y AGL en los grupos expuestos a cadmio, incrementaron en 85% y 55% (15 ppm), 184% y 85% (32 ppm). A nivel hepático (**Figura 20B**), se mantuvo disminuida la concentración de glucógeno de los grupos insulina (45%), 15 ppm (58%) y 32 ppm (64%). Y por el contrario se pudo evidenciar el incremento en la concentración de TG hepáticos, que correspondió a 25%, 41% y 76% para los grupos insulina, 15 ppm y 32 ppm respectivamente comparado con el grupo control. Por último, las concentraciones de AGL de los diferentes grupos aunque muestran tendencias a incrementar no fueron estadísticamente significativas respecto al grupo control.



**Figura 19.- Concentración de Metabolitos a 45 días de exposición. A) Mediciones Séricas. B) mediciones Hepáticas.** Triglicéridos (TG), Lipoproteína de muy baja de densidad (VLDL), Apolipoproteína B (ApoB), Ácidos Grasos Libres (AGL). 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.



**Figura 20.- Concentración de Metabolitos a 60 días de exposición. A) Mediciones Séricas. B) mediciones Hepáticas.** Triglicéridos (TG), Lipoproteína de muy baja de densidad (VLDL), Apolipoproteína B (ApoB), Ácidos Grasos Libres (AGL). 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.

## 10.- Discusión de resultados.

En diversos estudios se ha mostrado que la exposición a Cd puede ser causa de hiperglicemia en animales, los mecanismos propuestos para explicar la hiperglucemia por Cd incluyen al transportador de glucosa tipo 4 (GLUT 4), cuya expresión se ve afectada negativamente ante la exposición al metal [Han et al., 2003]; así mismo, se ha demostrado que Cd induce vías gluconeogénicas por activación de sus enzimas clave [Chapatwala et al., 1980; 1982; Merali and Singhal, 1980]. Otros resultados sugieren que Cd produce daño a las células  $\beta$ , produciendo una disminución en la liberación de insulina [Chang et al., 2013; Edwards and Prozialeck, 2009]. Sin embargo, el mecanismo o los mecanismos por los cuales el Cd induce el desarrollo de estados hiperglucémicos no son completamente comprendidos aún.

En el presente trabajo, al exponer a ratas macho de la cepa Wistar a dos concentraciones diferentes de Cd, una con dosis a nivel de efecto adverso no observado (NOAEL; 15 ppm ), y otra en el nivel más bajo de efecto adverso observado (LOAEL; 32 ppm) para ratas Wistar, según lo reportado por la ATSDR [ATSDR, 2012], en agua de beber, mostraron cuadros de hiperglicemia en ayuno así como en el postprandio al ser sometidas a una carga de glucosa, las cuales fueron tanto tiempo como dosis dependiente de la concentración de cadmio expuesto. Estas condiciones de hiperglicemia tanto en ayuno como en postprandio se consideran estados pre-diabéticos y se relacionan fuertemente con resistencia a insulina. Además los animales expuestos a Cd, mostraron incrementos marcados en los niveles de insulina en ayuno, así como en la respuesta post-carga de glucosa. Las hiperinsulinemias observadas fueron mayores en los grupos expuestos a Cd, que en el grupo control positivo al cual se le generó un exceso de la hormona administrando 4 UI/día de insulina de lenta acción por vía intraperitoneal (dosis NOAEL) reportada previamente [Stammberger, 2002]. Estos resultados ponen en evidencia una hiperreactividad en la secreción de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas inducido por los grupos expuestos a Cd. Aunque la relación entre Cd y la insulina sigue siendo un tema bajo discusión, en el presente trabajo es claro

que la exposición de Cd produjo incrementos en la secreción de la hormona. 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 está vinculada a resistencia a la insulina *in vivo*, en donde esta hormona estimula a células diana, restaurando simultáneamente la capacidad de respuesta de la célula a las dosis posteriores de la hormona [Shanik et al., 2008].

Algunos mecanismos han sido propuestos para explicar estados hiperinsulinémicos incluyendo alteraciones en el receptor de insulina [Bratusch-Marrain et al., 1986; Gavin et al., 1974; Seino et al., 1989]. Esta hipótesis postula que existe una disminución de afinidad el receptor de insulina a la hormona por fenómenos de ocupación, esto es conocido como una cooperación "negativa" [Rizza et al., 1985]. Durante este proceso se produce una reducción en el número de receptores en la superficie celular, debido a que éstos se internalizan y se degradan cuando son ocupados por la hormona [Ahmed et al., 2000; Bratusch-Marrain et al., 1986; Koopmans et al., 1996], además se propone que el mecanismo anterior es una manera de controlar la cascada de señalización evocada por insulina cuando existe un exceso en la concentración de la hormona. [Rome et al., 2004]

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 [DeFronzo, 2004]. En este sentido, Treviño y cols., en 2015 evaluaron la funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas utilizando el índice HOMA- $\beta\%$ , el cual mostró una disminución asociada a la exposición a Cd, siendo consistente con otros informes en donde se muestra una función pancreática deteriorada después de la exposición de cadmio en animales [Edwards and Prozialeck., 2009; Lei et al., 2007]. Corroborando que una hiperinsulinemia en presencia de hiperglucemia persistente es indicativo de alteración en la función pancreática. Ya 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 [Edwards and Prozialeck., 2009; Hectors et al., 2011].

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. El uso de modelos matemáticos ayuda a valorar de manera eficiente la sensibilidad o resistencia a la insulina en pacientes. Muchos de estos modelos han sido validados en roedores como un enfoque para estudiar los fenotipos humanos y la respuesta a tratamientos terapéuticos [Chung et al., 2012; Muniyappa et al., 2009; Wallace et al., 2004]. 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 durante los tiempos de exposición, las ratas expuestas a Cd presentan resistencia a la insulina desde el primer mes de exposición.

Interesantemente el mayor grado de insulinoresistencia lo presentó el grupo expuesto a 32 ppm. Resultados similares de resistencia a insulina fueron observados entre los grupos administrados con 15 ppm de Cd (dosis por definición no toxica) y el grupo administrado con insulina exógena. El aumento de este índice se ha correlacionado fuertemente con el desarrollo de hiperglucemia en modelos animales.

Adicionalmente al HOMA-IR, también fue calculado un índice específico para la evaluación de resistencia hepática a insulina; el índice LIRI [Vangipurapu et al., 2011]. Los resultados mostraron que la exposición a Cd incrementa notablemente la resistencia en este tejido de manera dependiente a la duración de la exposición al metal. Sin embargo, en algunos tiempos de cohorte no existen diferencias entre las dos concentraciones de Cd, sugiriendo fuertemente que el tejido hepático es susceptible de desarrollar resistencia a insulina independientemente de la dosis expuesta, ya sea LOAEL o NOAEL, esto puede ser causado por la ruta de exposición

de Cd a la cual sometimos a los animales, ya que la absorción por la vía portal del Cd tiene como primer órgano blanco al hígado desarrollando resistencia desde el primer mes de exposición. Aunado a la resistencia a insulina hepática, la exposición a Cd desarrolla baja sensibilidad a la insulina, como lo sugieren anteriores estudios de larga exposición realizados en nuestro grupo de trabajo [Treviño et al., 2015]. En el presente trabajo, nuestro modelo experimental de exposición a Cd presenta desde los primeros 15 días una baja sensibilidad (datos no mostrados), asociados al incremento de resistencia a insulina.

*In vivo*, tanto la sensibilidad como la resistencia a la insulina se regula por factores como la obesidad, y se altera de forma más rápida por los cambios en los hábitos alimenticios y la actividad física [Barnard and Youngren, 1992]. Estos factores de riesgo se ven potenciados por la interacción de numerosos factores, tanto genéticos como ambientales. Tanto la pérdida de la sensibilidad a la insulina tisular de forma aguda como crónica puede ocurrir a través de múltiples vías, a través de las cuales los mediadores celulares de la señalización de insulina pueden ser alterados, interacciones proteicas, rutas de interacción fosforilativa y otras modificaciones en la regulación de la expresión genética son algunos de los mecanismos involucrados. El decremento de la sensibilidad se asocia con una reducción en la captación de glucosa por el tejido hepático y su consecuente desarrollo de resistencia a insulina, induciendo cambios en las vías de señalización que favorecen la lipogénesis y la gluconeogénesis [Fabbrini et al., 2009; Lim et al., 2011; Petersen et al., 2010], cambios que fueron observados en los animales expuestos a Cd y de los cuales se hablará más adelante.

En la resistencia a la insulina, la capacidad de la insulina para iniciar las cascadas de fosforilación río abajo que regulan la actividad de segundos mensajeros se encuentran disminuidas [Pirola et al 2004; White, 2003]. La actividad enzimática y la fosforilación de quinasas y sustratos en estas vías de señalización se reducen, como se ha demostrado en biopsias musculares de sujetos insulinoresistentes [Sesti 2001]. Sin embargo, el sitio (s) de la perturbación inicial en la transducción de la señal sigue siendo poco claro. Existe evidencia significativa

que sugiere que la regulación del receptor de insulina en condiciones agudas y crónicas contribuye a la alteración en la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de la glucosa.

El receptor a insulina (RI) se sintetiza como un pre-pro receptor, del cual se escinde un péptido señal de 30 aminoácidos. El pro-receptor se procesa posteriormente, sometiéndose a glicosilación, plegamiento y dimerización. En el aparato de Golgi, las cadenas dimerizadas de aminoácidos se escinden a continuación en subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Estos péptidos se unen a continuación mediante enlaces disulfuro para formar un receptor holoheterotetramérico que consiste en dos componentes idénticos, las subunidades  $\alpha$  extracelulares que se unen a la insulina y dos subunidades  $\beta$  con dominios transmembranales idénticas que tienen actividad tirosina quinasa intracelular [Seino et al, 1989].

Se han notificado alteraciones en la función del RI en tejidos de humanos y animales resistentes a la insulina, así como una autofosforilación reducida para el RI estimulado por insulina *in vivo*, así como en biopsias de tejido y en trabajos *in vitro*. Además, se ha demostrado una capacidad reducida para la fosforilación de tirosina del sustrato del receptor de insulina (IRS, por sus siglas en inglés), en RI aislados de sujetos resistentes a insulina y modelos animales [Gual et al., 2005]. Así mismo, se ha reportado que ante la exposición a Cd se reduce significativamente (aproximadamente 50%) el número total de receptores a insulina, esta disminución de los receptores de insulina podría ser responsable del efecto diabetogénico observado en ingestas de larga duración de cadmio [Ficková et al., 2003], tal vez por el efecto conocido como cooperación "negativa" del cual se habló anteriormente, como pérdida de la sensibilidad a insulina.

Siguiendo la vía de señalización de insulina río abajo, el primer evento después de la unión de insulina a las subunidades  $\alpha$  del RI, da lugar a un cambio conformacional que induce la autofosforilación de distintos residuos tirosina de las subunidades  $\beta$  [Youngren, 2007]. En este sentido, nuestros resultados muestran que desde los 15 días de exposición, los grupos experimentales se incrementa la fosforilación de la tirosina 1134 del RI, misma que en los grupos expuestos a Cd

tanto con 15 ppm, como con 32 ppm de Cd muestran una mayor inmunoreactividad, inclusive mayor que en el grupo al que se le administro insulina exógena. La hiperfosforilación en tirosina del RI está en concordancia con la concentración de insulina plasmática, que probablemente al unirse a su receptor propicia esta respuesta. Sin embargo, a tiempos mayores de exposición al metal dicha fosforilación decrece, siendo dependiente de la dosis de exposición. Dicho efecto no se observa en el grupo control positivo administrado con insulina exógena. Los resultados observados en los grupos expuestos a Cd podrían explicarse bajo el precepto de que la insulina producida por los animales expuestos a Cd se vuelve no funcional, por lo que aunque existan concentraciones elevadas de la hormona, la unión al receptor sea ineficiente, conllevando a la disminución en la fosforilación en residuos de tirosina. Dicha hipótesis también ha sido abordada en nuestro grupo de investigación, en el cual se puso de manifiesto la interacción de Cd con insulina, y como dicha interacción hace disfuncional a la hormona, ya que en modelos animales dependientes de insulina, después de una carga de glucosa oral, esta insulina-Cd no fue capaz de reducir los niveles séricos de glucosa [Treviño, 2015], por lo tanto el cadmio al ocupar los sitios de unión de Zn por desplazamiento, puede ocasionar la agregación de las moléculas de insulina e inclusive su cristalización, lo que probablemente vuelve no funcional a la hormona, al menos para hacer eficiente la absorción de glucosa en los tejidos dependientes de insulina, contribuyendo al desarrollo de resistencia a la hormona en modelos *in vivo*.

Consecutivamente a la autofosforilación de los residuos tirosina, se ha observado y descrito un lento aumento en la fosforilación de residuos de serina y treonina, presumiblemente a través de la activación de las proteínas serina-treonina quinasas, que son distintas al del RI. Las consecuencias funcionales de estas fosforilaciones son inciertas, sin embargo se han propuesto como un mecanismo de retroalimentación negativo de la vía de señalización [Pilch, 1994; Tavaretj et al., 1991; Pilfay and Siddle, 1991], por lo que el cambio de la dinámica de fosforilación fue investigado en los grupos experimentales. Nuestros resultados muestran que ante la exposición a Cd se ve incrementada la fosforilación del receptor en sus residuos treonina, observándose una interesante dinámica entre este incremento de

fosforilación sobre treoninas, con la reducción en la fosforilación de tirosinas y viceversa. La concentración de 32 ppm de Cd mostró la mayor inmunoreacción en treonina, misma que no ocurre en nuestro grupo administrado con insulina exógena. Este comportamiento en el caso del grupo administrado con insulina podría deberse a la actividad de diferentes fosfatasa, como son las que integran a la familia de las proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS) [Youngren, 2007] y las proteínas tirosina fosfatasa (PTP), de la cual la PTP1B es la fosfatasa más estudiada, y la que se ha relacionado con el desarrollo de la resistencia a insulina y diabetes [Johnson et al., 2002].

Los siguientes pasos de la vía de señalización de insulina continúan con una serie de fosforilaciones sobre diferentes cinasas; IRS, PDK-1, PI3K y finalmente la fosforilación en Akt-1, la cual es fosforilada por PDK-1, en su asa de activación en la treonina 308 (T308), un evento que sólo estimula la activación parcial de Akt que lleva a la activación de mTorc1, que consecutivamente activará a S6K, una cinasa clave entre la retroalimentación resistencia a insulina - lipogénesis hepática, de la cual se hablara más adelante.

Sin embargo, para lograr una completa fosforilación de Akt se requiere adicionalmente la fosforilación en serina 473 (S473), en su dominio regulador [Hassan et al., 2013]; la doble fosforilación treonina/serina es indispensable para la activación de diferentes sustratos de rutas convergentes. Akt media numerosas funciones celulares como angiogénesis, metabolismo, proliferación y sobrevivencia [Hemmings and Restuccia, 2012]. La fosforilación de Akt S473 fue evaluada en el presente trabajo y el análisis de nuestros resultados no mostró cambios significativos hasta el tiempo más largo de la exposición a Cd, para ambas concentraciones, en las que se observa una reducción en su reactividad. En este sentido, es bien sabido que el Cd perturba diferentes cascadas de fosforilación, sin embargo, aún es incierto si la exposición al metal actúa sobre estas vías de manera directa o indirectamente sobre algunas fosfatasa. Algunos trabajos han puesto de manifiesto que el Cd puede inhibir una serie de diferentes fosfatasa de la familia PPM por interacción directa; sin embargo, no ha mostrado efecto inhibitorio sobre

la familia de proteínas fosfatasa de dominio PH rica en leucinas (PHLPP) [Chang et al., 2013]. Esta última familia de fosfatasa desfosforila directamente el motivo hidrófobo de Akt S473 (Andreozzi et al., 2011), que ha sido relacionado en condiciones de obesidad y resistencia a insulina, lo cual indica que un incremento de esta fosfatasa puede estar relacionado con la disminución de la fosforilación de Akt S473 y actuar como una retroalimentación negativa de la vía de señalización de insulina, mostrando que el incremento en las concentraciones de PHLPP pueda contribuir a resistencia a insulina y afectar su cascada de señalización en diversos tejidos. Además de esto, se sabe que Cd perturba la cascada de señalización de PI3K-Akt, generalmente activando la señalización Akt T308 en varios tipos de células (incluyendo hepatocitos), dependiendo de las concentraciones y tiempos de exposición [Jing et al., 2012; Thévenod, 2009, Oh et al., 2009], no sólo como una respuesta al estrés, sino como una reacción adaptativa para prevenir la muerte celular.

La segunda rama de la vía de señalización de insulina es la ruta de MAPK, en ésta la insulina activa la vía de las MAPK a través de dos mecanismos: en el primero, la activación del RI en residuos tirosina promoviendo la asociación con el adaptador de la proteína 1 (Shc), la cual une al complejo de la proteína de unión al receptor 2 del factor de crecimiento (Grb2)/ Son of Sevenless (SOS); SOS activa a Ras, la cual inicia el encendido de la cascada de las MAPK, mediante Ras-Raf-MEK y finalmente la activación de las ERK1/2 [Boucher, 2014]. Alternativamente existe una vía independiente de Shc pero dependiente de la activación del IRS por la que la señalización evocada por insulina es capaz de activar a las MAPKs. En ésta, una vez activo el IRS, se une al complejo Grb2/SOS y a partir de este punto se produce una secuencia de activación proteica, que es la descrita para Shc (Plancarte, 2008).

En concordancia a la ruta de señalización secundaria, nuestros resultados mostraron incrementos en la inmunoreactividad de ERK1/2 que fueron tiempo y dosis dependientes de la exposición y concentración de Cd. Los resultados mostrados por los animales expuestos al xenobiótico estuvieron por encima de lo mostrado por el grupo administrado con insulina exógena, e inclusive a los 60 días

de administración mantuvo una correcta fosforilación del RI en residuos tirosina. Estos resultados obtenidos sugieren fuertemente que es el Cd y no la señalización de insulina es lo que propicia la activación de la vía ERK1/2 en estado de resistencia a insulina. Adicionalmente, se conoce que existen otros factores que inducen esta cinasa, como el factor de crecimiento similar a la insulina, la inflamación y el estrés oxidativo. En este sentido, se ha descrito que el Cd puede activar la vía de las MAPK de manera secundaria a la generación de ROS y en respuesta a su incremento [Thévenod, 2009; Liu et al., 2002; Qu et al., 2006; Qu et al., 2007; Chen et al., 2008]. De esta manera, el ERK1/2 regula algunos aspectos de la señalización celular sobre el crecimiento, proliferación, sobrevivencia, movilidad y muerte celular, en las cuales interviene la cinasa S6K como un punto en común con la señalización de PI3K-Akt. Algunos datos recientes apoyan un papel de ERK en la protección contra la toxicidad de Cd y el aumento de la proliferación celular [Jiang et al., 2009; Souza et al., 2009], pero la activación de ERK por Cd también puede conducir a la muerte celular [Martin et al., 2006], por lo tanto el papel de ERK en los efectos de Cd sigue siendo enigmático, por lo que se deberían contemplar tanto el umbral de toxicidad del metal, como la saturación de las vías antioxidantes.

Las MAPK se dividen en tres grupos: ERK, p38 y JNK. Generalmente, la asociación de JNK activado por Cd conduce a la muerte celular apoptótica, aunque se ha demostrado que JNK también tiene un papel antiapoptótico cuando en la respuesta al estrés y a la inflamación está mediada por TNF- $\alpha$  [Liu and Lin, 2005]. Así mismo, se sabe que JNK contribuye a estados de resistencia a insulina inhibiendo directamente al IRS1, el principal efector en la cascada de señalización a insulina [Luca and Olesfsky, 2008; Samuel and Shulman, 2012], efecto indirecto adicional por el cual la exposición a Cd pudiera estar asociado a estados de resistencia a insulina.

Un punto convergente entre las vías de señalización activadas por insulina, tanto por lo vía Ras/ERK como por la vía PI3K-Akt, es la quinasa ribosomal S6 p70 (S6K), la cual es una proteína clave en la cascada de señalización de insulina [Gomes and Blenis, 2015]. S6K participa en el crecimiento celular mediada por la

hormona, así como en diferentes aspectos metabólicos y en la regulación de la retroalimentación negativa en distintos niveles de dicha cascada, por ejemplo; varios estudios han demostrado que S6K fosforila residuos de serina específicos en proteínas IRS, contribuyendo así al desarrollo de resistencia a insulina [Copps and White, 2012; Hancer et al., 2014].

En la diabetes, la resistencia a la insulina hepática puede ser selectiva; es decir, la capacidad de la insulina para inhibir la gluconeogénesis se deteriora, mientras que la lipogénesis estimulada por insulina no. La insulina induce una lipogénesis *de novo* mediante la activación del factor de transcripción SREBP-1c a través de la vía de señalización PI3K-Akt [Hegarty et al., 2005K; Leavens et al., 2009]. En los últimos años se ha sugerido la presencia de vías compensatorias a la señalización de la insulina, lo que permite la lipogénesis hepática y la inhibición de la gluconeogénesis en los estados resistentes a la insulina. El grupo de trabajo de Blenis, ha expuesto el papel compensatorio que tienen las vías de señalización MAPK-ERK así como PI3K-Akt, así como el nexo que tienen para la homeostasis de carbohidratos y lípidos, tanto para el propio metabolismo hepatocelular como para otros tejidos involucrados [Gomes and Blenis, 2015; Mendoza et al., 2001]

Por otro lado, la lipogénesis mediada por los SREBPs que pertenecen a la familia de hélice-bucle-hélice cremallera de leucina de los factores de transcripción, y que además actúan como reguladores clave de la homeostasis lipídica, son sintetizados como proteínas precursoras inactivas que residen en la membrana del retículo endoplásmico (ER). La activación de SREBP es dependiente de la proteína activadora por escisión (SCAP, por sus siglas en inglés) la cual se encuentra unida a SREBP. Cuando los niveles de esteroides son bajos, SCAP acompaña al SREBP hacia el aparato de Golgi a través de las proteínas COPII, donde SREBP se escinde secuencialmente por los sitios proteasa 1 y 2. La porción N-terminal de SREBP (denominado "madura" o SREBP "nuclear") actúa como un factor de transcripción, la migración al núcleo en conjunto con elementos de regulación a esteroides promueve la actividad sobre los promotores de genes diana [Goldstein et al., 2006], para incrementar los niveles de esteroides. Se sabe que insulina, a través de la acción de

Akt regula la maduración, tráfico y previene la degradación de SREBP1c [Krycer et al., 2010); sin embargo, el mecanismo exacto aun es desconocido.

Algunas evidencias muestran que la principal proteína involucrada para la activación y translocación de SREBP1c hacia el núcleo es S6K [Bae et al., 2012; Inoue and Sato. 2013; ShumKerstin et al., 2016], misma que es blanco de la activación de mTORc1 y ERK1/2, lo cual sugiere que además de insulina existen diferentes vías de señalización involucradas con la lipogénesis hepática mediada por SREBP1c, en las cuales el Cd podría participar, como lo son: la inflamación y el estrés oxidativo. Así mismo, esto podría explicar nuestros resultados donde se evalúa por primera vez la expresión de SREBP1c ante la exposición con Cd en nuestro modelo, y en el cual se observa el incremento de la expresión de SREBP1c durante el desarrollo de resistencia a insulina, de manera tiempo y dosis dependiente de la exposición al metal; mostrando que el mayor incremento de su expresión fue en nuestro grupo control positivo administrado con insulina exógena que como ya se explicó anteriormente, es el principal inductor de la expresión de SREBP1c y la lipogénesis hepática.

Con relación de la lipogénesis hepática, el SREBP1c regula de manera positiva los genes diana: Srebp1c, Fas, Acc, Acly, Scd1, mGpat; estos genes dan paso al incremento proteico de las principales enzimas involucradas en la lipogénesis hepática [Wang et al., 2015]. Sin embargo, existen otros reguladores positivos para dichas enzimas, se ha reportado que ante la delección del gen Srebp1c en ratones sólo se redujo la síntesis de ácidos grasos en un 50% [Liang et al., 2002], ya que en el hígado la lipogénesis se debe principalmente a la disponibilidad de carbohidratos. Se sabe que la dieta rica en carbohidratos induce un aumento de la DNL hepática que conduce a la hipertrigliceridemia [Schwarz et al., 2003, Parks et al. 1999]. Un mayor flujo de glucosa plasmática a los hepatocitos estimula también a la lipogénesis hepática, debido a desvíos de rutas metabólicas a través de la glucólisis, la cual proporciona una fuente de carbono muy importante para una mayor lipogénesis *de novo*. El incremento de piruvato es el principal producto que vincula la glicólisis a la lipogénesis, al mismo tiempo la glucosa induce la expresión

de las enzimas implicadas en la vía lipogénica, que está mediada principalmente por la proteína de unión al elemento sensible al carbohidrato (ChREBP). ChREBP contiene varios dominios clave, incluyendo una señal de localización nuclear (NLS) cerca del extremo N, dominios de poliprolina, un dominio bHLH/LZ y un dominio de tipo cremallera leucina (Ziplike) [Yamashita et al., 2001], y que tiene como genes blanco a Lpk, Fas, Acc, Acly and Scd1, compartiendo enzimas lipogénicas como Fas, Acc, ACly y Scd1, con SREBP1c.

Debido a que nuestros animales exhiben resistencia hepática a insulina, quisimos evaluar si SREBP1c era el único factor de transcripción lipogénico netamente dependiente de insulina o si ChREBP en respuesta a las hiperglicemias presentadas ante la exposición de Cd pudieran conducir a un aumento de la lipogénesis hepática. En nuestro trabajo experimental se evaluó por primera vez la expresión de ChREBP ante la exposición a Cd asociado a un consumo de una dieta normocalórica, aspecto relevante de nuestro modelo experimental.

Nuestros resultados muestran incrementos intermitentes, mostrando al grupo 15 ppm de Cd por encima de la inmunoreactividad presentada en el grupo con 32 ppm de Cd, lo que vuelve a sugerir que los trastornos metabólicos ocasionados por el cadmio son totalmente dependientes de la concentración expuesta. Bajo estas condiciones este incremento de ChREBP parece que la glucosa no sólo es el sustrato principal de metabolismo energético, sino que también actúa como una molécula de señalización en el hígado. Al respecto se sabe que la activación de este factor de transcripción ha demostrado responder principalmente a la glucosa por diferentes mecanismos; durante el ayuno, ChREBP puede ser fosforilado por la PKA y AMPK, previniendo su translocación nuclear y aumentando su retención citoplasmática, respectivamente [Arden et al., 2012; Ge et al., 2012; Kabashima et al., 2003; Kawaguchi et al., 2001]. Bajo condiciones de incrementos de glucosa intracelular, ChREBP es desfosforilado para convertirse en una forma activa y translocarse al núcleo para aumentar su unión a su elemento de respuesta [Kawaguchi et al., 2001]. ChREBP puede ser regulado por xilulosa-5-fosfato, que es un intermediario de la ruta activada por las pentosas en altas

concentraciones de glucosa y activa específicamente a la proteína fosfatasa 2 (PP2A) para la desfosforilación de ChREBP [Kabashima et al., 2003]. Por lo tanto, PP2A juega un papel importante en la activación y translocación de ChREBP al núcleo. En este sentido se ha informado que la exposición a Cd puede inhibir la actividad de PP2A [Chen et al., 2008; Xu et al., 2016], esto explicaría nuestros resultados sobre la expresión de ChREBP en la que la exposición a 32 ppm de Cd podría inhibir en mayor grado a la PP2 y por lo tanto, concomitante activar ChREBP. Con relación a una exposición de 15 ppm de Cd. la cual inhibiría en menor grado a PP2 y produciría una mayor marca de ChREBP; nuestros resultados muestran este comportamiento. Similarmente, a lo que ocurre con SREBP1c, la transcripción de ChREBP es autorregulada por el mismo factor de transcripción, ya que contienen regiones promotoras para auto-controlar su expresión [Ma et al., 2006].

Previamente, se ha demostrado que los Receptores X del hígado (LXR) se unen directamente a la región promotora para activar transcripcionalmente a ChREBP y SREBP1c [Cha and Repa, 2007; Mitro et al., 2007]. Los LXR pertenecen a la superfamilia de los receptores hormonales nucleares de factores de transcripción regulados por los esteroides que se activan mediante la unión de ligandos fisiológicos, tales como oxisteroides [Chen et al., 2007; Janowsk et al., 1996]. Los genes diana principales de LXR incluyen a aquellos que tienen un papel central en el metabolismo del colesterol hepático. LXR, se une a elementos de respuesta (LXRE) en regiones promotoras diana, con su socio obligado, receptor de ácido 9-cis retinoico (RXR). De las dos isoformas de LXR, LXR $\alpha$  es más abundante en tejidos lipogénicos como el hígado, ya que en ratones knockout a LXR- $\alpha$  muestran un metabolismo de lípidos hepáticos defectuoso, disminuyendo la lipogénesis en un 80%, demostrando lo fundamental del papel de los LXRs sobre la lipogénesis hepática [Beaven et al., 2013; Kalaany et al., 2005].

Debido a la relevancia del factor de transcripción LXR- $\alpha$ , en el presente trabajo evaluamos su expresión en nuestros grupos control y experimental, sin hallar cambios significativos en ningún grupo experimental en relación del tiempo y la concentración de exposición. Los LXRs se asocian a la lipogénesis mediada por

insulina [Brown, 2005]; sin embargo, sigue estando en debate su mecanismo de regulación ya que también se ha informado que esta regulación es independiente de insulina [Sun et al., 2015]. Otros ligandos a LXR<sub>s</sub> fisiológicamente relevantes en relación a la lipogénesis (aunque su papel no está bien establecido), son oxiesteroles, glucosa y la glucosa-6-fosfato, los cuales pueden unirse directamente a LXR<sub>s</sub> [Mitro et al., 2007]; por lo que cabe pensar que estos eventos se dan en tiempos más tardíos de las alteraciones en el metabolismo hepático asociado a lípidos y carbohidratos, y por lo tanto, en nuestro modelo no se manifiestan incrementos significativos de la expresión y/o activación de LXR- $\alpha$ .

Una vez que analizamos el papel de los factores de transcripción lipogénicos hepáticos, fueron caracterizados por primera vez el comportamiento de la expresión de las principales enzimas lipogénicas ante la exposición de Cadmio.

La lipogénesis *de novo* comienza con la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA. Esta carboxilación dependiente de ATP es catalizada por la acetil-coA carboxilasa (ACC) [Tong and Harwood, 2006]. ACC presenta dos isoformas; ACC1 y ACC2. ACC1 se expresa en tejidos lipogénicos y ACC2 en tejidos oxidativos, principalmente hígado y músculo, respectivamente. Estas proteínas se localizan en el citosol y son enzimas limitantes de la síntesis de ácidos grasos. La actividad del ACC1 está regula a través de una variedad de estímulos [Kim, 1997]. En particular, ACC1 es activado alostéricamente por citrato, producto proveniente del ciclo de Krebs cuando la vía glucolítica esta favorecida. ACC no solo es la enzima limitante en la biosíntesis de ácidos grasos, también ACC2 produce malonil-CoA, un inhibidor alostérico de carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-I) que se requiere para el manejo de ácido grasos a nivel mitocondrial y su posterior oxidación [McGarry and Brown, 1997]; por lo cual, ante un incremento del primer paso de la lipogénesis, la oxidación de lípidos se ve inhibida favoreciendo la acumulación de lípidos. Nuestros resultados demuestran que ante la exposición a Cd se da un incremento de la expresión de la enzima ACC1 en tejido hepático, que es dependiente de la concentración y tiempo de exposición al metal. Como ya se mencionó anteriormente, esta expresión está dada por el incremento de los dos factores de

transcripción; SREBP1c y ChREBP. Este trabajo es el primero en poner en evidencia la relación de ACC1 o ACC- $\alpha$  y Cd en modelos animales, específicamente en tejido hepático, aunque ya que anteriormente se había observado una correlación positiva entre la proteína y el mRNA de estas proteínas en levaduras ante la exposición de este metal [Rajakumar and Nachiappan, 2016], así como en crustáceos [Yang et al., 2013].

El Malonil-CoA producido por la ACC es utilizado para la síntesis de ácidos grasos. Este mecanismo se lleva a cabo por el complejo multi-enzimático; FAS, el cual requiere de malonil-CoA como donante de dos carbonos y NADPH como su equivalente reductor (Chirala y Wakil, 2004). El ácido graso predominante producido por FAS es el ácido palmítico (C16: 0). Su estructura ha sido ampliamente estudiada (Asturias et al., 2005, Maier et al., 2006), siendo un complejo multifuncional compuesto por dos monómeros idénticos, de los cuales sólo la forma dimérica es activa, dicho complejo tiene siete actividades enzimáticas diferentes requeridas para la síntesis de ácido palmítico. [Chirala et al., 2001]. Los ratones transgénicos que carecen de ácido graso sintasa mueren en el útero [Chirala et al., 2003], lo que sugiere no sólo la actividad de FAS es importante durante el desarrollo, sino también que no existe una vía biosintética alternativa. Se ha reportado que la exposición a Cd incrementa la proteína en cultivos de hepatocitos [He et al., 2015], en levaduras [Rajakumar and Nachiappan, 2016], en crustáceos [Yang et al., 2013] y el mRNA en próstata de ratas [Alvarez et al., 2007]. Sin embargo, este es el primer trabajo que investiga el comportamiento de la expresión de FAS en tejido hepático de rata Wistar; nuestros resultados mostraron que los animales administrados con insulina y expuestos a 32 ppm de Cd en agua de beber aumentan la expresión de la proteína al tiempo cohorte de 45 días manteniéndose hasta el final del estudio; mientras que el grupo de animales administrados con 15 ppm de Cd mostró dicho incremento hasta los 60 días llegando al mismo nivel de los otros grupos experimentales, lo cual sugiere fuertemente que posiblemente la actividad de la enzima esta incrementada a expensas del nivel de expresión, como se ha mencionado en trabajos similares realizados en otros tejidos [Larregle et al., 2008].

Como se describió anteriormente, la glucosa por sí misma puede inducir la síntesis de lípidos, debido a intermediarios generados en rutas metabólicas como glicerol 3-fosfato; este sustrato es producido por la reducción del dihidroxiacetona-3-fosfato, como producto intermedio de la glucólisis por la enzima dihidroxiacetona-3-fosfato deshidrogenasa, o por la fosforilación de glicerol por gliceroquinasa. La acilación de glicerol-3-fosfato representa el primer paso en la biosíntesis de glicerolípidos. La reacción es catalizada por acil-CoA: glicerol 3-fosfato aciltransferasa (GPAT), resultando en la producción de 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato (ácido lisofosfatídico; LPA) [Kent, 1995; Wendel et al., 2009]. Existen dos isoenzimas de GPAT, que han sido identificadas y diferenciadas en base a su pH óptimo, valor de Km y su localización celular. Particularmente, fue de nuestro interés evaluar el comportamiento de la GPAT mitocondrial (mtGPAT) ya que es un blanco de SREBP1c [Wang et al., 2015]. La localización de mtGPAT en la membrana externa mitocondrial implica que su producto LPA debe ser transportado al retículo endoplásmico, donde se localizan las enzimas que culminan la síntesis de TG y la mayoría de las enzimas que finalizan la síntesis de glicerofosfolípidos. Nuestros resultados muestran que, ante la exposición a Cd los niveles hepáticos de la mGPAT se incrementan de manera dosis dependiente durante los primeros 15 y 30 días de exposición a Cd, lo que esta en concordancia con lo reportado en tejido prostático [Alvarez et al., 2007], y en tejido hepático [Larregle et al., 2008], con relación al mensajero y proteína, respectivamente. Es probable que durante el tiempo de exposición a Cd, el G3P sea el principal sustrato para la formación de gliceroles. Este incremento es mayor que el mostrado en el grupo de animales administrados con insulina, resultados que se relacionan con el incremento de SREBP1c. Sin embargo, en el cohorte temporal de 45 y 60 días, se puede observar una disminución importante en los grupos expuestos a Cd, hasta ser equiparable al control, mientras que el grupo insulina se mantiene elevada la inmunoreactividad de la proteína.

Con base en estos resultados se podría suponer que hacia la segunda mitad del tiempo de exposición al metal, la vía principal de la síntesis de gliceroles está dada por sustratos como ácidos grasos, los cuales son sintetizados por ACC, FAS,

desaturasas (SCD) y elongasas (EVOL). En conjunto, nuestros resultados proporcionan suficiente evidencia para sustentar que se está llevando a cabo una lipogénesis *de novo*, independiente al sustrato glicerol 3-fosfato de la vía glucolítica, contrario a los tiempos de la primera mitad de exposición donde mGPAT se encuentra incrementada.

Concomitantemente, el LPA proveniente de reacción por mGPAT es acilado por una segundo acil-CoA, bajo la catálisis de acilglicerol-fosfato acil transferasa (AGPAT), produciendo ácido fosfatídico (PA). La AGPAT es desfosforilada por la acción de fosfatasa fosfatídica (PAP) para generar diacilglicerol (DG). En la vía de síntesis de DG en la DNL la  $\Delta 9$ -desaturasa (SCD) actúa tanto sobre palmitato como con el ácido esteárico ambos sintetizados por la FAS, para producir ácido pamtoleico y ácido oleico. Posteriormente, las elongasas (Elov) juegan un papel crítico en la síntesis de una variedad de ácidos grasos, ya sea actuando sobre ácidos grasos producidos endógenamente (a partir de la lipogénesis) o exógenos (dietéticos), propiciando así los sustratos para la posterior esterificación de mono glicéridos a través de la Mono glicerol acil transferasa (MGAT).

La diacilglicerol acil transferasa (DGAT) cataliza la etapa final en la síntesis de TG en mamíferos que fusiona la vía del MGAT y la vía del G3P [Coleman 2004]. Hay dos isoformas de DGAT; DGAT1 y DGAT2 [Cases et al., 1998; Oelkers et al., 1998], aunque ambas enzimas catalizan las mismas reacciones en la síntesis de TG con DAG o MAG y acil-CoA como sustratos, se distinguen por sus diferencias en las propiedades catalíticas [Cao et al., 2007; Cheng et al., 2008], localización subcelular [Stone et al., 2009], y su regulación fisiológica [Meegalla et al., 2002]. Cuando se utiliza MAG como sustrato, el producto enzimático principal catalizada por DGAT2 es TG. DGAT2 juega mayoritariamente el papel crítico en la síntesis de TG en varios tejidos. En el presenta trabajo se puso en evidencia el incremento de la expresión de la DGAT2 en tejido hepático ante la exposición a Cd, mostrando que el incremento fue dosis y tiempo dependiente, y como en algunas enzimas ya mencionadas su incremento está por encima del grupo administrado con insulina exógena. Estos datos concuerdan con lo reportado por otros autores después de

una exposición a Cd, en los que se han observado tanto incrementos en le mRNA de DGAT2 en próstata [Alvarez et al., 2007], así como el incremento de la proteína en levaduras [Rajakumar and Nachiappan, 2016].

Por otra parte, se ha reportado que la sobreexpresión de DGAT2 conduce a un aumento de los depósitos grasos, mencionados como grandes gotas de lípidos citosólicas [Stone et al., 2003]. En este sentido, previamente nuestro grupo de investigación ya ha reportado la presencia de esteatosis micro-vesicular en tejido hepático ante la exposición de 32 ppm de Cd durante 3, 4 y 5 meses de exposición [Sarmiento-Ortega et al., 2016]. Sin embargo, no existen reportes de dicho comportamiento durante etapas más tempranas de la exposición al metal. En el presente trabajo, mediante la cuantificación directa de triglicéridos en tejido hepático observamos su incremento desde los primeros 15 días de exposición, siendo este aumento progresivo conforme avanzó el tiempo y la dosis de exposición. Resultados que presentan una concordancia con la cuantificación de ácidos grasos en tejido, y su posible biotransformación a TG, ya que se observa que la concentración de estos Acidos Grasos disminuyen conforme incrementan las concentraciones de TG. Debido a estos resultados, se puede suponer que se está llevando a cabo la esterificación de TAG por medio de la DGAT2.

Un mayor almacenamiento de TAG en los tejidos se asocia con un mayor nivel de resistencia a la insulina, pero el mecanismo subyacente no está del todo claro, aunque en los últimos años se ha establecido que el incremento de TAG conlleva a lipotoxicidad, la cual también fomenta un incremento de ceramida hepática (derivada de la lipogénesis), misma que inhibe la fosforilación de Akt causando resistencia a la insulina [Shi and Cheng, 2008; Summers et al., 1998]. Además, el modelo de lipotoxicidad establece que los diacil glicerolés sustratos de DGAT, son activadores de la proteína cinasa C (PKC) y que la sobre-activación de las isoformas de PKC, incluyendo PKC- $\beta$ , - $\alpha$ , - $\delta$ , - $\epsilon$  y - $\theta$ , están vinculadas a la resistencia a la insulina hepática, por inactivación de IRS, así como del receptor de insulina [DeFronzo, 2010; Ni et al., 2015; Perry et al., 2015; Samuel and Shulman, 2012; Shi and Cheng, 2008]. En este sentido, Shulman et al., han informado que

tras la activación de PKC- $\epsilon$  por DAG, éste se transloca inhibiendo actividad de receptor a insulina, fosforilándolo en residuos de treonina específicamente Thr1160, que se encuentra en el bucle de activación de la cinasa, desestabilizando además su configuración activa y lo por tanto, inhibiendo su actividad. Estos datos recientes, proporcionan una visión mecanística de la polémica asociación entre los lípidos hepáticos y la resistencia a la insulina en dicho tejido [Petersen et al., 2016]. Los resultados de Shulman van de la mano con lo que se reporta en el presente trabajo, tanto con relación a la importancia de los lípidos hepáticos, como a la resistencia a insulina en el órgano con los cambios sobre la dinámica de fosforilación del receptor a insulina ante una exposición a Cd. Sin embargo, aún es incierto si el hígado graso es causa del desarrollo de la resistencia a la insulina hepática o viceversa, aunque los datos sugieren fuertemente que el hígado graso es un reflejo de la magnitud de la resistencia desarrollada por el órgano.

Bajo condiciones de resistencia a insulina, es bien sabido que adicionalmente a la alteración en los niveles de carbohidratos, secundariamente se presenta una alteración en la dinámica lipídica, repercutiendo en la concentración de las lipoproteínas plasmática, consistentes con los disturbios metabólicos relacionados con la señalización de glucosa e insulina. La hipercolesterolemia asociada a hipertrigliceridemia, con su correspondiente incremento lipoproteico de VLDL y LDL y combinado con el decremento de HDL, fue observado en las ratas expuestas a Cd. [Larregle et al., 2008; Packard, 2003; Prabu et al., 2013, Sarmiento-Ortega et al., 2016, Treviño et al., 2015]. Los estados lipogénicos no sólo promueven la acumulación ectópica dentro de hígado, los que causa una esteatosis hepática y resistencia a la insulina, si no que aumentan la movilización de triglicéridos mediada por las lipoproteínas VLDL.

Una vez que se han sintetizados los TG, estos son transportados por las VLDL fuera del hígado. Las VLDL son complejos moleculares que contienen tanto lípidos como proteínas, y sirven como vehículo de exportación de lípidos desde hepatocitos. En su superficie, las VLDLs se caracterizan por tener apolipoproteína B 100 (apoB100), que es esencial en el montaje y producción de VLDL [Sparks,

Sparks and Adeli, 2012]. En condiciones normales este proceso de exportación es inhibido por la señalización insulínica, limitando la disponibilidad de ApoB [Hass et al., 2013].

La ApoB se sintetiza de acuerdo a la necesidad secretoria de VLDL, y el resto se degrada, la velocidad de degradación de apoB es estimulada por la acción de insulina, al mismo tiempo se suprime la actividad de la proteína transferidora de triglicéridos microsomales (MTP) por translocación FoxO1 fuera del núcleo [Kamagate et al 2008; Wu et al., 2010]. La sobreexpresión de MTP aumenta el flujo de VLDL, pero este aumento depende de la presencia de apoB, así como el exceso de reservas de lípidos hepáticos. Sin embargo, en estados de resistencia a la insulina, la supresión de la inhibición de MTP no es correcta y por lo tanto afecta la degradación de apoB (Kamagate et al 2008; Wu et al., 2010). El mecanismo descrito puede explicar de manera congruente nuestros resultados, ya que se evidenció tanto el aumento de la concentración de ApoB (que se da únicamente en los grupos expuestos a Cd) en dependencia de la dosis y tiempo de exposición, resultando en un inminente incremento de VLDL séricos.

Diversas fuentes indican que un aumento de la lipogénesis *de novo* también puede afectar el tamaño de VLDL, generando partículas de mayor tamaño y por lo tanto de mayor capacidad de transporte de TAG [Grefhorst et al., 2002; Choi and Ginsberg, 2011]. En este sentido, previamente hemos reportado un incremento en el tamaño de las partículas de VLDL después de la exposición de Cd [Sarmiento-Ortega et al., 2016]. El aumento en el tamaño en las partículas VLDL, está en relación a la capacidad de lipidación producida a través de la fusión de gotas de lípidos neutros en citoplasma [Wang et al., 2007], mismas que con anterioridad fueron observadas ante una exposición a Cd. [Sarmiento-Ortega et al., 2016].

Por otro lado, para caracterizar molecularmente la resistencia a insulina hepática, fue evaluado el producto final de la vía glucogénica, cuantificando glucógeno hepático. Los resultados demuestran que la exposición a Cd, el nivel de glucógeno hepático disminuye desde los primeros 15 días del análisis, siendo dosis y tiempo dependiente, como ya se ha reportado anteriormente [Chapatwala et al.,

1980, 1982; Ciciik and Engin, 2005; Leung and Furness et al., 2001; Lowe-Jinde and Niimi, 1989; Merali and Singhal, 1980; Treviño et al., 2015].

Es importante resaltar que los indicadores matemáticos de resistencia a insulina no mostraron evidencia sino hasta después de 30 días de exposición a Cd, así mismo sucedió con las modificaciones sobre la fosforilación en el receptor de insulina. Sin embargo, la disminución de glucógeno a los 15 días, podría ser el primer indicio de una mala señalización por insulina a nivel celular, ya que la síntesis de glucógeno hepático es regulada directamente por la actividad de insulina [Ortmeyer et al., 1997; Stephen et al., 2004; Wilamowitz-Moellendorff et al., 2013]. La vía de síntesis y resguardo de glucógeno, requiere de una supresión coordinada de la glucógeno fosforilasa y la activación de la glucógeno sintasa, ambas mediadas por insulina. En estados de resistencia a insulina la síntesis de glucógeno hepático se ve reducida de manera importante, y se acompaña de un fracaso sobre la supresión adecuada la glucógeno fosforilasa, y por lo tanto de la glucógeno sintasa [DeFronzo, 2010; Boucher et al., 2014; Wilcox, 2005]. Como la síntesis de glucógeno es el principal destino metabólico de la glucosa en el hígado, la glucosa que no se puede depositar en forma de glucógeno debe ser liberada, oxidada, o desviada a vías de síntesis de lípidos, por los diferentes mecanismos ya explicados anteriormente.

Por último se acepta ampliamente, que los ácidos grasos libres, pueden mediar muchos efectos metabólicos adversos, especialmente, resistencia a la insulina [Ishii et al., 2015; Mota et al., 2016; Samuel et al., 2012; Sears and Perry, 2015; Tilg et al., 2016]. Estos circulan en el plasma unidos a la albúmina, y su origen es a partir del pobre resguardo de TAG en tejido adiposo, al mismo tiempo que su aclaramiento está asociado con hígado, músculo y miocardio [Gordon, 1956; Gordon et al. 1957]. En el tejido adiposo, la insulina actúa como una hormona anti-lipolítica, ya que disminuye la actividad de la lipasa sensible a hormonas (HSL), la cual se requiere para liberar los ácidos grasos almacenados [Jaworski et al., 2007]. Con el desarrollo de la inflamación celular y resistencia a la insulina en adipocitos, altas concentraciones de ácidos grasos puede entrar en la circulación y ser

captados por otros órganos que no son capaces de almacenar de forma segura grandes cantidades de grasa, conduciendo al desarrollo de resistencia a la insulina multi-órgano [Treviño et al., 2015]. En nuestro trabajo experimental, también se evaluó el índice de disfunción adipocitaria por resistencia a insulina (IDA-IR), el cual se incrementa al primer tiempo de exposición a las dos concentraciones usadas (datos no mostrados), compaginando con el incremento en el flujo de ácidos grasos libres desde los primeros 15 días, siendo el grupo expuesto a 32 ppm de Cd quien muestra un mayor incremento.

Debido a la rápida acumulación de ácidos grasos en el hígado y la capacidad de este para biotransformarlos a triglicéridos, es posible pensar que los intermediarios como DAG también aumentan en los hepatocitos [Kraegen et al., 1991; Samuel et al., 2012; Tilg et al., 2016]. Por esta razón, se ha propuesto al incremento de lípidos hepáticos como un mejor marcador clínico, que la misma resistencia a la insulina. La síntesis de lípidos *de novo* a partir de glucosa en el hígado es un contribuyente en menor proporción a este aumento de flujo de AGL en el hígado [Diraison et al., 2003]. En este sentido aunque se ha propuesto una teoría que propone que la lipogénesis es independiente de la resistencia hepática a insulina y el factor más importante es el flujo de ácidos grasos libres [Vatner et al., 2015], nuestros resultados ponen en evidencia el importante papel que desempeña tanto el flujo de AGL como el incremento de factores de transcripción lipogénicos durante la resistencia hepática a insulina, como una contribución al desarrollo de hígado graso. Con este enfoque, se puede inferir que las concentraciones elevadas de AGL se asocian de forma aguda con resistencia a la insulina, con la absorción de glucosa periférica [Boden et al., 1994; Shah et al., 2002], la gluconeogénesis hepática [Roden et al., 2000; Staehr et al., 2003], y con intolerancia a la glucosa [Nielsen et al., 2004].

## 11.- Conclusiones

- El cadmio desde una concentración baja desarrollo de resistencia a insulina al primer mes de exposición.
- La exposición de cadmio modifico la activación del receptor de insulina, mostrando una fosforilacion de residuos de treonina y la activación de la vía ERK1/2 desde la etapa temprana de exposición, mientras que la vía AKT disminuye en la etapa tardía.
- La resistencia a insulina debida a la fosforilacion poco común del receptor de insulina y la activación de ERK1/2, pueden ser las responsables de la activación de SREBP1c que induce la sistesis de *novo* de lípidos.
- Aunado con el incremento de la captura hepática de glucosa, se activa ChREBP que contribuye con la síntesis de *novo* de lípidos, promoviendo desregulacion del metabolismo de carbohidratos y lípidos desde el primer mes de exposición a cadmio.
- El incremento de los factores de transcripción lipogénicos promueve el incremento de la expresión de las principales enzimas lipogenicas; ACC, FAS, mGPAT y DGAT, de forma tiempo y dosis dependiente de la exposición a cadmio.
- La lipogénesis desregulada por la presencia de Cd fue caracterizada por hipertrigliceridemia y esteatosis hepática a partir del primer mes de exposición, asociado fuertemente con Resistencia hepática a insulina.

## 12.- Bibliografia

Afridi HI, Kazi TG, Kazi N, Jamali MK, Arain MB, Jalbani N. 2008. Evaluation of status of toxic metals in biological samples of diabetes mellitus patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 8:280-288.

Agency for Toxic Substance and Disease Registry, U.S. 2008. Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA.

Agency for Toxic Substance and Disease Registry, U.S. 2012. Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA.

Aguado B, Campbell RD. 1998. Characterization of a human lysophosphatidic acid acyltransferase that is encoded by a gene located in the class III region of the human major histocompatibility complex. *Journal of Biological Chemistry* 273, 4096–4105.

Ahmed Z, Smith BJ, Pilla TS. 2000. The APS adapter protein couples the insulin receptor to the phosphorylation of c-Cbl and facilitates ligand-stimulated ubiquitination of the insulin receptor. *FEBS Letters* 475; 31-34

Alvarez SM, Gomez NN, Scardapane L, Fornes MW, Gimenez MS. 2007. Effects of chronic exposure to cadmium on prostate lipids and morphology. *BioMetals.* 20:727–741

Ameer F, Scanduzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. 2014. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 63, 895–902.

Andreozzi F, Procopio C, Greco A, Mannino GC, Miele C, Raciti GA, Iadicco C, Beguinot F, Pontiroli AE, Hribal ML, Folli F, Sesti G. Increased levels of the Akt-specific phosphatase PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP)-1 in obese participants are associated with insulin resistance. *Diabetologia* (2011) 54:1879–1887

Arden, C. et al. Fructose 2,6-bisphosphate is essential for glucose-regulated gene transcription of glucose-6-phosphatase and other ChREBP target genes in hepatocytes. *Biochem. J.* 443, 111–123. (2012).

Asturias, F. J., Chadick, J. Z., Cheung, I. K., Stark, H., Witkowski, A., Joshi, A. K., and Smith, S. Structure and molecular organization of mammalian fatty acid synthase. *Nat Struct Mol Biol* 12 (2005) 225–232.

Bae EJ, Xu, Oh D, Bandyopadhyay Lagakos WS, Keshwani M, and Olefsky JM. 2012. Liver-specific p70 S6 Kinase Depletion Protects against Hepatic Steatosis and Systemic Insulin Resistance. *J Biol Chem.* 25; 287(22): 18769–18780.

Barnard, R. J. and Youngren, J. F. (1992). Regulation of glucose transport in skeletal muscle. *FASEB J.* 6, 3238 – 3244.

Beaven, S. W. et al. Reciprocal regulation of hepatic and adipose lipogenesis by liver X receptors in obesity and insulin resistance. *Cell Metab.* 18, 106–117 (2013).

Bennett L, Keirs R, Peebles E, Gerard P. 2007. Methodologies of Tissue Preservation and Analysis of the Glycogen Content of the Broiler Chick Liver 1,2. *Poultry Science.* 86, (12): 2653-2665.

Bianchi A, Evans JL, Iverson AJ, Nordlund AC, Watts TD, Witters LA. 1990. Identification of an isozyimic form of acetyl-CoA carboxylase. *Journal of Biological Chemistry* 265, 1502–1509.

Blum JL, Rosenblum LK, Grunig G, Beasley MB, Xiong JQ, Zelikoff JT. 2014. Short-term inhalation of cadmium oxide nanoparticles alters pulmonary dynamics associated with lung injury, inflammation, and repair in a mouse model. *Inhal Toxicol.* 26(1):48-58.

Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 1994;93:2438–2446

Boucher J, Kleinridders A, and Kah CR, 2014. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6:a009191.

Brako EE, Wilson AK, Jonah MM, Blum CA, Cerny EA, Williams KL and Bhattacharyya MH. 2003. Cadmium Pathways during Gestation and Lactation in Control versus Metallothionein 1, 2-Knockout Mice. *Toxicological Sciences.* 71, 154–163.

Bratusch-Marrain PR, Komjati M, Waldhausl WK. 1986. Efficacy of pulsatile versus continuous insulin administration on hepatic glucose production and glucose utilization in type 1 diabetic humans. *Diabetes* 35; 922–926.

Brown, M. S. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 11245–11250 (2004).  
Brunk S, Swanson J. 1981. Colorimetric method for free fatty acids in serum validated by comparison with gas chromatography. *Clin Chem.* 27(6):924-6.

Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E and Ramos MP. 2008. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E1269–E1276.

Cao J, Cheng L, Shi Y. Catalytic properties of MGAT3, a putative triacylglycerol synthase. *J Lipid Res*48: 583–591, 2007 [PubMed]

Cases S, Smith SJ, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Novak S, Collins C, Welch CB, Lusic AJ, Erickson SK, Farese RV Jr. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13018–13023, 1998

Cha, J. Y. & Repa, J. J. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J. Biol. Chem.* 282, 743–751 (2007).

Chalasani, N., Wilson, L., Kleiner, D. E., Cummings, O. W., Brunt, E. M. Unalp, A. (2008). Relationship of steatosis grade and zonal location to histological features of steatohepatitis in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease *Journal of Hepatology* 48, 829–834.

Chan HM, Tamura Y, Cherian MG, Goyer RA. 1993. Pregnancy-associated changes in plasma metallothionein concentration and renal cadmium accumulation in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 202(4):420-7.

Chang KC, Hsu CC, Liu SH, Su CC, Yen CC, Lee MJ, Chen KL, Ho TJ, Hung DZ, Wu CC, Lu TH, Su YC, Chen YW, Huang CF. 2013. Cadmium Induces Apoptosis in Pancreatic  $\beta$ -Cells through a Mitochondria-Dependent Pathway: The Role of Oxidative Stress-Mediated c-Jun N-Terminal Kinase Activation. *PLoS ONE.* 8(2): e54374.

Chang KC, Hsu CC, Liu SH, Su CC, Yen CC, Lee MJ, Chen KL, Ho TJ, Hung DZ, Wu CC, Lu TH, Su YC, Chen YW, Huang CF. 2013. Cadmium Induces Apoptosis in Pancreatic  $\beta$ -Cells through a Mitochondria-Dependent Pathway: The Role of Oxidative Stress-Mediated c-Jun N-Terminal Kinase Activation. *PLoS ONE.* 8(2): e54374.

Chang P, Hong-Da L, Zheng G, Xiao Y, Xu-Ben H, Di-Dong X, Xi-Bin Z, Hao-Wen L, Jun-Yi T, Yun-Fei X, Jia-Qi Y, Lian-Ying Z, Hao F, Kun-Hong X, Yu-Guo C, Jiang-Yun W, Qi P, Wei C & Jin-Peng S. 2013. Cadmium is a potent inhibitor of PPM phosphatases and targets the M1 binding site. *Scientific Reports* 3, Article number: 2333

Chang Hegarty, B. D., Bobard, A., Hainault, I., Ferré, P., Bossard, P. & Foufelle, F. (2005). Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 791–796.

Chapatwala KD, Hobson M, Desaiyah D, Rajanna D. Effect of cadmium on hepatic and renal gluconeogenic enzymes in female rats, *Toxicol. Lett.* 12 (1982) 27e34.

Chapatwala KD, Rajanna J, Desaiyah D. Cadmium induced changes in gluconeogenic enzymes in rat kidney and liver, *Drug Chem. Toxicol.* 3 (1980) 407e420.

Chapatwala KD, Hobson M, Desaiyah D, Rajanna B. 1982. Effect of cadmium on hepatic and renal gluconeogenic enzymes in female rats. *Toxicol. Lett.* 12; 27-34.

Chapatwala KD, Rajanna B, Desaiyah D. 1980. Cadmium induced changes in gluconeogenic enzymes in rat kidney and liver. *Drug Chem. Toxicol.* 3; 407-420.

Chatterjee S, Kundu S, Sengupta S, Bhattacharyya A. 2009. Divergence to apoptosis from ROS induced cell cycle arrest: effect of cadmium. *Mutat. Res.* 663, 22–31.

Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M. & Mangelsdorf, D. J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-Files. *Science* 294, 1866–1870.

Chen L, Liu L, Huang S. (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 Radic Biol Med.* 1; 45(7): 1035-44

Chen YW, Yang CY, Huang CF, Hung DZ, Leung YM, Liu SH. 2009. Heavy metals, islet function and diabetes development. *Islets.* 1:3, 169-176.

Chen, W., Chen, G., Head, D. L., Mangelsdorf, D. J. & Russell, D. W. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab.* 5, 73–79 (2007).  
Cheng D, Iqbal J, Devenny J, Chu CH, Chen L, Dong J, Seethala R, Keim WJ, Azzara AV, Lawrence RM, Pellemounter MA, Hussain MM. Acylation of acylglycerols by acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1). Functional importance of DGAT1 in the intestinal fat absorption. *J Biol Chem* 283: 29802–29811, 2008

Chirala, S. S., and Wakil, S. J. Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids* 39. (2004) 1045–1053.

Chirala, S. S., Jayakumar, A., Gu, Z. W., and Wakil, S. J. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 3104–3108.

Choi SH, Ginsberg HN. 2011. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 22, 353–363.

Chung JO, Cho DH, Chung DJ and Chung MY. 2012. Associations among Body Mass Index, Insulin Resistance, and Pancreatic  $\beta$ -Cell Function in Korean Patients with NewOnset Type 2 Diabetes. *korean j intern med.* 27:66-71.

Ciciik B, Engin K. The Effects of Cadmium on Levels of Glucose in Serum and Glycogen Reserves in the Liver and Muscle Tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758). *Turk J Vet Anim Sci* 29 (2005) 113-117.

Coleman RA, Lee DP. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in Lipid Research* 43, 134–176.

Copps KD, White MF (2012) Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* 55:2565–2582

DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia*. 2010 Jul; 53(7): 1270–1287.

Diraison F, Yankah V, Letexier D, Dusserre E, Jones P, Beylot M. Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *J Lipid Res*. 2003;44(4):846–53.

Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation* 115, 1343–1351.

Dudley RE, Gammal LM, Klaassen CD. 1985. Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: likely role of hepatic cadmium-metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 77 (3):414–426.

Edwards JR, Prozialeck WC. 2009. Cadmium, diabetes and chronic kidney disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238; 289–293.

Elinder CG, Kjellstrom T, Lind B, Linnman L, Piscator M, Sundstedt K, *Environ. Res.* 1983, 32, 220–227.

Elinder CG, Lind B, Kjellstrom T, Linnman L, Friberg L, *Arch. Environ. Health* 1976, 31, 292–302.  
Erk M and Raspor B. 1998. Evaluation of cadmium±metallothionein stability constants based on voltammetric measurements. *Analytica Chimica Acta* 360: 189-194

Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, Okunade A, Klein S. 2009. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106; 15430–15435.

Ferré, P. & Foufelle, F. (2010). Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12, 83–92.

Ficková M 1 , Eybl V , Kotyzová D , Mičková V , Möstböck S , Brtko J . 2003. Long lasting cadmium intake is associated with reduction of insulin receptors in rat adipocytes. *Biometals*; 16 (4): 561-6.  
Folch J, Lees M, Sloane H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*.226(1):497-509.

Fon Tacer, K. & Rozman, D. (2011). Nonalcoholic fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *Journal of Lipids* 2011, 1–14.

Foster DW, Bloom B. 1963. The synthesis of fatty acids by rat liver slices in tritiated water. *Journal of Biological Chemistry* 238, 888–892.

Friberg I.1950. Health hazards in the manufacture of alkaline accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning; a clinical and experimental study. *Acta Med Scand Suppl.* 1950; 240:1-124.

Fujishiro H, Okugaki S, Kubota K, Fujiyama T, Miyataka H, Himeno S. The role of ZIP8 down-regulation in cadmium-resistant metallothionein-null cells. *J Appl Toxicol.* 2009; 29 (5):367–373.

G. Jiang, W. Duan, L. Xu, S. Song, C. Zhu, L. Wu, *Toxicol. In Vitro* 2009, 23, 973–978.

Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., Galadari, A. & Thayyullathil, F. (2013). Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms. *Lipids in Health and Disease* 12, 1–16.

Gao Z, Yin J, Zhang J, Z Yun Ye J. Reglamiento de HIF-1 actividad (alfa) en el tejido adiposo por factores asociadas a la obesidad: la adipogénesis, la insulina y la hipoxia. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 300 (5): E877-85

Garg, A. (2000). Lipodystrophies. *The American Journal of Medicine* 108, 143–152.

Gavin Jr III, Roth J, Neville DM Jr, De Meyts P, Buell DN. 1974. Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71; 84 – 88.

Ge, Q. et al. Structural characterization of a unique interface between carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) and 14-3-3 $\beta$  protein. *J. Biol. Chem.* 287, 41914–41921 (2012).

Girijashanker K, He L, Soleimani M, Reed JM, Li H, Liu Z, Wang B, Dalton TP, and Nebert DW. 2008. Slc39a14 Gene Encodes ZIP14, A Metal/Bicarbonate Symporter: Similarities to the ZIP8 Transporter. *Mol Pharmacol.* 73:1413–1423.

Girijashanker K., He L., Soleimani M., Reed J. M., Li H., Liu Z., Wang B., Dalton T. P., Nebert D. W. (2008). Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: Similarities to the ZIP8 transporter. *Mol. Pharmacol.* 73, 1413–1423

Goldstein, J.L. et al. (2006) Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* 124, 35–46

Gomes AP, and Blenis J. 2015. A nexus for cellular homeostasis: the interplay between metabolic and signal transduction pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, 34:110–117

González M, Banderas JA, raya C, Báez A, Belmont R. 1997. Cuantificación de Plomo, Cd y Cromo mediante Sialoquímica. *Salud Pública en México.* 39, 003: 179 -186.

Gordon RS Jr, Cherkes A. Unesterified fatty acid in human blood plasma. *J Clin Invest* 1956;35:206–212pmid:13286339

Gordon RS Jr. Unesterified fatty acid in human blood plasma. II. The transport function of unesterified fatty acid. *J Clin Invest* 1957;36:810–815pmid:13439020 MedlineWeb of ScienceGoogle Scholar

Grefhorst A, Elzinga BM, Voshol PJ, Plosch T, Kok T, Bloks VW, van der Sluijs F H, Havekes LM, Romijn JA, Verkade HJ, Kuipers F. 2002. Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *Journal of Biological Chemistry* 277, 34182–34190.

Gual, P., Marchand-Brustel, Y. and Tanti, J. F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87, 99 – 109

Gunshin H1, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 388(6641):482-8.

Guo, S. (2014). Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *Journal of Endocrinology* 220, T1–T23.

Haas JT, Miao J, Chanda D, Wang Y, Zhao E, Haas ME, Vaitheesvaran V, Farese RV, Kurland IJ, Graham M, Crooke S, Fougelle S, Biddinger SB. 2012. Hepatic Insulin Signaling Is Required for Obesity-Dependent Expression of SREBP-1c mRNA but Not for Feeding-Dependent Expression. *Metab Cell.* 15, 873-884.

Haas M, Attie AD, Biddinger S. 2013. The regulation of ApoB metabolism by insulin. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, Vol. 24, No. 8

Habeebu SS, Liu J, Liu Y, Klaassen CD. Metallothionein-null mice are more susceptible than wild-type mice to chronic CdCl<sub>2</sub>-induced bone injury. *Toxicol Sci.* 2000a; 56:211–219.

Han JC, Park SY, Hah BG, Choi GH, Kim YK, Kwon TH, Kim EK, Lachaal M, Jung CY, Lee W. 2003. Cadmium induces impaired glucose tolerance in rat by down-regulating GLUT4 expression in adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 413 213-220

Hancer NJ, Qiu W, Cherella C, Li Y, Copps KD, White MF (2014) Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 289:12467–12484

Hao Q1, Hong SH, Maret W. 2007. Lipid raft-dependent endocytosis of metallothionein in HepG2 cells. *J Cell Physiol.* 210(2):428-35.

Hassan B, Akcakanat A, Holder AM, Meric-Bernstam F, Targeting the PI3-Kinase/Akt/mTOR Signaling Pathway. *Surgical oncology clinics of North America* 2013,4, 6416-64

He W, Guo W, Qian Y, Zhang S, Ren D, Liu S. 2015. Synergistic hepatotoxicity by cadmium and chlorpyrifos: Disordered hepatic lipid homeostasis. *Molecular medicine reports.* 12: 303-308, 2015

Hectors TLM, Vanparys C, van der Ven K, Martens GA, Jorens PG, Van Gaal LF, Covaci A, De Coen W, Blust R. 2011. Environmental pollutants and type 2 diabetes: A review of mechanisms that can disrupt beta cell function. *Diabetologia.* 54; 1273-1290.

Hegarty B. D., Bobard A., Hainault I., Ferré P., Bossard P., Fougelle F. (2005) Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 791–796

Hemmings BA and Restuccia DF. 2012. PI3K-PKB/Akt Pathway. Cold Spring Harbor Laboratory Press; all rights reserved; doi: 10.1101/cshperspect.a011189

Hughes BP, Both K, Harland L, Hunt J, Hurst KM, Lewis M, Barritt GJ. 1993. Identification of an mRNA species which encodes a voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channel in rat liver mRNA. *Biochem Mol Biol Int.*31 (1):193-200.

International Agency for Research on Cancer. 2008. Cadmium and Cadmium compounds. Agency incorporated World Health Organization.

Irving H and Williams RJ. 1948. Order of Stability of Metal Complexes. *Nature.* 162; 746-747.

Ishibashi, H., Nakamura, M., Komori, A., Migita, K. & Shimoda, S. (2009). Liver architecture, cell function, and disease. *Seminars in Immunopathology* 31, 399–409.

Ishii M, Maeda A, Tani S, Akagawa M. Palmitate induces insulin resistance in human HepG2 hepatocytes by enhancing ubiquitination and proteasomal degradation of key insulin signaling molecules. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 566 (2015) 26–35

J. Liu, A. Lin, *Cell Res.* 2005, 15, 36–42.

Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R. & Mangelsdorf, D. J. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR $\alpha$ . *Nature* 383, 728–731 (1996).

Jarup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M, *Scand. J. Work Environ. Health* 1998, 24 Suppl 1, 1–51.

Jaworski K, Sarkadi E-Nagy, Duncan RE, Ahmadian M, Sul SA. Regulaci3n del metabolismo de los triglic3ridos. IV.Regulaci3n hormonal de la lip3lisis en el tejido adiposo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 293 (1): G1-4.

Jensen-Urstad ALP, Semenkovich CF. 2012. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger?. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1821; 747–753

Jing Y, Liu LZ, Jiang Y, Zhu Y, Guo NL, Barnett J, Rojanasakul Y, Agani, Jiang BH, *Toxicol. Sci.* 2012, 125, 10–19.

Jitrapakdee, S. (2012). Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44, 33–45.

Johnson TO, Ermolieff J and Jirousek MR. 2002. Protein tyrosine phosphatase 1b inhibitors for diabetes. *Nature reviews, drug discovery.* Vol 1, 696-709

Jumarie C. 2002. Cadmium transport through type II alveolar cell monolayers: contribution of transcellular and paracellular pathways in the rat A769 and the human A549 cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1564: 487 – 499.

Jun Inoue and Ryuichiro Sato. 2013 New insights into the activation of sterol regulatory element-binding proteins by proteolytic processing. *Biomolecular Concepts.* Volume 4, Issue 4 (Aug 2013)  
Jungermann, K. & Keitzmann, T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annual Review of Nutrition* 16, 179–203.

Kabashima, T., Kawaguchi, T., Wadzinski, B. E. & Uyeda, K. Xylulose 5-phosphate mediates glucose induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 5107–5112 (2003).

Kalaany, N. Y. et al. LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. *Cell Metab.* 1, 231–244 (2005).

Kamagate A., Qu S., Perdomo G., Su D., Kim D. H., Slusher S., Meseck M., Dong H. H. (2008) FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 2347–2364

Katz, N. R. (1992). Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *The Journal of Nutrition* 122, 843–849.

Kawaguchi, T., Takenoshita, M., Kabashima, T. & Uyeda, K. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/ dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 13710–13715 (2001).

Kawano, Y. & Cohen, D. (2013). Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology* 48, 434–441.

Kent C. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Ann Rev Biochem* 1995;64:315–43.

Kim, K. H. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu Rev Nutr* 17 (1997) 77–99.

Klaassen CD, Liu J and Diwan BA. 2009. Metallothionein Protection of Cadmium Toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1; 238(3): 215–220.

Koopmans SJ, Sips HCM, Krans HMJ, Radder JK. 1996. Pulsatile intravenous insulin replacement in streptozotocin diabetic rats is more efficient than continuous delivery: effects on glycaemic control, insulin-mediated glucose metabolism and lipolysis. *Diabetologia* 39; 391– 400.

Korenblat, K. M., Fabbrini, E., Mohammed, B. S. & Klein, S. (2008). Liver, muscle and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects. *Gastroenterology* 134, 1369–1375

Kovacs G, Danko T, Bergeron MJ, Balazs B, Suzuki Y, Zsembery A, Hediger MA. 2011. Heavy metal cations permeate the TRPV6 epithelial cation channel. *Cell Calcium.* 49(1):43-55.

Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes.* 1991;40(11):1397–403.  
Krycer JR, Sharpe L, Luu W and Brown AJ. 2010. The Akt–SREBP nexus: cell signaling meets lipid metabolism. *Trends in. Endocrinology and Metabolism* Vol.21 No.5

Langelueddecke C, Lee WK, Thévenod F. 2014. Differential transcytosis and toxicity of the hNGAL receptor ligands cadmium-metallothionein and cadmium-phytochelatin in colon-like Caco-2 cells: implications for in vivo cadmium toxicity. *Toxicol Lett.* 226(2):228-235

Larregle EV, Varas SM, Oliveros LV, Martinez LD, Anton R, Marchevskyb E, Gimenez MS. 2008. Lipid metabolism in liver of rat exposed to cadmium. *Food and Chemical Toxicology.* 46; 1786–1792

Leavens K. F., Easton R. M., Shulman G. I., Previs S. F., Birnbaum M. J. (2009) Akt2 is required for hepatic lipid accumulation in models of insulin resistance. *Cell Metab* 10, 405–418

Lee J and Pilch PF. 1994 The insulin receptor: structure, function, and signaling. *The American Physiological Society.* 0193-1849/94.

Lei LJ, Chen L, Jin TY, Nordberg M and Chang XL. 2007. Estimation of Benchmark Dose for Pancreatic Damage in Cadmium-Exposed Smelters. *Toxicological Sciences.* 97(1), 189–195.

Lei LJ, Jin TY, Zhou YF. 2007. Insulin expression in rats exposed to cadmium. *Biomed. Environ. Sci.* 20; 295-301.

Leung KM, Furness RW. 2001. Survival, growth, metallothionein and glycogen levels of *Nucella lapillus* (L.) exposed to subchronic cadmium stress: the influence of nutritional state and prey type. *Mar Environ Res.* 2001 Aug;52(2):173-94.

Li, S., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (2010). Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but no inhibition of gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 3441–3446..

Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL, Brown MS (2002) Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 277(11):9520–9528

Lim EL, Hollingsworth KG, Aribisala BS, Chen MJ, Mathers JC, Taylor R. 2011. Reversal of type 2 diabetes: Normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia*. 54; 2506–2514.

Liu J, Qu W, Kadiiska B, 2009. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238, 209–214.

Lowe-Jinde L, Niimi AJ. Short-term and long-term effects of cadmium on glycogen reserves and liver size in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* (1984) 13: 759. doi:10.1007/BF01055940

Luca D, Olefsky JM. 2008. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Letters* 582; 97–105

Ma L, Robinso LN, Towle HC. (2006). ChREBP Mlx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J. Biol. Chem.* 281 28721–28730.

Ma, L., Tsatsos, N. G. & Towle, H. C. (2005). Direct role of ChREBP · Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes. *Journal of Biological Chemistry* 280, 12019–12027.

Magaña, M. M. & Osborne, T. F. (1996). Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *Journal of Biological Chemistry* 271, 32689–32694.

Magaña, M. M., Lin, S. S., Dooley, K. A. & Osborne, T. F. (1997). Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase promoter requires two interdependent binding sites for sterol regulatory element binding proteins. *Journal of Lipid Research* 38, 1630–1638.

Maier, T., Jenni, S., and Ban, N. Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science* 311 (2006) 1258–1262.

Mainous AG, Tanner RJ, Baker R, Zayas CE, Harle CA. (2014). Prevalence of prediabetes in England from 2003 to 2011: population-based, cross-sectional study. *BMJ Open* 4: 6 e005002.

Martelli A., Rousselet E., Dycke C., Bouron A. and Moulis J.M. 2006. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* 88: 1807–1814.

Matsuda M and DeFronzo R. 1999. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance Testing. *Diabetes Care* 22:1462–1470.

Mayes PA. 1993. Intermediary metabolism of fructose. *The American Journal of Clinical Nutrition* 58, 754S–765S.

McGarry, J. D. (1992). What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science (New York, N.Y.)* 258, 766–770.

McGarry, J. D., and Brown, N. F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244 (1997) 1–14.

Meegalla R, Billheimer J, Cheng D. Concerted elevation of acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin. *Biochem Biophys Res Commun* 298: 317–323, 2002

Mendoza MC, Emrah E, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 36, No. 6

Merali Z, and Singhal RL. 1980. Diabetogenic effects of chronic oral cadmium administration to neonatal rats. *Br. J. Pharmacol.* 69; 151-157.

Merali Z, Singhal RL. Diabetogenic effects of chronic oral cadmium administration to neonatal rats. *Br.J.Pharmacol.* 1980; 69:151–157.

Misra RR, Hochadel JF, Smith GT, Cook JC, Waalkes MP, Wink DA. 1996. Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. *Chem Res Toxicol.* 9(1):326-32.

Mitro, N. et al. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445, 219–223 (2007).

Moore, D. D. (2012). A common thread connects antidiabetic effects of multiple nuclear receptors. *Cell Metabolism* 15, 615–622.

Morgan DL, Shines CJ, Jeter SP, Blazka ME, Elwell MR, Wilson RE, Ward SM, Price HC, Moskowitz PD. 1997. Comparative pulmonary absorption, distribution, and toxicity of copper gallium diselenide, copper indium diselenide, and cadmium telluride in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 147(2):399-410.

Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ, Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism clinical and experimental.* 65(2016) 1049-1061  
Mueckler, M. & Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 121–138.

Muniyappa R, Chen H, Muzumdar RH, Einstein FH, Yan X, Yue LQ, Barzilai N, Quon MJ. 2009. Comparison between surrogate indexes of insulin sensitivity/resistance and hyperinsulinemic euglycemic clamp estimates in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297; E1023–E1029.

Murugavel P, Pari L. 2007. Diallyl tetrasulfide protects cadmium-induced alterations in lipids and plasma lipoproteins in rats. *Nutrition Research* 27; 356–361

Napolitano JR, Liu MJ, Bao S, Crawford M, Nana-Sinkam P, Cormet-Boyaka E, Knoell DL. 2012. Cadmium-mediated toxicity of lung epithelia is enhanced through NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional activation of the human zinc transporter ZIP8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1;302(9):L909-918.

Ni Y, Nagashimada M, Zhan L, Nagata N, Kobori M, Sugiura M, Ogawa K, Kaneko S, Ota T. 2015. Prevention and reversal of lipotoxicity-induced hepatic insulin resistance and steatohepatitis in mice by an antioxidant carotenoid,  $\beta$ -cryptoxanthin. *Endocrinology.* 2015 Mar;156(3):987-99. doi: 10.1210/en.2014-1776.

Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 2004;113:1582–1588pmid:15173884

Nomiyama K, Nomiyama H, Nomura Y, Taguchi T, Matsui K, Yotoriyama M, Akahori F, Iwao S, Koizumi N, Masaoka T, Kitamura S, Tsuchiya K, Suzuki T, Kobayashi K. 1979. Effects of dietary cadmium on rhesus monkeys. *Environ Health Perspect.* 28:223-43.

Nordberg GF and Kjellström T. 1979. Metabolic Model for Cadmium in Man. *Environ. Health Perspect.* 28, 169–197.

Nriagu JO. 1980. in *Cadmium in the Environment, Part I: Ecological Cycling*, Ed J. O. Nriagu, John Wiley & Sons, New York, pp. 35–70.

Nriagu JO. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134 – 139

Nriagu JO. 1990. *Global Metal Pollution: Poisoning the Biosphere?* Volume 32, Issue 7

Oelkers P, Behari A, Cromley D, Billheimer J, Sturley S. Characterization of two human genes encoding acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase-related enzymes. *J Biol Chem* 273: 26765–26771, 1998

Oh SH, Lee SY, Choi CH, Lee SH, Lim SC, *Arch. Pharm. Res.* 2009, 32, 883–891.

Ohrvik H, Tydén E, Artursson P, Oskarsson A, Tallkvist J. 2013. Cadmium Transport in a Model of Neonatal Intestinal Cells Correlates to MRP1 and Not DMT1 or FPN1. *ISRN Toxicology*. 2013: 1 – 9.

Olisekodiaka MJ, Igbeneghu CA, Onuegbu AJ, Oduru R, Lawal AO. 2012. Lipid, Lipoproteins, Total Antioxidant Status and Organ Changes in Rats Administered High Doses of Cadmium Chloride. *Med Princ Pract* 21; 156e159

Olofsson SO, Stillemark-Billton P, Asp L. 2000. Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments. *Trends in Cardiovascular Medicine* 10, 338–345.

Oosterveer, M. H. & Schoonjans, K. (2014). Hepatic glucose sensing and integrative pathways in the liver. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71, 1453–1467.

Ortmeyer HK, Bodkin NL, Hansen BC. Insulin regulates liver glycogen synthase and glycogen phosphorylase activity reciprocally in rhesus monkeys. *Am J Physiol.* 1997 Jan;272(1 Pt 1):E133-8  
P. Martin, M. C. Poggi, J. C. Chambard, K. E. Boulukos, P. Pognonec, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, 350, 803–807.

Parks EJ, Krauss RM, Christiansen MP, Neese RA, Hellerstein MK (1999) Effects of a low-fat, high-carbohydrate diet on VLDL-triglyceride assembly, production, and clearance. *J Clin Invest* 104(8):1087–1096

Perrini S, Ficarella R, Picardi E, Cignarelli A, Barbaro M, Nigro P, et al. Las diferencias en la expresión génica y perfiles de liberación de citoquinas resaltar la heterogeneidad de distintos subconjuntos de células madre derivadas de tejido adiposo en el tejido adiposo subcutáneo y visceral en los seres humanos. *Más uno*. 2013; 8 (3):. E57892

Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. (2015) .The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes *Nature* 510, 84–91. doi:10.1038/nature13478

Petersen KF, Dufour S, Hariri A, Nelson-Williams C, Foo JN, Zhang X-M, Dziura J, Lifton RP, Shulman GI. 2010. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.* 362; 1082–1089.

Petersen MC, Madiraju AK, Gassaway BM, Marcel M, Nasiri AR, Butrico G, Marcucci MJ, Zhang D, Abulizi A, Xian-Man Z, Philbrick W, Hubbard SR, Jurczak MJ, Samuel VT, Rinehart J, Shulman GI. 2016. Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest.* doi:10.1172/JCI86013.

Pham TN, Segui JA, Fortin C, Campbell PGC, Denizeau F, Jumarie C (2004) Cadmium uptake in rat hepatocytes in relation to speciation and to complexation with metallothionein and albumin. *J Cell Physiol* 201:320–330

Pilfay TS, and Siddle K. 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.

Pirola, L., Johnston, A. M. and Van Obberghen, E. (2004). Modulation of insulin action. *Diabetologia* 47, 170 – 184.

Repa, J. J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.-M.A., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Mangelsdorf, D. J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ . *Genes & Development* 14, 2819–2830.

Rieck S, Kaestner KH .2010. Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy. *Trends Endocrinol Metab.* 21:151-158.

Rizza RA, Mandarino LJ, Genest J, Baker BA, Gerich JE. 1985. Production of insulin resistance by hyperinsulinemia in man. *Diabetologia.* 28; 70 –75.

Roden M, Stingl H, Chandramouli V, et al. Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes* 2000;49:701–707pmid:10905476

Rogalska J, Małgorzata M. Brzóska, Roszczenko A, Moniuszko-Jakoniuk J. 2009. Enhanced zinc consumption prevents cadmium-induced alterations in lipid metabolism in male rats. *Chemico-Biological Interactions* 177; 142–152

Rogers P, Webb G.P. 1980. Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br. J. Nutr.* 43: 83–86.  
Rome S, Meugnier E, Vidal H. 2004. The ubiquitin–proteasome pathway is a new partner for the control of insulin signaling. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7:249–254

Rustaeus, S., Lindberg, K., Stillemark, P., Claesson, C., Asp, L., Larsson, T., Borén, J. & Olofsson, S.-O. (1999). Assembly of very low density lipoprotein: a two-step process of apolipoprotein B core lipidation. *The Journal of Nutrition* 129, 463S–466S.

Sabolić I, Breljak D, Skarica M, Herak-Kramberger CM. 2010. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals.*23 (5):897-926.

Samuel V, and Shulman GI. 2012. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and missing links. *Cell.* 2012 Mar 2;148(5):852-71. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.017.

Samuel, V. T., Petersen, K. F. & Shulman, G. I. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375, 2267–2277.

Sanders F,W,B, and Griffin J,L. (2016). De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol. Rev.* (2016), 91, pp. 452–468. 452.

Sarafidis PA, Lasaridis AN, Nilsson PM, Pikilidou MI, Stafilas PC, Kanaki A. 2007. Validity and reproducibility of HOMA-IR, 1/HOMA-IR, QUICKI and McAuley's indices in patients with hypertension and type II diabetes. *J. Hum. Hypert.* 21; 702–716.

Sarmiento-Ortega VE, Brambila E, Flores-Hernández JA, Aguilar-Alonso P, Moroni D, Díaz A, Treviño M. 2016. Changes on hepatic lipidome and HDL-lipoproteins phenotype of Wistar rats exposed chronically to cadmium. *Toxicology Letters.* 259:S162-S163

Satarug S, Baker JR, Reilly PE, Moore MR, Williams DJ. 2002. Cadmium levels in the lung, liver, kidney cortex, and urine samples from Australians without occupational exposure to metals. *Arch Environ Health*.57 (1):69-77.

Schwartz GG, Yasova DI, Ivanova A. 2003. Urinary cadmium, impaired fasting glucose, and diabetes in the NHANES III. *Diabetes care*. 26; 468–470.

Schwarz J-M, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K (2003) Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr* 77(1):43–50

Sears B and Perry M. The role of fatty acids in insulin resistance. *Lipids in Health and Disease*201514:121

Seino S, Bell GI. 1989. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159; 312–316.

Seino, S., Seino, M., Nishi, S. and Bell, G. I. (1989). Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 114 – 118.

Selvaraj Rajakumar and Nachiappan V. (2016). Lipid droplet alleviates cadmium induced cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology Research* 04 October 2016. DOI: 10.1039/C6TX00187D

Semple, R. K., Sleight, A., Murgatroyd, P. R., Adams, C. A., Bluck, L., Jackson, S., Vottero, A., Kanabar, D., Charlton-Menys, V., Durrington, P., Soos, M. A., Carpenter, T. A., Lomas, D. J., Cochran, E. K., Gorden, P., O'Rahilly, S. & Savage, D. B. (2009). Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis. *The Journal of Clinical Investigation* 119, 315–322.

Sesti, G., Federici, M., Hribal, M. L., Lauro, D., Sbraccia, P. and Lauro, R. (2001). Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J.* 15, 2099 – 2111.

Shah PV, Vella A, Basu A, et al. Effects of free fatty acids and glycerol on splanchnic glucose metabolism and insulin extraction in nondiabetic humans. *Diabetes* 2002;51:301–310

Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J. 2008. Insulin Resistance and Hyperinsulinemia, Is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care*. 31; S262–S268.

Shi Y, Cheng D. 2008. Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 297, E10–E18.

Shimada H, Funakoshi T and Waalkes MP. 2000. Acute, Nontoxic Cadmium Exposure Inhibits Pancreatic Protease Activities in the Mouse. *Toxicological Sciences*. 53: 474–480

Shin D-H, Paulauskis JD, Moustaid N, Sul HS. Transcriptional regulation of p90 with sequence homology to *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate acyltransferase. *J Biol Chem* 1991;266:23834–9.

ShumKerstin M, Philippe B, St-Pierre, Murette A. 2016. Pharmacological inhibition of S6K1 increases glucose metabolism and Akt signalling in vitro and in diet-induced obese mice. *Diabetologia*. Volume 59, Issue 3, pp 592–603

Sidossis L. S., Mittendorfer B., Walser E., Chinkes D., Wolfe R. R. (1998) Hyperglycemia-induced inhibition of splanchnic fatty acid oxidation increases hepatic triacylglycerol secretion. *Am. J. Physiol.* 275, E798–E805

Smith S, Tsai SC. 2007. The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Natural Product Reports* 24, 1041–1072.

Smith S. 1994. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *The FASEB Journal* 8, 1248–1259.

Sparks JD, Sparks CE, Adeli K. 2012. Selective hepatic insulin resistance, VLDL overproduction, and hypertriglyceridemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32, 2104–2112.

Staehr P, Hother-Nielsen O, Landau BR, Chandramouli V, Holst JJ, Beck-Nielsen H. Effects of free fatty acids per se on glucose production, gluconeogenesis, and glycogenolysis. *Diabetes* 2003;52:260–267pmid:12540595

Stammburger I, Bube A, Durchfeld-Meyer B, Donaubaue H, and Troschau G. 2002. Evaluation of the Carcinogenic Potential of Insulin Glargine (LANTUS) in Rats and Mice. *International Journal of Toxicology*, 21:171–179.

Stephen L. Aronoff, MD, FACP, FACE, Kathy Berkowitz, APRN, BC, FNP, CDE, Barb Shreiner, RN, MN, CDE, BC-ADM and Laura Want, RN, MS, CDE, CCRC, BC-ADM. *Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon Diabetes Spectrum* 2004 Jul; 17(3): 183-190.

Stone SJ, Myers HM, Watkins SM, Brown BE, Feingold KR, Elias PM, Farese RV Jr. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem* 279: 11767–11776, 2003

Stone SS, Levin MC, Zhou P, Han J, Walther TC, Farese RV Jr. The endoplasmic reticulum enzyme, DGAT2, is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria. *J Biol Chem*. 2009

Stowe HD, Wilson M, Goyer RA. Clinical and morphologic effects of oral cadmium toxicity in rabbits. *Arch Pathol*. 1972 Nov; 94(5):389–405

Summers S, Garza L, Zhou H, Birnbaum M. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 18: 5457–5464, 1998

Sun X, Haas ME, Miao J, Mehta A, Graham MJ, Crooke RM, Jean-Paul P, Jian-Guo W, Aikawa M, Masson D, Biddinger S. (2015). Insulin Dissociates the Effects of Liver X Receptor on Lipogenesis, Endoplasmic Reticulum Stress, and Inflammation. *JBC Papers in Press*, DOI 10.1074/jbc.M115.668269

Sundaram M, Yao Z. 2010. Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion. *Nutrition & Metabolism* 7, 1 17.

Swaddiwudhipong W, Mahasakpan P, Funkhiew T, Limpatanachote P. 2010a. Changes in cadmium exposure among persons living in cadmium-contaminated areas in northwestern Thailand: a five-year follow-up. *J Med Assoc Thai* 93:1217–1222.

Swaddiwudhipong W, Mahasakpan P, Limpatanachote P, Krintratun S. 2010b. Correlations of urinary cadmium with hypertension and diabetes in persons living in cadmium-contaminated villages in northwestern Thailand: a population study. *Environ Res* 110:612–616

Tavaretj JM, Zhangll B, Ellis L, Rothll RA. 1991. Insulin-stimulated Serine and Threonine Phosphorylation of the Human Insulin Receptor. *The journal of biological chemistry*. Vol. 266, No. 32, pp. 21804-21809

Thévenod F. 2019. Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be? *Toxicology and Applied Pharmacology* 238. 221–239

Tilg H, Moschen AR, Roden M. 2016 NAFLD and diabetes mellitus. *Nature reviews| gastroenterology & hepatology*. doi:10.1038/nrgastro.2016.147

Tong, L., and Harwood, H. J., Jr. Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery. *J Cell Biochem* 99 (2006) 1476–1488.

Treviño S, Waalkes MP, Flores Hernández JA, León-Chavez BA, Aguilar-Alonso P, Brambila E. 2015. Chronic cadmium exposure in rats produces pancreatic impairment and insulin resistance in multiple peripheral tissues. *Arch Biochem Biophys*. 583:27-35.

Treviño S. 2015. Efecto de la Administración Crónica de Cadmio en Tejido Pancreático de Ratas Wistar Como Factor de Alteración en el Metabolismo de los Carbohidratos. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Cs químicas, Puebla, México

Trisak ST, Doumgdee P, Rode BM. 1990. Binding of zinc and cadmium to human serum albumin. *Int J Biochem*. 22(9):977-981.

Tsuchiya K. 1976. Epidemiological studies on cadmium in the environment in Japan: Etiology of itai-itai disease. *Fed Proc*. 35:2412–2418.

Uyeda, K. & Repa, J. J. (2006). Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metabolism* 4, 107–110.

V. Souza, C. Escobar Mdel, L. Bucio, E. Hernandez, L. E. Gomez–Quiroz, M. C. Gutierrez Ruiz, *Toxicol. Lett*. 2009, 187, 180–186.

Vangipurapu J, Stancáková A, Kuulasmaa T, Paananen J, Kuusisto J, the EGIR-RISC Study Group, Ferrannini E and Laakso M. 2011. A novel surrogate index for hepatic insulin resistance. *Diabetologia*. 54:540–543.

Vangipurapu J, Stancáková A, Kuulasmaa T, Paananen J, Kuusisto J, the EGIR-RISC Study Group, Ferrannini E and Laakso M. 2011. A novel surrogate index for hepatic insulin resistance. *Diabetologia*. 54:540–543.

Vatner, D. F. et al. Insulin-independent regulation of hepatic triglyceride synthesis by fatty acids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* doi:10.1073/pnas.1423952112

Vuori E, Huunan-Seppälä A, Kilpiö JO, Salmela SS. 1979. Biologically active metals in human tissues. II. The effect of age on the concentration of cadmium in aorta, heart, kidney, liver, lung, pancreas and skeletal muscle. *Scand J Work Environ Health*. 5(1):16-22

Waalkes MP and Rehm S. 1992. Carcinogenicity of oral cadmium in the male Wistar (WF/NCr) rat: Effect of chronic dietary zinc deficiency. *Fundam. Appl. Toxicol*. 19: 512–520.

Waalkes MP, Cherian MG, Ward JM, Goyer RA. 1992. Immunohistochemical Evidence of High Concentrations of Metallothionein in Pancreatic Hepatocytes Induced by Cadmium in Rats. *Toxicology Pathology*. 20; 323 – 326.

Wallace TM, Levy JC and Matthews DR. 2004. Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care*. 27:1487–1495.

Wang Y, Viscarra J, Sun-Joong K, Sul HS. 2015. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature reviews- molecular cell biology*. Volume 16. 679

Wang, H., Gilham, D. & Lehner, R. (2007). Proteomic and lipid characterization of apolipoprotein B-free luminal lipid droplets from mouse liver microsomes implications for very low density lipoprotein assembly. *Journal of Biological Chemistry* 282, 33218–33226.

Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L. 1990. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald Equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin. Chem.* 36: 15-19.

Wendel A, Lewin TM, Coleman RA. 2009. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: Rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun; 1791(6): 501–506.

Wester RC, Howard I. Maibach, Sedik L, Melendres J, DiZio S, Wade M, Chizhikov DM. 1992. In vitro percutaneous absorption of cadmium from water and soil into human skin. *Fundamental and Applied Toxicology.* 19 (1); 1-5.

White, M. F. (2003). Insulin signaling in health and disease. *Science* 302, 1710 – 1711.

Wiegman, C. H., Bandsma, R. H. J., Ouwens, M., van der Sluijs, F. H., Havinga, R., Boer, T., Reijngoud, D.-J., Romijn, J. A. & Kuipers, F. (2003). Hepatic VLDL production in ob/ob mice is not stimulated by massive de novo lipogenesis but is less sensitive to the suppressive effects of insulin. *Diabetes* 52, 1081–1089.

Wilamowitz-Moellendorff AV, Hunter RW, García-Rocha M, Kang L, López-Soldado I, Lantier L, Patel K, Peggie MW, Martínez-Pons C, Voss M, Calbó J, Cohen PTW, Wasserman DH, Guinovart JJ, Sakamoto K. Glucose-6-Phosphate-Mediated Activation of Liver Glycogen Synthase Plays a Key Role in Hepatic Glycogen Synthesis. *DIABETES*, VOL. 62, december 2013

Wilcox G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev.* 2005 May; 26(2): 19–39.

Williams RJ, 2002. The fundamental nature of life as a chemical system: the part played by inorganic elements *Original J. Inorg. Biochem*, 88; 241–250.

Williams, K. H., Shackel, N. A., Gorrell, M. D., McLennan, S. V. & Twigg, S.M. (2013). Diabetes and nonalcoholic fatty liver disease: a pathogenic duo. *Endocrine Reviews* 34, 84–129.

Wu K., Cappel D., Martinez M., Stafford J. M. (2010) Impaired-inactivation of FoxO1 contributes to glucose-mediated increases in serum very low-density lipoprotein. *Endocrinology* 151, 3566–3576

Xu C, Wang X, Zhu Y, Dong X, Liu C, Zhang H, Liu L, Huang S, Chen L. (2016). *Neuropharmacology*;105:270-84. Rapamycin ameliorates cadmium-induced activation of MAPK pathway and neuronal apoptosis by preventing mitochondrial ROS inactivation of PP2A.

Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K (2001) A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16):9116–9121

Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda Yang J, Liu D, Jing W, Dahms HU, Wang L. (2013). Effects of cadmium on lipid storage and metabolism in the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *PLoS One.* 2013 Oct 10;8(10):e77569. doi: 10.1371/journal.pone.0077569.

Yecies JL, Zhang HH, Menon S, Liu S, Yecies D, Lipovsky AI, Gorgun C, Kwiatkowski DJ, Hotamisligil GS, Chih-Hao Lee, Manning BD. 2011. Akt Stimulates Hepatic SREBP1c and Lipogenesis through Parallel mTORC1-Dependent and Independent Pathways. *Metab Cell.* 14, 21-32.

Youngren JF, 2007. Regulation of insulin receptor function. *Cell. Mol. Life Sci.* 64:873 – 891

Zahir A. Shaikh 3, Thanhtam T. Vu, Khaleqz Zaman. Oxidative. 199. Stress as a Mechanism of Chronic Cadmium-Induced Hepatotoxicity and Renal Toxicity and Protection by Antioxidants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154, 256–263.

Zoller H, Koch RO, Theurl I, Obrist P, Pietrangelo A, Montosi G, Haile DJ, Vogel W, Weiss G. 2001. Expression of the duodenal iron transporters divalent-metal transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload. *Gastroenterology.* 120(6):1412-1419.

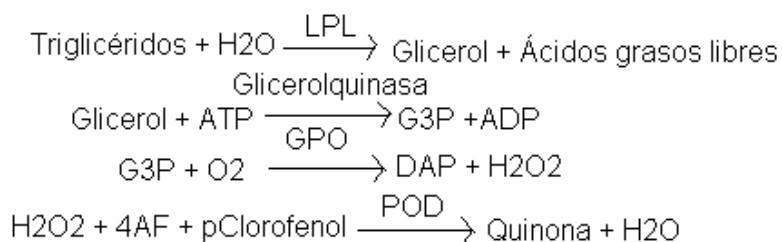
# 13.- Anexos

## ANEXO #1

### Determinación de la concentración de triglicéridos.

#### FUNDAMENTO

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



#### MÉTODO (Glicerolfosfato deshidrogenasa- Peroxidasa)

Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Patrón (S)		10 µL	
Muestra			10 µL
Reactivo (A)	1.0 mL	1.0 mL	10 µL

Agitar bien e incubar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. a 37°C.

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

#### CALCULOS

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

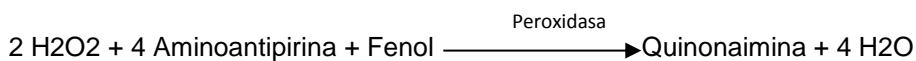
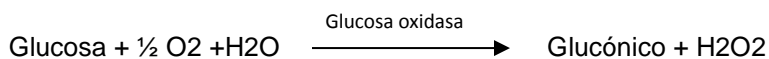
$$\frac{A \text{ muestra} \times C \text{ patrón}}{A \text{ patrón}} = C \text{ muestra}$$

## ANEXO #2

### Determinación de la concentración de glucosa sérica

#### Fundamento

La glucosa presente en la muestra origina un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.



#### Método (Glucosa Oxidasa/Peroxidasa)

Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Patrón (S)		10 µL	
Muestra			10 µL
Reactivo (A)	1.0 mL	1.0 mL	10 µL

Agitar bien e incubar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. a 37°C.

Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 500 nm frente al blanco. El color es estable durante al menos 2 hrs.

#### Cálculos

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

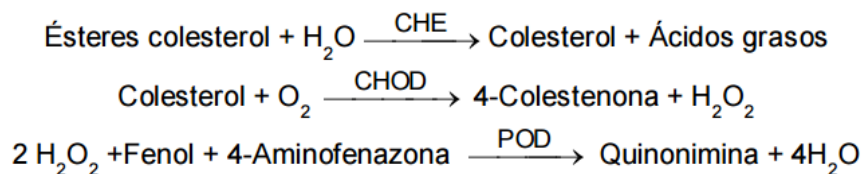
$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} = C \text{ muestra}$$

### ANEXO #3

#### Determinación de Colesterol total

##### Fundamento

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



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

##### Reactivos.

<b>R</b>	PIPES pH 6.9	90 mmol/L
	Fenol	26 mmol/L
	Colesterol esterasa (CHE)	1000 U/L
	Colesterol oxidasa (CHOD)	300 U/L
	Peroxidasa (POD)	650 U/L
	4 - Aminofenazona (4-AF)	0,4 mmol/L
<b>CHOLESTEROL CAL</b>	Patrón primario acuoso de Colesterol	

##### PROCEDIMIENTO

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: ..... 505 nm (500-550).

Cubeta: ..... 1 cm paso de luz

Temperatura ..... 37°C /15-25°C

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada
3. Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
<b>R (mL)</b>	1,0	1,0	1,0
<b>Patrón<sup>(Nota1-2)</sup> (µL)</b>	--	10	--
<b>Muestra (µL)</b>	--	--	10

4. Mezclar e incubar 5 min a 37°C ó 10 min a 15-25°C.
5. Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 60 minutos.

##### CÁLCULOS

(A)Patrón x Conc. Patrón = mg/dL de colesterol en la muestra

(A)Muestra

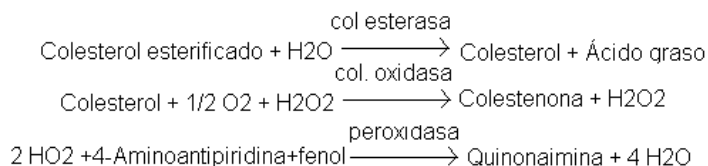
Factor de conversión: mg/dL x 0,0258= mmol/L.

#### ANEXO #4

### Determinación de Colesterol LDL reactivo precipitante

#### Fundamento

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



#### 1.- Pipetear en un tubo

Muestra 0.4ml

Reactivo 0.2 ml

2.- Agitar bien y dejar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3.- Centrifugar durante 15 min. a 4,000 r.p.m.

4.- Recoger con cuidado el sobrenadante

Colorimetría

5.- Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

6.- Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Agua destilada	20 µL		
Patrón Colesterol (S)		20 µL	
Sobrenadante Muestra			20 µL
Reactivo de colesterol(A)	1.0 mL	1.0 mL	10 µL

7.- Agitar bien e incubar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. a 37°C.

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

#### Cálculos

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

$$\frac{A \text{ muestra} \times C \text{ patrón} \times \text{Factor de dilución de muestra}}{A \text{ patrón}} = C \text{ Sobrenadante}$$

La concentración de colesterol LDL en la muestra se calcula

Colesterol LDL = colesterol total – colesterol en sobrenadante

## ANEXO #5

### Determinación del Colesterol HDL reactivo precipitante

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

#### Método

1.- Pipetear en un tubo

Muestra	0.2 ml
Reactivo (Col HDL)	ml

2.- Agitar bien y dejar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3.- Centrifugar durante 15 min. a 4,000 r.p.m.

4.- Recoger con cuidado el sobrenadante

5.- Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

6.- Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
7.- Agua destilada	100 µL		
Patrón Colesterol HDL (S)		100 µL	
Sobrenadante Muestra			100 µL
Reactivo de colesterol(A)	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

Agitar bien e incubar los tubos durante 30 min. a temperatura ambiente o durante 10 min. a 37°C.

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

#### Cálculos

La concentración de colesterol HDL en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula.

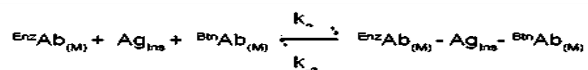
$$A_{\text{muestra}} \times \frac{C_{\text{patrón}} \times \text{Factor de dilución de muestra}}{A_{\text{patrón}}} = C_{\text{Muestra}}$$

## ANEXO #6

### Determinación de insulina

Fundamento: Los reactivos esenciales requeridos para un ensayo inmunoenzimático incluye anticuerpos de una alta afinidad y especificidad (Ab), (enzima conjugada e inmovilizada), con epítopes de reconocimiento diferentes, en exceso, y antígeno nativo (Ag). En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el ensayo en la superficie del pozo en la microplaca durante la interacción de estreptavidina cubierta sobre el pozo y agregado exógenamente un anticuerpo de insulina monoclonal biotinilado.

Una vez mezclado el anticuerpo monoclonal biotinilado, el anticuerpo de enzima etiquetada y un suero que contiene el antígeno nativo, resulta una reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia o impedimento estérico, para formar un complejo de sándwich soluble. La interacción esta ilustrada por la siguiente ecuación:



$\text{BiotAb}_{(M)}$  = Anticuerpo Monoclonal Biotinilado (cantidad en exceso)

$\text{Ag}_{\text{Ins}}$  = Antígeno Nativo (cantidad variable)

$\text{EnzAb}_{(M)}$  = Anticuerpo monoclonal etiquetado (cantidad en exceso)

$\text{EnzAb}_{(M)} - \text{Ag}_{\text{Ins}} - \text{BiotAb}_{(M)}$  = Complejo Antígeno-Anticuerpo

$k_a$  = Valor Constante de Asociación

$k_d$  = Valor Constante de Disociación

Simultáneamente, el complejo es depositado en el pozo a través de la reacción de alta afinidad de streptavidin y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción esta ilustrada abajo:



Estreptavidina = Estreptavidina inmovilizada en el pocillo.

Complejo Inmovilizado = Complejo de Sándwich unido a la superficie de la fase sólida.

Después de que se obtiene el equilibrio, la fracción del anticuerpo-atado es separado del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática en la fracción del anticuerpo-limite es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno. Utilizando diversas referencias del suero de los valores sabidos del antígeno, una curva de la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

### Reactivos:

- Calibradores Insulina – liofilizados- Iconos A-F

Seis (6) frascos de referencia del suero para el antígeno de Insulina en los niveles de 0(A), 5(B), 25(C), 50(D), 100(E) y 300(F)  $\mu\text{IU/ml}$ . Reconstituya cada frasco con 2mL de agua destilada o desionizada. Los calibradores reconstituidos son estables por sesenta (60) días entre 2-8°C. Se ha agregado un preservativo.

\*Nota: los calibradores, basados en suero humano, se calibraron usando una preparación de referencia, el cual fue ensayado contra WHO 1st IRP 66/304.

- Reactivo de Enzima de Insulina

Un frasco que contiene la enzima etiquetada con afinidad purificada monoclonal de ratón x-insulina IgG, monoclonal biotinilado de ratón x-insulina IgG en solución, tinte y preservativo. Almacene a 2-8°C.

- Microplaca Revestida con Estreptavidina - 96 pozos

Una (1) microplaca con 96 pozos cubiertos con estreptavidina y empaquetado en una bolsa de aluminio con un agente desecante. Almacénese a 2-8°C.

- Solución Concentrada de Lavado

Un (1) frasco que contiene un surfactante en solución salina. Un preservativo ha sido agregado. Almacénese a 2-30°C.

- Substrato A

Un (1) frasco que contiene tetrametilbencidina (TMB) en solución. Almacén en 2-8°C.

- Substrato B

Un (1) frasco que contiene peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en solución. Almacénese en 2-8°C.

- Solución de Paro

Un (1) frasco que contiene un ácido fuerte (1NHCl). Almacénese en 2-8°C.

Preparación de los reactivos

- **SOLUCION DE LAVADO.** Diluir el contenido del concentrado de lavado con 1000 mL de agua destilada o desionizada en un contenedor adecuado. Almacénese a temperatura ambiente entre los 20-27°C por no más de 60 días.

- **SOLUCIÓN DE TRABAJO SUSTRATO.** Vierta el contenido del frasco etiquetado con Solución "A" en el frasco etiquetado con Solución "B". Mezcle y guarde a 2-8°C. Coloque la tapa amarilla sobre el frasco transparente para una fácil identificación. Mezcle y etiquete acordemente. Almacénese a 2-8°C.

**Nota: No se use el sustrato de trabajo si este se ve azul.**

### Procedimiento del ensayo

Antes de proceder con el análisis, traiga todos los reactivos, referencias del suero y controles a temperatura ambiente (20-27°C).

Saque los micropozos necesarios para cada suero de referencia, controles y muestras. Guarde los micropozos nuevamente dentro de la bolsa de aluminio, séllela y almacénela en 2-8°C.

Pipetee 0.050 mL (50 µL) de los sueros de referencia, controles y muestras en los pozos correspondientes.

Agregue 0.100 mL (100µL) de la solución del Reactivo de la Enzima de Insulina a todos los pozos. Es muy importante dispensar todos Los reactivos cerca del fondo de los micropozos.

Golpear suavemente uno de los extremos de la microplaca por 20- 30 segundos para mezclar. Selle la microplaca con una cubierta de plástico.

Incube por 120 minutos a temperatura ambiente (20-27°C)

Deseche el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si decanta, después golpee ligeramente la placa seca con el papel absorbente.

Agregue 300 $\mu$ L de la solución de lavado (véase la sección de la preparación del reactivo), decántelo o aspírelo. Repita dos (2) veces adicionales para un total de tres (3) lavados. Un lavador automático o manual de placas puede ser utilizado. Siga las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si se emplea una botella de apretón, llene cada micropozo bien, presionando el envase (evite burbujas de aire) para dispensar la solución de lavado. Decante y repita dos (2) veces adicionales.

Agregue 0.100 mL (100 $\mu$ L) de la solución de Substrato a todos los pozos (véase la sección de la preparación el reactivo). Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias de tiempo de reacción entre los pozos. **NO AGITE DESPUES DE ADICIONAR EL SUSTRATO**

Incube en la temperatura ambiente por quince (15) minutos.

Agregue 0.050 mL (50 $\mu$ L) de la solución de paro a cada pozo y mezcle suavemente por 15-20 segundos. Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.

11. Lea la absorbancia en cada pozo a 450nm (con una longitud de onda de referencia de 620-630nm para reducir al mínimo imperfecciones del pozo) en un lector del microplacas. Los resultados se deben leer en el plazo de treinta (30) minutos de haber agregado la solución de paro.

#### Cálculo de resultados

Una curva en la reacción se usa para comprobar la concentración de

Insulina en especímenes desconocidos.

1. Registre la absorbancia obtenida del listado del lector del micro placas
2. Trace la absorbancia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de Insulina en  $\mu$ IU/mL
3. Calcule la ecuación de la línea recta para la curva de calibración.
4. Para determinar la concentración de Insulina para un desconocido, despeje x de la ecuación de la línea recta.

## ANEXO #7

### Determinación de Apolipoproteína B

#### Fundamentos

La apolipoproteína B presente en la muestra precipita en presencia de anticuerpos antiapolipoproteína B humana. La dispersión de luz generada por los complejos antígenoanticuerpo es proporcional a la concentración de apolipoproteína B y puede ser cuantificada por turbidimetría.

#### Reactivos

A. Reactivo: 1 x 40 mL. Tampón glicina 100 mmol/L, sodio azida 0,95 g/L, pH 8,5.

B. Reactivo: 1 x 10 mL. Anticuerpos de cabra anti apo B humana, sodio azida 0,95 g/L.

S. Patrón de Apo B (BioSystems Cod. 31200). La concentración viene indicada en la etiqueta del vial.

#### Curva de calibración

Curva de Calibración: Preparar diluciones del patrón de apo B empleando solución salina 9 g/L como diluyente. Multiplicar la concentración del patrón de apo B por el factor correspondiente indicado en la tabla, para obtener la concentración de apolipoproteína B de las diluciones.

DILUCIÓN	1	2	3	4	5
Patrón de apo B ( $\mu$ L)	10	20	40	60	80
Sol. salina ( $\mu$ L)	70	60	40	20	—
Factor	0,125	0,25	0,5	0,75	1,0

#### Procedimiento

1. Precalear los Reactivos y el instrumento a 37°C.

2. Pipetear en una cubeta (Nota 1):

Reactivo (A) 0,8 mL

Agua destilada (Blanco), Patrón (S) o Muestra 10  $\mu$ L

3. Mezclar e insertar la cubeta en el instrumento.

4. Leer la absorbancia (A1) a 340 nm.

5. Pipetear:

Reactivo (B) 0,2 mL

6. Mezclar e insertar la cubeta en el instrumento. Poner en marcha el cronómetro.

7. Leer la absorbancia (A2) a 340 nm exactamente a los 5 minutos de la adición del Reactivo B.

## ANEXO #8

### Determinación de Ácidos grasos libres

#### Reactivos

Cloroformo

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

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

Reactivo amoníaco. 100 ml de una solución al 58% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (concentrado) se diluye hasta 1 litro con agua destilada agua.

#### Procedimiento

1. Añadir 50  $\mu\text{L}$  de suero en un tubo de ensayo
2. A un tubo semejante, se añaden 50  $\mu\text{l}$  de estándar de ácido oleico.
3. Para otro tubo de ensayo añadir 100  $\mu\text{l}$  de agua, este será el blanco de reactivo.
4. Para todos los tubos de añadir 150  $\mu\text{l}$  de reactivo de cobre y 1 ml de cloroformo.
5. Coloque los tubos verticalmente en un vortex y agite por 10 min.
6. Centrifugar los tubos 10 minutos a 1500 rpm.
7. Extraer las fases de cloroformo en otros tubos de ensaye cuidando el no extraer la fase acuosa de color azul.
8. De cada tubo, pipetear 500  $\mu\text{l}$  de extracto de cloroformo y colocar en un nuevo tubo, la evaporación debe mantenerse a un mínimo.
9. A cada tubo, añadir 450  $\mu\text{l}$  de reactivo cuprizona, tapar y agitar suavemente.
10. A cada tubo, añadir 50  $\mu\text{l}$  de solución de amoníaco, tapar y agite suavemente.
11. Lea la absorbancia a 620 nm (frente a un blanco a cero de absorbancia) 10 mm después de agitar con la solución de amoníaco.

Si aparece un precipitado azul, agitar la cubeta enérgicamente para redispersarlo y leer la absorbancia.

#### Cálculo

El ácido graso libre (FFA) contenido se calcula:

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

## **ANEXO #9**

### **Cuantificación de Triglicéridos en tejido**

#### **Procedimiento:**

1. Pesar 100 mg del tejido a analizar y colocarlos en un criotubo
2. Adicionar 800  $\mu$ L de SSI
3. Homogeneizar durante 1 minuto
4. Tomar 10  $\mu$ L del sobrenadante y colocarlos en un tubo.
5. Adicionar 1 mL del reactivo de triglicéridos
6. Esperar 15 minutos a temperatura ambiente
7. Leer a 505 nm.

**Notas: La técnica seguida corresponde al anexo #1.**

## **ANEXO #10**

### **Cuantificación de Ácidos grasos en tejido**

#### **Reactivos**

Cloroformo

Metanol; grado reactivo.

Mezcla cloroformo metanol 2:1 volumen

#### **Procedimiento**

Para la extracción de lípidos de tejido se utilizó el procedimiento reportado por Folch en 1956 el cual consiste en:

- 1.- Pesar 50 mg de tejido
- 2.- Homogénar el tejido con 1 ml de la mezcla clorormo-metanol (2:1)
- 3.- Centrifugar el tubo a 2000rpm durante 10 min
- 4.- Separar el sobrenadante a otro tubo y agregar 200ul de SSI.
- 5., Homogénar suavemente la mezcla y centrifugar nuevamente a 2000rpm durante 10 min.
- 6.- Obtener la fase del cloroformo que se encuentra en la parte inferior del tubo separado por la SSI en una relación 40% y 60%.

**Una vez extraídos los lípidos se sigue el mismo procedimiento que para el anexo #8**

## ANEXO #11

### Determinación de Glucógeno en tejidos

#### Reactivos

Acido perclórico al 10 %

Etanol concentrado

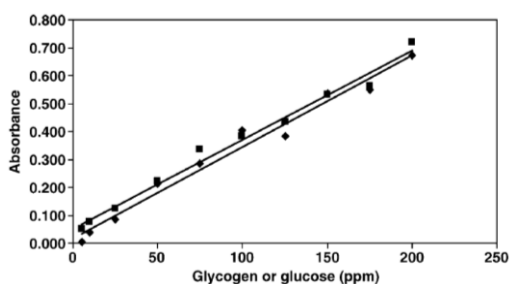
Agua destilada

Fenol al 5 %

Ácido sulfúrico concentrado

#### Procedimiento

- 1.- Homogenizar 125 mg de tejido con 1 ml de HClO<sub>4</sub>.
- 2.- Centrifugar a 1450 rpm durante 15 minutos.
- 3.- Extraer el sobrenadante y guardar. (Sobrenadante 1)
- 4.- Re suspender el pellet de tejido con 1 ml de HClO<sub>4</sub>.
- 5.- Centrifugar a 1450 rpm durante 15 minutos.
- 6.- Extraer el sobrenadante y guardar. (Sobrenadante 2)
- 7.- Combinar el sobrenadante 1 y 2. (Sobrenadante 3)
- 8.- Agregar 2.5 ml de etanol al sobrenadante 3, agitar fuertemente.
- 9.- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- 10.- Extraer el sobrenadante (Sobrenadante 4) \* y guardar, en el fondo del tubo se observará un precipitado blanco.
- 11.- Re suspender el precipitado blanco con 1 ml de agua destilada.
- 12.- Tomar una alícuota de la disolución de glucógeno (no. 11) de 100 µL
- 13.- Añadir 200 µL de fenol y agitar.
- 14.- Agregar 1 ml de ácido sulfúrico y agitar.
- 15.- Leer la absorbancia a 490 nm (frente a un blanco a cero de absorbancia) 30 min después de agitar con el ácido sulfúrico.



R<sup>2</sup>=0.9874)

**\*En caso de Hígado se puede realizar determinación la concentración de glucosa en el sobrenadante 4 y sumarse a la concentración total de glucógeno.**

#### Cálculos

Regresión lineal de absorbancia contra glucógeno y estándar concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100, 125, and 150 ppm de conejo ( $y = 0.0074x + 0.0347$ ;

Se ocupó la ecuación de la recta para calcular la concentración de glucógeno elaborada por L. W. Bennett en 2007.

## **ANEXO #12**

### **Técnica para deshidratación, embebido y corte de tejidos en parafina**

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

*Colocar los tejidos en casetes para inclusión.*

#### **Seguir el proceso:**

1. PBS 1X, durante 45 minutos, para limpiar la formalina.
2. Alcohol 70%, 1 hora
3. Alcohol 80%, 1 hora
4. Alcohol 96% 1, 1 hora
5. Alcohol 96% 2, 1 hora
6. Alcohol 100% 1, 1 hora
7. Alcohol 100% 2, 1 hora
8. Alcohol-Xilol (1:1), 1 hora
9. Xilol 1, 1 hora
10. Xilol 2, 1 hora
11. Xilol-Parafina (1:1), 1:30 horas
12. Parafina 1, 1 hora
13. Parafina 2, 1 hora
14. Parafina 3 (Inclusión)

Corte de tejidos

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

## **ANEXO #13**

### **Técnica de Inmunohistoquímica**

#### **Reactivos:**

Tren de deshidratación (Ver anexo #22)

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

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3%

Albúmina libre de IgG al 2% en SSI

Anticuerpos primario y secundario

Diaminobenzidina (DAB)

Hematoxilina de Harris

Carbonato de Litio 1%

Resina

Cloro

#### **Procedimiento:**

1. Colocar las laminillas por 40 minutos en la estufa a 40°C
2. Desparafinar y deshidratar los tejidos (Ver anexo #)
3. Poner las laminillas en la solución de recuperación de antígenos durante 40 min a 60°C
4. Dejar enfriar 20 minutos
5. Lavar tres veces con PBS 1X
6. Ubicar las laminillas en la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3% durante 10 minutos para inactivar la peroxidasa endógena.
7. Lavar dos veces con PBS 1X
8. Hacer zonas hidrófobas alrededor de cada tejido en la laminilla con lápiz de parafina (no dejar que los tejidos se sequen)
9. Bloquear con albúmina 2% durante 2 horas (100  $\mu$ L por laminilla)
10. Lavar 3 veces con PBS 1X

11. Colocar el anticuerpo primario en la dilución establecida por la casa comercial, o por prueba y error y dejar toda la noche. (100  $\mu$ L por laminilla)
12. Lavar 3 veces con PBS el anticuerpo
13. Colocar el anticuerpo secundario en la dilución establecida durante 2 horas (100  $\mu$ L por laminilla).
14. Lavar con PBS 1X, 3 veces
15. Revelar con DAB (15-30 segundos)
16. Inactivar la DAB en solución acuosa de cloro
17. Colocar las laminillas en Hematoxilina de Harris 3 minutos
18. Lavar con agua destilada
19. Virar con carbonato de Litio 1%
20. Lavar con agua destilada
21. Regresar las laminillas por el tren de deshidratación en el orden inverso con los mismos tiempos.
22. Montar las laminillas en resina (no dejar que el xilol se seque para facilitar que la resina se distribuya por capilaridad y evitar la formación de burbujas).

## **ANEXO #14**

### **Técnica de Inmunofluorescencia**

#### **Reactivos:**

Tren de deshidratación (Ver anexo #22)

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

Albúmina libre de IgG al 2% en SSI

Anticuerpos primario y secundario

Vectashield con DAPI

Esmalte de uñas transparente

#### **Procedimiento:**

1. Colocar las laminillas por 40 minutos en la estufa a 40°C
2. Desparafinar y deshidratar los tejidos (Ver anexo #22)
3. Poner las laminillas en la solución de recuperación de antígenos durante 40 min a 60°C
4. Dejar enfriar 20 minutos, Lavar tres veces con PBS 1X
5. Hacer zonas hidrófobas alrededor de cada tejido en la laminilla.
6. Bloquear con albúmina 2% durante 2 horas (100  $\mu$ L por laminilla), Lavar 3 veces con PBS 1X
7. Colocar el anticuerpo primario en la dilución establecida por la casa comercial, o por prueba y error y dejar toda la noche. (100  $\mu$ L por laminilla), Lavar 3 veces con PBS el anticuerpo
8. Colocar el anticuerpo secundario en la dilución establecida durante 2 horas (100  $\mu$ L por laminilla), desde este paso todo el procedimiento se realiza en oscuridad. Lavar con PBS 1X, 3 veces
9. Dejar que las laminillas se sequen por completo
10. Colocar 5  $\mu$ L por tejido de Vecta shield con DAPI
11. Poner un cubreobjetos y sellar con esmalte.
12. Dejar que las laminillas se sequen y guardarlas en refrigeración.