UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Facultad de Medicina Mexicali

“Modulación de la vía UPR mediada por condiciones de lipotoxicidad en células beta pancreáticas”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MEASTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA

BLANCA PALOMA ACOSTA MONTAÑO

DIRECTOR DE TESIS

DR. VÍCTOR GUADALUPE GARCÍA GONZÁLEZ

Mexicali, Baja California, septiembre de 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Facultad de Medicina Mexicali

“Modulación de la vía UPR mediada por condiciones de lipotoxicidad en células beta pancreáticas”

Autor de la tesis

Licenciada en Nutrición Blanca Paloma Acosta Montaño

Universidad del Valle de México

Mexicali, Baja California

Tutor y Director de Tesis

Dr. Víctor Guadalupe García González

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina Mexicali

Universidad Autónoma de Baja California

Mexicali, Baja California

CARTA DE DICTAMEN DE LA EVALUACIÓN ESCRITA DEL EXAMEN DE GRADO

Mexicali, B.C. a 6 de septiembre de 2018

Los abajo firmantes, miembros del Jurado Dictaminador del documento escrito denominado: "**MODULACIÓN DE LA VÍA UPR MEDIADA POR CONDICIONES DE LIPOTOXICIDAD EN CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS**" que para obtener el GRADO de MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD, presenta: **BLANCA PALOMA ACOSTA MONTAÑO**.

Realizada la evaluación resolvimos: Aprobada

DR. VÍCTOR GUADALUPE GARCÍA GONZÁLEZ
Presidente

DR. NICOLÁS ADDIEL SERAFÍN HIGUERA
Sinodal

DRA. JOSEFINA RUIZ ESPARZA CISNEROS
Sinodal

DR. OCTAVIO GALINDO HERNÁNDEZ
Sinodal

DR. JOSÉ GUSTAVO VÁSQUEZ JIMÉNEZ
Secretario

ÍNDICE

Lista de abreviaturas i

1. Marco teórico
   - 1.1 Diabetes mellitus tipo 2 1
     - 1.1.1 Receptor de insulina y su señalización 2
     - 1.1.2 Liberación de insulina en las células β 3
     - 1.1.3 Mecanismos asociados a la regulación de Ca^{2+} intracelular 5
   - 1.2 Estrés de retículo endoplásmico 6
   - 1.3 Transductores de la vía UPR 8
   - 1.4 Estrés de retículo endoplásmico y lipotoxicidad 12
   - 1.5 Lipopolisacáridos y vía UPR 14
2. Hipótesis 17
3. Planteamiento del problema 17
4. Objetivos
   - 4.1. Objetivo general 18
   - 4.2. Objetivos específicos 18
5. Materiales y métodos
   - 5.1. Reactivos 19
   - 5.2. Cultivo celular 19
   - 5.3. Recambio de células 19
   - 5.4. Preparación de ácidos grasos libres 19
   - 5.5. Preparación de lipopolisacáridos 20
   - 5.6. Viabilidad celular 20
   - 5.7. Lisado celular para la extracción de proteínas 20
   - 5.8. Western Blot 20
   - 5.9. Cuantificación de insulina mediante ELISA 21
   - 5.10. Inmunocitoquímica 21
   - 5.11. Fraccionamiento celular para la determinación de triglicéridos 22
   - 5.12. Cuantificación de Ca^{2+} 22
   - 5.13. Determinación de óxido nítrico 23
   - 5.14. Análisis estadístico 23
6. Cronograma 24
7. Resultados 25
8. Discusión de resultados 36
9. Conclusiones 43
10. Perspectivas 45
11. Bibliografía 46
12. Anexos 51

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácidos grasos libres
AGS	Ácidos grasos saturados
ATF4	Factor de activación de la transcripción 4
ATF6	Factor de activación de la transcripción 6
BiP	Proteína de unión a inmunoglobulina
CHOP	Proteína homóloga al factor de transcripción C/EBP
COPII	Proteína de cubierta complejo II
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
eIF2	Factor eucariótico de iniciación 2
ERAD	Degradación asociada al retículo endoplásmico
GADD34	Arresto de crecimiento y daño inducido al DNA 34
GRP94	Proteína regulada por glucosa 94
GSIS	Secreción de insulina estimulada por glucosa
IRE1α	Enzima que requiere inositol 1 α
LPS	Lipopolisacáridos
MyD88	Gen de respuesta a la diferenciación mieloide 88
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PERK	Proteína cinasa de RE dependiente de RNA de doble hebra
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
S1P	Proteasa de sitio 1
S2P	Proteasa de sitio 2
SERCA	ATPasa Ca^{2+} de retículo sarco/endoplásmico -ATPase
TLR4	Receptor tipo toll 4
UPR	Respuesta a proteínas desplegadas
XBP1s	Proteína de unión caja-X 1s

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un desorden metabólico caracterizado por la pérdida progresiva o la disfunción de las células β pancreáticas, encargadas de la producción y secreción de insulina, resultando en el daño de órganos y múltiples complicaciones a largo plazo [1]. La Federación Internacional de Diabetes estimó que en el 2017 cuatro millones de personas fallecieron a causa de diabetes, y que la población mundial con diabetes fue de 425 millones de adultos, lo que significa que 1 de cada 11 adultos la padece [2], siendo la DM2 el tipo de diabetes más común con el 90% de los casos a nivel mundial [3]. Además, 352 millones de adultos presentan intolerancia a la glucosa, que en conjunto representan un gasto de 727 mil millones de dólares mundialmente, en pacientes entre 20 a 79 años. Por ejemplo, México se encuentra en el segundo lugar en Latinoamérica y quinto en el mundo con la prevalencia más alta en diabetes con alrededor de 12 millones de personas [2]. Por esto, la diabetes se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública internacionalmente.

Siendo el tipo de diabetes predominante a nivel mundial, la DM2, es una enfermedad progresiva, en donde la mayoría de los casos ocurre en un contexto de obesidad y el decaimiento a la respuesta celular de los tejidos insulino-dependientes (resistencia a la insulina). Mientras que la mayoría de las personas obesas desarrollan resistencia a la insulina, solo una proporción desarrolla DM2. Varios estudios han enfocado su atención en las células β pancreáticas, como el principal contribuyente a la hiperglicemia en DM2 [4].

La DM2 generalmente resulta de una alta demanda de insulina debido a resistencia a la insulina, la cual se compensa con la proliferación de las células β e hiperinsulinemia, sin embargo, este proceso gradualmente lleva a la pérdida de células β y posiblemente al incremento de apoptosis. El deterioro progresivo de la función de las células β, la reducción en la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS), la disminución de células β y el aumento en la apoptosis han sido

reportados en islotes pancreáticos humanos con DM2 [1]. No obstante, el mecanismo de la disfunción de las células β no podría ser explicado solamente con el aumento de apoptosis, se proponen otros mecanismos involucrados en la pérdida progresiva de las células β en la DM2.

1.1.1 Receptor de insulina y su señalización

La insulina modula a las células mediante la unión a su receptor en la superficie de las células sensibles a insulina. El receptor de insulina (IR) está integrado de una estructura α2β2, el cual es un complejo heterotetramérico bifuncional que consiste de 2 subunidades extracelulares α que unen la insulina a 2 subunidades transmembranales-β con actividad tirosina cinasa. La unión de la insulina a la subunidad α induce la transfosforilación de las subunidades β en residuos de tirosina específicos. Además, el receptor se autofosforila en otros residuos de tirosina en las regiones juxtamembranales y el dominio intracelular. El IR activado fosforila residuos de tirosina en sustratos intracelulares que incluyen la familia del sustrato del receptor de insulina (IRS). Debido a este evento, las proteínas IRS interaccionan con p85, subunidad reguladora del fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), llevando a la activación de la enzima, generando así fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3). El PIP_3 conduce a la translocación de Akt a la membrana plasmática. La activación de Akt y su transducción de señales, conlleva a la localización de GLUT4 a la membrana plasmática facilitando la captación de glucosa (Figura 1). La inhibición de la activación de esta cascada es el principal mecanismo mediante el cual se desencadena la resistencia a la insulina [5].

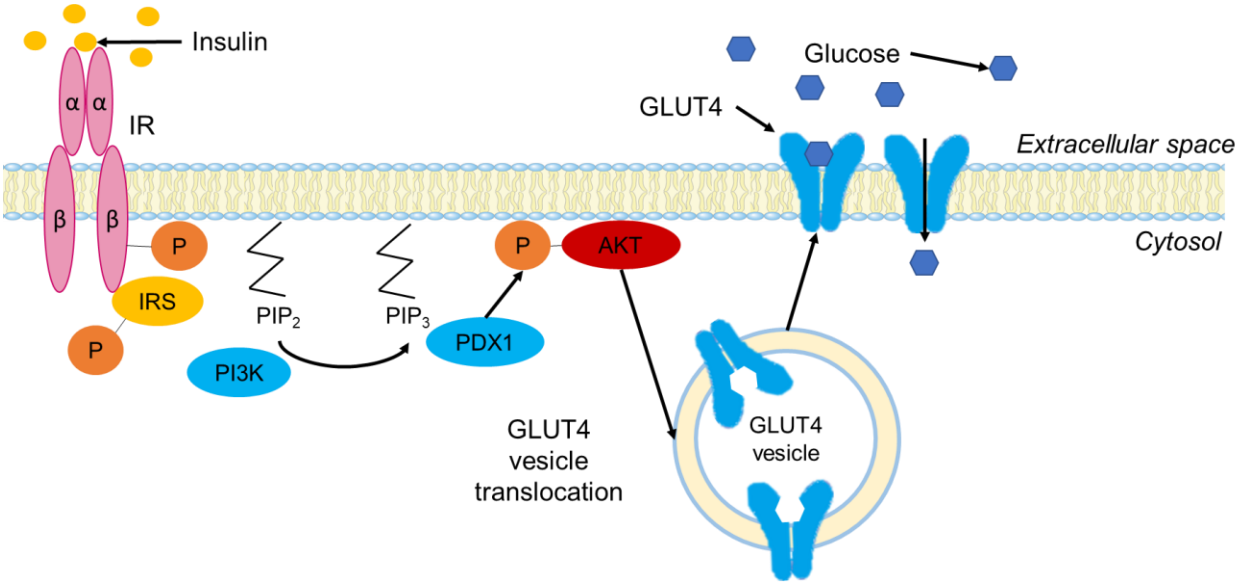


Figura 1. Transducción de señales del receptor de insulina. La insulina liberada por las células β pancreáticas circula por el torrente circulatorio hacia tejidos insulino-dependientes como el músculo y el tejido adiposo. Se une a su receptor (IR) e induce una fosforilación en residuos tirosina específicos. El IR activado recluta y fosforila al sustrato del receptor de insulina (IRS) el cual interactúa con el fosfaditilinositol 3 cinasa (PI3K) y genera fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3). El PIP_3 conduce a la translocación de Akt a la membrana plasmática, que conlleva a la localización de GLUT4 a la membrana permitiendo la captación de glucosa. Adaptado de Leto D, Saltiel AR [6].

Individuos con obesidad y resistencia a la insulina que no desarrollan diabetes consiguen aumentar la producción de insulina de las células β lo suficiente como para superar el decaimiento de la respuesta en tejidos periféricos [7]. Sin embargo, muchas personas pasan por fases progresivas de la disminución de control de la glucemia que comienza con una hiperglucemia leve clasificado como prediabetes. La prediabetes y las fases tempranas de la diabetes se caracterizan por el aumento, en lugar de la disminución de la insulina en suero y un aumento progresivo de la proinsulina sérica [7].

1.1.2 Liberación de insulina en las células β

Las células β pancreáticas censan las fluctuaciones de glucosa, y en respuesta liberan insulina, la cual se encarga de impulsar la captación de glucosa en el hígado, músculo y tejido adiposo, normalizando así la glucosa plasmática. La insulina tiene un amplio rango de funciones, como la reducción de la gluconeogénesis hepática directa a través de la supresión de secreción de glucagón y supresión del apetito vía neuronas hipotalámicas [8]. Se estima que cada célula β produce alrededor de un millón de moléculas de insulina cada minuto [9], empaquetados en

pequeños gránulos, teniendo aproximadamente 10,000 gránulos por célula β, de los cuales sólo una fracción es liberada al censar aumentos en la glucosa plasmática [9-11]. Después de la traducción, los polipéptidos de preproinsulina entran al retículo endoplásmico (RE), donde es plegada en un ambiente oxidante permitiendo la formación de tres enlaces disulfuro intramoleculares. Subsecuentemente, sufre un proceso de escisión en el RE para formar proinsulina, la cual es transportada al aparato de Golgi y empaquetada en gránulos secretores. En los gránulos, la proinsulina es cortada proteolíticamente por la prohormona convertasa 1 o 2, posteriormente se remueven los residuos básicos del extremo C-terminal por la carboxipeptidasa E. Estas actividades enzimáticas generan la insulina madura, consistente de las cadenas A y B unidas por enlaces disulfuro (Figura 2) [12].

En las células β la secreción de insulina es regulada por la detección de glucosa en concentraciones fisiológicas a través del transportador de glucosa GLUT2 [13]. Rápidamente, la hexoquinasa fosforila a la glucosa, formándose glucosa-6-fosfato, que entra a glucólisis para producir piruvato, que a su vez entrará al ciclo de Krebs para la producción de ATP. La producción de ATP en las células β, por lo tanto, es reflejo de la glicemia [14]. El aumento en los niveles de ATP, en respuesta a glucosa, cierra los canales de K^+ dependientes de ATP, resultando en la despolarización de la membrana plasmática, que a su vez activa canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Por consiguiente, la entrada de Ca^{2+} estimula que vesículas preformadas de insulina se fusionen con la membrana plasmática y liberen su contenido a la sangre, lo que resulta en la secreción de insulina en relación con el aumento de la glucosa extracelular [14]. Dado que la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) es bifásica, la primera fase es desencadenada por el aumento de Ca^{2+} intracelular debido al cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP y libera los gránulos que están en contacto con la membrana plasmática [15]. La velocidad de liberación es de alrededor de 15 gránulos por minuto, durando entre 5-10 minutos, por cada célula β [10]. La segunda fase implica la preparación y translocación de los

gránulos (reserva) para su liberación, también desencadenado por el aumento de Ca^{2+} intracelular [15]. En esta fase, la velocidad de liberación disminuye a 5 gránulos por minuto aproximadamente (Fig. 2) [10].

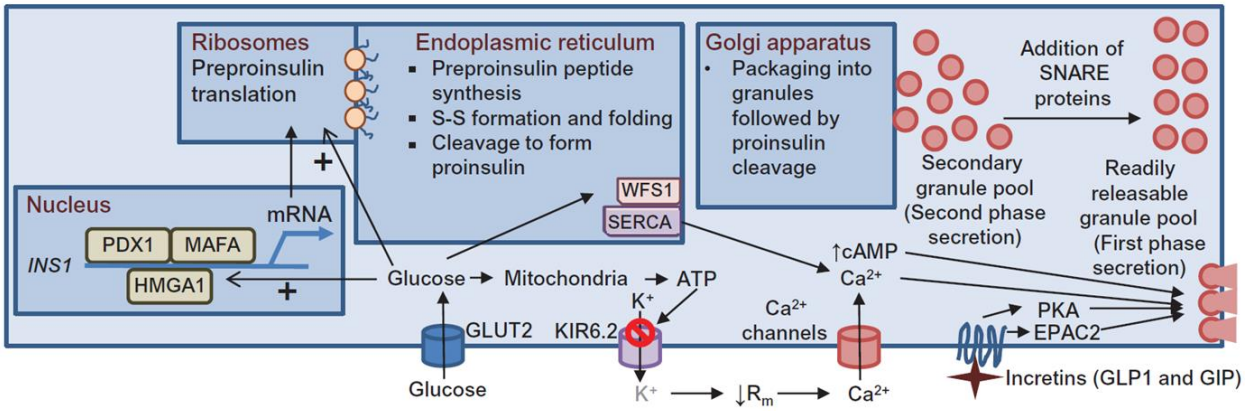


Figura 2. Mecanismos de acción de la glucosa en la célula β. La célula β al censar glucosa a través del transportador GLUT2, mediante el catabolismo de glucosa se genera un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, liberando los gránulos de insulina previamente formados (primera fase de GSIS). A su vez, el aumento de glucosa dentro de la célula β, promueve la transcripción y traducción de la insulina, originando los gránulos de la segunda fase de GSIS. Tomada de Hasnain S et al [12].

Como se describió anteriormente, la insulina es un polipéptido que se procesa en el RE para llegar a su maduración. Al ser una proteína en demanda en un estado postprandial, es de suma importancia que su síntesis y procesamiento se encuentren en homeostasis, sobre todo para evitar condiciones como el estrés de RE. Estos temas se abordarán en los siguientes apartados.

1.1.3 Mecanismos asociados a la regulación del Ca^{2+} intracelular

El factor detonante para la liberación de los gránulos de insulina en las células β pancreáticas es el aumento del Ca^{2+} intracelular [15]. Existen diversos mecanismos que regulan la entrada y salida de Ca^{2+} de las células, como la bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) y el intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) [16].

La PMCA es una bomba expresada en la membrana plasmática de todas las células eucariotas, pertenece a la familia de ATPasas tipo-P y es codificada por cuatro genes separados (PMCA1-4) [17]. Tiene una función crítica para mantener la $[Ca^{2+}]$ citosólica por debajo de los 300 nM [18]. De forma interesante, la sobreexpresión de PMCA en las células β (BRIN-BD11) contribuye a la

salida de Ca^{2+} de la célula, disminuyendo la [Ca^{2+}] en citoplasma, RE y la mitocondria. También activa la vía UPR mediante IRE1α e induce apoptosis aumentando la expresión de Bax [16].

Por otro lado, el intercambiador NCX utiliza el gradiente electroquímico del Na^{+} para introducir tres iones de Na^{+} y exportar un ion de Ca^{2+} en contra del gradiente [19]. Al igual que PMCA, cuenta con cuatro isoformas (NCX1-4), NCX1 es el mayor expresado en la célula β de la rata. La función de NCX ha sido caracterizada en la contracción del músculo cardiaco [19]. En células β, un incremento en la actividad de NCX1 se ha descrito que aumenta la apoptosis y disminuye la proliferación celular [16], sin embargo, su papel no ha sido completamente dilucidado en relación con la regulación del Ca^{2+}, bajo condiciones de lipotoxicidad. Como se mencionará más adelante, la exposición crónica a altas concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) causa apoptosis de células β al disminuir la [Ca^{2+}] citosólica, lo que contribuye al desarrollo de DM2 [20]. El papel de PMCA y NCX1 en la célula β es fundamental, ya que ambos contribuyen a la extrusión de Ca^{2+}, por lo tanto, a la regulación de la liberación de los gránulos de insulina.

1.2 Estrés de retículo endoplásmico

El RE es un orgánulo que se encarga de la biosíntesis de aproximadamente un tercio de las proteínas celulares, es el sitio de síntesis y plegamiento de proteínas de secreción y de membrana, así como el responsable de varias funciones celulares incluyendo el almacenamiento de Ca^{2+} y la señalización celular [21, 22]. El RE provee un ambiente único para el plegamiento y modificaciones postraduccionales de polipéptidos destinados a la membrana plasmática, orgánulos intracelulares o del ambiente extracelular. El plegamiento de proteínas en el RE es facilitado mediante chaperonas que mantienen la solubilidad de las proteínas, aumentan la velocidad del plegamiento proteico, asegurando que solamente las proteínas con su plegamiento nativo sean translocadas al aparato de Golgi. El plegamiento de proteínas inicia cuando el polipéptido traducido entra al lumen del RE asistido de chaperonas como BiP, y mediadores

adicionales como oxido-reductasas que catalizan la formación de enlaces disulfuro nativos [23]. Los polipéptidos plegados correctamente entran al transporte anterógrado debido a su interacción con receptores específicos y componentes de vesículas que contienen proteínas de ensamblaje como la COPII (proteína de cubierta complejo II) [9]. La composición del lumen y el tamaño de cisternas del RE varían dependiendo de cada célula y estímulos extracelulares, pueden llegar a tener una concentración de proteínas mayor a 100 mg/mL. En el caso de las células pancreáticas, el RE está extensamente cargado con cisternas delgadas, que pueden soportar el plegamiento y procesamiento apropiado de grandes cantidades de proteínas de secreción como la insulina [24]. El RE de las células β pancreáticas produce aproximadamente 1 millón de moléculas de insulina por minuto. Sin embargo, condiciones que perturban la homeostasis metabólica y el plegamiento proteico causan distensión en las cisternas del RE, que es considerado disfuncional para el plegamiento y procesamiento de proteínas [9].

En este caso, un sistema de vías de señalización conservadas filogenéticamente, denominada respuesta a proteínas desplegadas (UPR), monitorea las condiciones del RE, censa la insuficiencia en la capacidad de plegamiento de proteínas del RE y comunica esta información sobre el estado del lumen del RE a los programas de expresión génica [25]. La acumulación de proteínas desplegadas desencadena estrés, y en respuesta a esta condición de estrés se activa la vía UPR aumentando la capacidad del RE de satisfacer sus propias necesidades, a través de mediar la expansión de la membrana reticular y ocupar este espacio con la maquinaria de plegado de proteínas sintetizadas *de novo* [26]. Este control transcripcional a largo plazo es acompañado por mecanismos que disminuyen el flujo de proteínas entrantes al RE, así como el mRNA.

La acumulación de proteínas desplegadas es detectada por los dominios de tres proteínas transmembranales en el lumen del RE: IRE1α (enzima que requiere inositol 1α), PERK (proteína cinasa de RE dependiente de RNA de doble cadena) y ATF6 (factor de activación de la

transcripción 6) [27]. Las tres ramas operan en paralelo y utilizan mecanismos únicos de transducción de señales, siendo IRE1 la más conservada a nivel evolutivo [28]. Inicialmente, la vía UPR desencadena una respuesta adaptativa potenciando la actividad de plegado a través de la regulación a la alta de chaperonas y enzimas del procesamiento de proteínas; seguido de la reducción de la carga de trabajo del RE mediante la atenuación de la traducción y la degradación de mRNA, y un aumento en la expresión de proteínas de degradación asociadas al RE (ERAD), así como componentes de la autofagia para promover la eliminación de proteínas no plegadas [29]. La expresión del sistema ERAD es un proceso crucial para preservar la funcionalidad del RE. Las proteínas desplegadas luminales y de membrana solubles se translocan al citoplasma para su ubiquitinización y degradación mediada por proteosoma (ERAD I), mientras que las insolubles se agregan y son eliminadas por autofagia (ERAD II) [30].

1.3 Transductores de la vía UPR

Los tres transductores de la vía UPR, IRE1α, ATF6 y PERK (Figura 3), en conjunto promueven la transcripción y traducción de proteínas específicas cuando proteínas mal plegadas se acumulan en el lumen del RE [25]. Los tres transductores se mantienen inactivados a través de la interacción con la proteína chaperona BiP [31]. A medida que las proteínas desplegadas son acumuladas en el RE, BiP libera a IRE1α y PERK, lo que permite su dimerización y activación. Al ser liberado ATF6 de BiP, viaja hacia el aparato de Golgi, donde es activado por un procesamiento proteolítico mediado por las proteasas S1P y S2P [32].

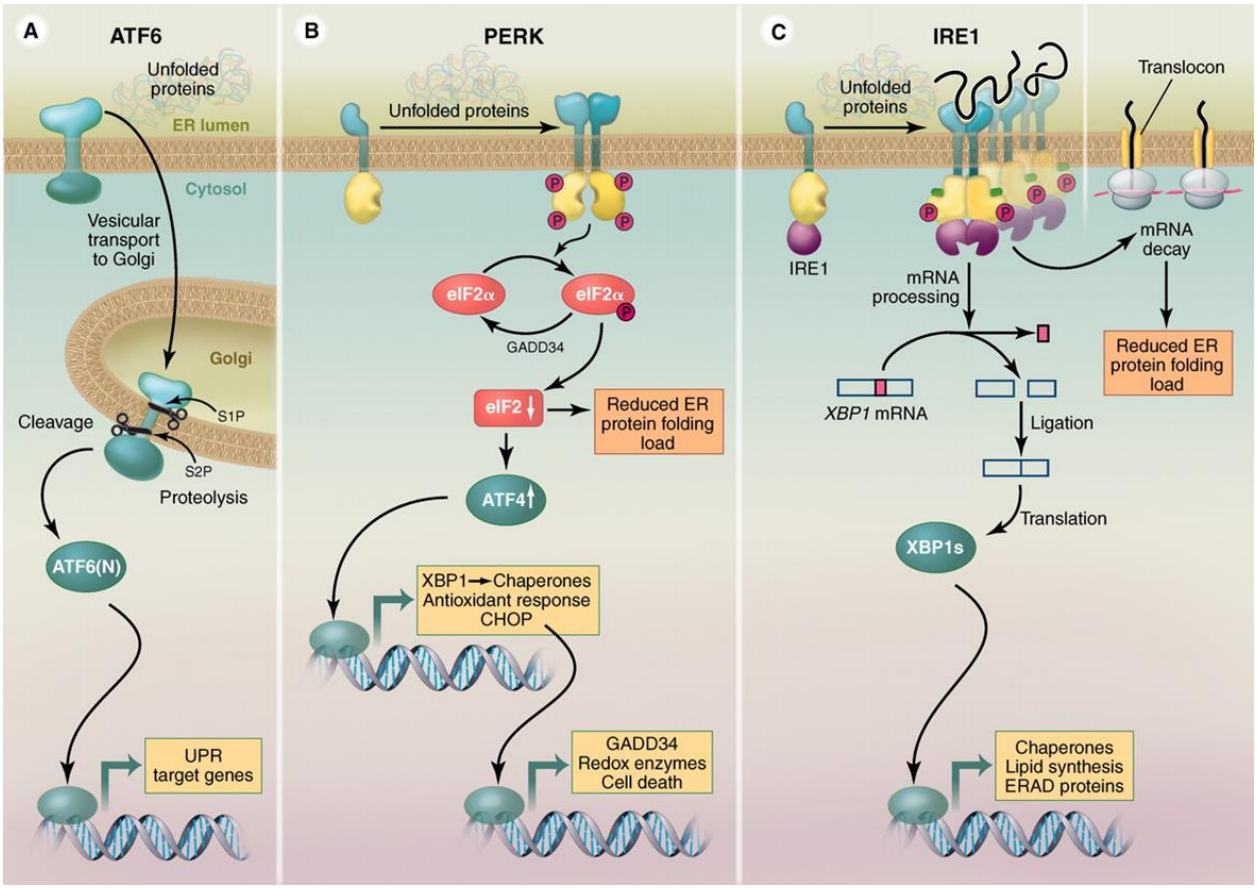


Figura 3. Transductores de la vía UPR. Las tres ramas de la vía UPR (ATF, PERK e IRE1) censan la acumulación de proteínas desplegadas en el lumen del RE, produciendo reguladores de la transcripción de genes blanco de la vía UPR. Cada transductor utiliza un mecanismo diferente de transducción de señales: ATF regula la proteólisis, PERK controla la transcripción, e IRE1 mediante splicing no convencional de mRNA. Así mismo, PERK e IRE1 reducen la carga proteica del RE al disminuir la transcripción y degradando mRNAs, respectivamente. Tomado de Walter P, Ron D [25].

Los genes particulares inducidos por estrés de RE varían en diferentes tipos de células, dependiendo de los sensores de estrés de RE que se activan, factores de transcripción específicos de tejido, y en particular el tipo, el grado y la duración del estrés [33]. La activación aguda o crónica de bajo nivel de la vía UPR tiene una función protectora y de adaptación a través de la inducción de chaperonas; sin embargo, una condición de estrés grave o crónica que no puede ser resuelta por la vía UPR puede conducir a la muerte celular por apoptosis [34].

IRE1α es una quinasa transmembranal del RE con actividad RNasa. Es el sensor de estrés de RE más fundamental, ya que está conservado en todas las células eucariotas [35]. El dominio luminal que regula la activación quinasa es homólogo con el dominio luminal del segundo transductor PERK [36]. En respuesta al estrés del RE, IRE1 se oligomeriza y autofosforila, lo que

conlleva a la activación de su función endoribonucleasa. Esto a su vez lleva al splicing no convencional del mRNA sobre el factor de transcripción XBP1 (proteína de unión caja-X 1). Este factor de transcripción regula la expresión de chaperonas y proteínas del proceso ERAD. Su función RNasa se activa por cambios conformacionales seguidos de la oligomerización de IRE1 en la membrana. Cuando IRE1 es activado, corta el mRNA codificante para XBP1 en dos posiciones específicas, removiendo un intrón. Los exones cortados son ligados por la ligasa RtcB [37], dando lugar a un mRNA empalmado que posteriormente será traducido en la forma activa XBP1s [38], con función de activador transcripcional.

c-Jun es otro factor de transcripción activado por IRE1, que contiene una cremallera de leucina básica en el dominio de unión al DNA en la región C-terminal, y en la región N-terminal el dominio de activación transcripcional. Se ha registrado un papel protector contra la activación excesiva de la respuesta al estrés de RE y muerte celular en hepatocitos [39] y fibroblastos [40].

De manera que la vía de señalización IRE1α/XBP1 activa la transcripción de un subconjunto de genes de la vía UPR codificantes para chaperonas, catalizadores de plegamiento, y la maquinaria de degradación de ERAD incluyendo EDEM, EDEM2, EDEM3, Derlins-1-3, y HRD1 [41, 42]. La actividad RNasa de IRE1α también degrada mRNAs que codifican proteínas que son trasladadas al lumen del RE para reducir la carga de las proteínas recién sintetizadas que requieren plegamiento [43]. Este hallazgo se ha extendido al análisis de los niveles de estrés de RE y niveles de mRNA de insulina en la célula β. Los resultados demostraron que la liberación de Ca^{2+} del RE inducida farmacológicamente podría promover el estrés de RE y reducir los niveles de mRNA de insulina en las células INS-1E y en cultivos primarios de células β [44].

PERK también es una quinasa transmembranal, la cual se dimeriza y autofosforila después de la acumulación de proteínas desplegadas. Su principal función es regular la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de la subunidad α de eIF2 (factor eucariótico de iniciación 2) en Ser51

para inhibir la traducción de mRNA, y de esta manera, reducir el flujo de proteínas que entran al RE para aliviar el estrés [45]. Sin embargo, existen varios mRNAs que requieren la fosforilación de eIF2α para ser traducidos. Un ejemplo muy estudiado es ATF4 (factor de activación de la transcripción 4), un factor de transcripción que induce la expresión de un subgrupo de genes regulados por la vía UPR que codifican para chaperonas de RE y la maquinaria de ERAD, entre otros [46]. Dos genes blanco importantes de ATF4 son CHOP (proteína homóloga al factor de transcripción C/EBP) y GADD34 (arresto de crecimiento y daño inducido al DNA 34). CHOP es un factor de transcripción que controla genes codificantes para componentes involucrados en la apoptosis. GADD34 codifica una subunidad reguladora inducida por PERK de la proteína fosfatasa PP1C que contrarresta la función de PERK mediante la desfosforilación de eIF2α [47, 48].

ATF6α es una proteína transmembranal tipo II que contiene una cremallera de leucina básica y un dominio de activación transcripcional en su región citosólica N-terminal. La acumulación de proteínas mal plegadas induce la liberación de ATF6α de la chaperona BiP y la reducción de puentes disulfuro en su dominio luminal. Esto permite el transporte anterógrado mediante vesículas que lo llevan al aparato de Golgi, en donde dos proteasas, S1P y S2P (proteasa de sitio-1, sitio-2), remueven el dominio luminal y el ancla transmembranal, respectivamente [32, 49, 50]. El fragmento N-terminal citosólico liberado, ATF6(N), se traslada al núcleo para activar genes blanco de la vía UPR que codifican catalizadores del plegamiento y la degradación de proteínas [51]. Entre los blancos de ATF6 están proteínas residentes en el RE involucradas en el plegamiento de proteínas, como BiP (chaperona de la familia de proteínas de choque térmico HSP70), PDI (proteína disulfuro isomerasa) y GRP94 (proteína regulada por glucosa 94, chaperona de la familia HSP90) [52].

Las tres ramas de la vía UPR son cruciales en las células β pancreáticas para disminuir el estrés de RE y restaurar la homeostasis asegurando la síntesis adecuada de proteínas de alta calidad,

especialmente la insulina, que representan aproximadamente la mitad de la síntesis total de proteínas en estas células [11]. La vía UPR tiene incorporado un mecanismo de retroalimentación y control para apagar las tres ramas y sus blancos, previniendo la sobreactivación de la vía UPR que pudiera ser perjudicial [53]. De manera que la vía UPR no sólo es responsable de la regulación en la expresión y activación de los efectores de adaptación y/o supervivencia, ya que también puede promover la muerte celular [54, 55].

1.4 Estrés de RE y lipotoxicidad

Los lípidos son un componente importante de la dieta normal del ser humano. Representan una fuente de energía y proporcionan ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles. Sin embargo, los ácidos grasos saturados (AGS) pueden tener efectos adversos en la salud humana [56]. Se ha establecido que el consumo de AGS es un factor de riesgo significativo para enfermedades cardiovasculares, así como condiciones de inflamación, resistencia a la insulina y obesidad. También los AGS inducen disfunción endotelial y un perfil lipídico desfavorable, incluyendo niveles altos de colesterol LDL y bajos niveles de colesterol HDL [57, 58].

La exposición crónica a niveles elevados de AGL ha sido relacionada con el estrés de RE, causando disfunción y posteriormente la apoptosis de las células β [59-62], a este concepto se le conoce como lipotoxicidad. En este sentido, la lipotoxicidad está asociada con los efectos deletéreos debidos a la acumulación de lípidos en los tejidos periféricos, cuando se satura la capacidad de almacenamiento de ácidos grasos en el tejido adiposo. De hecho, se ha llegado a relacionar específicamente con la disfunción de las células β, así como en fenómenos de apoptosis [63]. Así mismo, existen evidencias de que las ramas de la vía UPR pueden ser reguladas de manera diferente, dependiendo si es por una sobrecarga en la síntesis de proteínas o por proteínas mal plegadas [64]. Otros estudios demuestran que marcadores del estrés de RE se encuentran elevados en islotes pancreáticos de pacientes con DM2 [65-67].

Así mismo, perturbaciones en el ambiente del RE, como alteraciones en el pH o los niveles de Ca^{2+}, que comprometen la capacidad de plegamiento de proteínas, podrían tener un papel clave en la disfunción de las células β [61, 68, 69]. Un mecanismo similar se propone para explicar el estrés de RE mediado por lipotoxicidad [20, 69], pero le evidencia no es definitiva. En un estudio reciente con palmitato y tapsigargina, un inhibidor de la bomba SERCA (ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarco/endoplásmico), se observaron resultados más efectivos bajo estos estímulos en la disminución del Ca^{2+} en el RE, que por citocinas o condiciones de glucotoxicidad [69].

Se ha demostrado que la lipotoxicidad reprime el tráfico de proteínas del RE al aparato de Golgi [70-73]. Este efecto se propone que es específico en los ácidos grasos saturados (palmitato), siendo causa de estrés de RE en lugar de ser un fenómeno secundario, ya que el tráfico de proteínas se ve ralentizado en menor proporción que el estímulo con tapsigargina [72]. En este sentido, también se reporta que los ácidos grasos como el palmitato y el oleico inducen apoptosis de las células β, pero sólo el palmitato activa a PERK e IRE1 [74]. Además, el palmitato regula los niveles de CHOP, el cual puede participar en la muerte celular mediada por el estrés de RE, así también en la activación de JNK y la caspasa 12 [75]. Interesantemente, un estudio en islotes humanos mostró que el estrés de RE está involucrado con condiciones de lipotoxicidad, pero no en la glucotoxicidad. El tratamiento con palmitato ocasionó estrés de RE severo y la inducción de apoptosis, pero la respuesta al estrés de RE inducido por palmitato no se modificó por concentraciones altas de glucosa [20].

Se sugiere que el palmitato altera el medio ambiente del RE, causando la síntesis de proteínas mal plegadas. Aunque no existe evidencia concreta de este fenómeno, el palmitato modifica significativamente la distribución de la chaperona BiP, de un patrón de localización reticular, a una distribución agregada y punteada. Una distribución similar de BiP se observó en células tratadas con inhibidores del proteasoma, los cuales previenen el proceso de ERAD [76]. La sobreexpresión de BiP en células β, protege contra lipoapoptosis inducida por AGL [66]. De

manera que el mecanismo conductor de la lipoapoptosis inducido por estrés de RE es complejo y posiblemente podría involucrar diversos factores, incluyendo la reducción de niveles de Ca^{2+} en el RE [77].

Mientras que los ácidos grasos saturados promueven la resistencia a la insulina [78, 79], el ácido graso monoinsaturado oleico mejora la sensibilidad [80, 81]. Incluso, se sugiere complementar la ingesta de ácidos grasos saturados con ácido oleico en el manejo de la DM2 [82]. No obstante, los mecanismos por los que el ácido oleico mejora la resistencia a la insulina, no se conocen de manera profunda.

En un estudio en células de músculo esquelético, el ácido oleico, en contraste al palmítico, no aumenta los marcadores de estrés de RE. La suplementación con oleico a una baja concentración proporciona un papel protector contra el estrés de RE y reduce los marcadores presentes en células control. Se descarta la participación de PPARs, Ca^{2+}, SIRT1, PKA o el aumento en la oxidación de ácidos grasos en los efectos producidos por el ácido oleico [83]. Aunque también hay evidencia de que el ácido oleico también puede llegar a ser citotóxico para las células β, sin embargo, no tan potente como el palmítico [84-87].

1.5 LPS y la vía UPR

Diversos tipos celulares tienen la capacidad de reconocer patrones moleculares a través de receptores en su superficie celular, lo cual ayuda en el proceso de distinguir lo propio y lo extraño al organismo. Entre los patrones que las células pueden reconocer están los PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos), los cuales se encuentran presentes principalmente en la superficie de algunas bacterias. Estos patrones pueden ser componentes de la membrana, tales como lipopolisacáridos (LPS) que son identificados por las células mediante receptores denominados TLR (receptor tipo Toll), presentes en mayor proporción en células de la respuesta inmune.

Los LPS circulantes al llegar a la superficie de las células β pancreáticas se unen a los receptores TLR4 y a sus correceptores CD14 y MD-2, reclutándose MyD88 (gen de respuesta a la diferenciación mieloide 88). La interacción entre el TLR4 y MyD88 activa la cascada de señalización mediada por NF-Kb, lo que activa la transcripción de múltiples genes pro-inflamatorios, citocinas , quimiocinas y otros efectores de la respuesta inmune innata [88].

El efecto de los LPS no se ha estudiado de manera amplia en las células β humanas, sin embargo, experimentos en células procedentes de islotes pancreáticos de rata, han demostrado que la estimulación con LPS, provoca la expresión *de novo* del mRNA de diversas citocinas pro-inflamatorias, principalmente IL-1α y TNF-α, así como el incremento en la expresión de IL-1β. Además, en los mismos experimentos se observó que la exposición prolongada a LPS disminuye la secreción de insulina [89].

En la DM2, existe disfunción de las células β pancreáticas, lo cual se ha asociado a una condición inflamatoria de bajo grado. Se propone que los LPS, activan una cascada de señalización mediada por TLR-4, la cual ejerce efectos deletéreos sobre la función de las células β, a través de mecanismos moleculares que aún no están bien dilucidados [90]. La evidencia sugiere que individuos con diabetes mellitus presentan un patrón de microbiota intestinal alterado, en el cual predominan las bacterias Gram negativas, que expresan LPS en la membrana externa [91]. En este sentido, la microbiota intestinal puede desempeñar un papel como factor de riesgo en el desarrollo de diabetes mellitus, condición denominada endotoxemia [92]. Autores plantean la activación de TLR4 mediante LPS en células β puede inducir resistencia a la insulina y disfunción celular, ya que en ratones knockout para TLR4 se ha observado un efecto protector contra la resistencia a la insulina inducida por lipotoxicidad y contra la obesidad inducida por la dieta [93].

De forma importante, no se ha documentado el efecto directo de los LPS sobre la vía UPR en células β pancreáticas, aunque se propone que estos pueden contribuir a la inflamación

sostenida y a la disfunción de la célula en los procesos patológicos como la diabetes mellitus, posiblemente mediante la disminución de la secreción de insulina.

2. HIPÓTESIS

La estimulación de las células beta pancreáticas RIN-m5F con lipopolisacáridos y ácidos grasos saturados modificará la activación de la vía UPR, con una afectación sobre la síntesis y secreción de insulina.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En enfermedades como la diabetes existe una disfunción en las células β pancreáticas, siendo asociada con una dieta alta en lípidos y la generación de resistencia a la insulina. Asimismo, se propone que los LPS causan efectos deletéreos sobre la función de las células β. También, varios estudios han demostrado un posible vínculo entre el estrés de RE y la lipotoxicidad en células β. De manera que modificaciones en el RE podrían tener un papel en la disfunción celular, reprimiendo el tráfico de proteínas del RE al aparato de Golgi y generando una sobrecarga de proteínas en el lumen, lo cual activará la vía UPR. Siendo este proceso inducido por ácidos grasos saturados como el palmitato. De forma importante, no se ha caracterizado la asociación entre los AGL y LPS sobre los mecanismos de modulación de la vía UPR. Sin embargo, los ácidos grasos monoinsaturados como el oleico y el palmitoleico pudieran tener un papel protector en la resistencia a la insulina, pero los mecanismos sobre el daño en las células β productoras de insulina no se han descrito detalladamente.

Por esto, en este trabajo se proyecta evaluar la implicación de ácidos grasos saturados e insaturados sobre la vía UPR empleando como modelo una línea celular de células β pancreáticas conjuntamente con LPS, para evaluar su potencial interacción citotóxica sobre las células β. Particularmente, se pretende describir la característica que confiere a los ácidos grasos su papel inductor o protector de estrés de RE con un efecto concomitante de AGL y LPS. De manera que a través de este estudio se evaluará el papel de diferentes AGL y LPS sobre las alteraciones de los transductores de la vía UPR y como repercuten en funciones como la síntesis y secreción de insulina.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar el efecto conjunto de la lipotoxicidad por ácidos grasos saturados y LPS sobre la activación de la vía UPR en células β pancreáticas.

Objetivos específicos

1. Determinar el papel de los ácidos grasos saturados (palmítico, esteárico) y LPS sobre la viabilidad celular en un modelo de células β pancreáticas, así como el papel protector de ácidos grasos insaturados como el oleico y palmitoleico.
2. Evaluar la función de ácidos grasos saturados (palmítico, esteárico) y LPS sobre la activación de la vía UPR (ATF6, IRE1, PERK) en un modelo de células β pancreáticas y potencialmente el papel protector de los ácidos grasos insaturados (oleico, palmitoleico).
3. Analizar el papel de ácidos grasos saturados (palmítico, esteárico), ácidos grasos insaturados (oleico, palmitoleico) y LPS sobre la secreción de insulina, en un modelo de células β pancreáticas.
4. Estudiar el papel de ácidos grasos saturados (palmítico, esteárico), ácidos grasos insaturados (oleico, palmitoleico) y LPS sobre la regulación intracelular del Ca^{2+} intracitoplásmico en un modelo de células β pancreáticas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Medio RPMI-1640, suero fetal bovino, solución de antibiótico y antimicótico (10,000 unidades/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina B), ácido palmítico (PA), ácido oleico (OA), albúmina sérica bovina libre (BSA) de ácidos grasos libres, lipopolisacáridos (LPS), tripsina, PBS 1X, MTT, tunicamicina.

5.2 Cultivo celular

Células RIN-m5F derivadas de células β pancreáticas fueron cultivadas con medio RPMI-1640, adicionado con 10% de suero fetal bovino, antibiótico y antimicótico, a una temperatura de 37°C y un ambiente con 95% de aire y 5% CO_2; con cambio de medio de 2 a 3 veces por semana, hasta alcanzar un 90% de confluencia. Estas células se obtuvieron de la ATCC (American Type Cell Culture).

5.3 Recambio de células

Para el recambio celular, se retira el medio de cultivo, se realiza 1 lavado con PBS, adición de tripsina 1X y se incuba 1-2 min. Se adicionó medio RPMI completo y centrifugó a 1500 rpm por 2 min en tubos de 15 mL, posteriormente se retiró el sobrenadante y resuspendió en 1 mL de medio completo, para llevar a cabo el sembrado en varias cajas de cultivo.

5.4 Preparación de ácidos grasos libres

El ácido palmítico fue disuelto en una solución etanol:H_2O (1:1, vol:vol) a 50°C bajo una concentración final de 150 mM. La preparación de ácido palmítico se llevó a cabo con albúmina sérica (BSA) (solución al 10% en H_2O) durante 1 hora a 37°C. Se filtró por poros de 0.22 µm y posteriormente diluida en medio de cultivo para alcanzar una concentración final de 300 µM con una relación molar de 3:1 (Briaud et al. 2001), antes de adicionarla a las cajas de cultivo.

5.5 Preparación de lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos fueron reconstituidos en H_2O ultrapura MQ a una concentración de $1x10^6$ ng/mL, se utilizará un filtro con poros de 0.22 µm, y posteriormente diluidos en medio de cultivo a concentraciones finales de 10, 1000 y 4000 ng/mL.

5.6 Viabilidad celular

Durante este ensayo se cultivaron 23,000 células por pozo en cajas de ELISA hasta alcanzar una confluencia del 85%. Las células se ayunaron por 1 h con 15 min con medio OptiMem, incubadas 24 h con diferentes tratamientos (BSA, palmitato, oleico, palmitoleico, esteárico y LPS). Después se agregó la solución de MTT por 4 h, posteriormente se adicionó el buffer de lisis (20% SDS/50% dimetilformamida) y se incubó toda la noche a 37°C, para finalmente determinar la absorbancia a 560 nm/630 nm.

5.7 Lisado celular para la extracción de proteínas

Con una densidad de 230,000 células/mL, las células se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar una confluencia del 85%. Para realizar los experimentos fueron mantenidas en ayuno por 1 h con 15 min con medio RPMI-1640 (sin SFB, sin antibiótico y sin antimicótico), posteriormente se adicionaron diferentes tratamientos (BSA, palmitato, oleico, palmitoleico, esteárico y LPS) por 24 h, después se lavaron con PBS 1X, se agregó el buffer de lisis de proteínas y se incubó por 35 min a 4°C y centrifugó a 8500 rpm por 8 min, para recuperar el sobrenadante. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de ácido bicinconínico.

5.8 Western-blot

Lisados celulares de proteínas obtenidos de las diferentes condiciones fueron procesados mediante la técnica de western-blot. Las proteínas se separaron por medio de SDS-PAGE al 10% y transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos

primarios (anti-ATF6α H-280 sc-22799 de Santa Cruz Biotechnology, anti-XBP1s 619502 de BioLegend, anti c-Jun B-1 sc-166540 de Santa Cruz Biotechnology) toda la noche a 4°C. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario (anticuerpo anti-mouse acoplado a peroxidasa HRP 034M4761 Sigma Aldrich) 1 h a 37°C. El proceso de revelado se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia usando el kit Immobilon Western de Millipore.

5.9 Cuantificación de insulina mediante ELISA

Al término del tratamiento, las células se incuban 1.5 h con medio RPMI, se recupera, centrifuga a 8000 rpm por 5 min y se obtiene el sobrenadante. Se realizó una dilución 1:10 del medio sobrenadante y PBS 1X. Se utilizó el kit para cuantificación de insulina ALPCO, 80-INSRTU-E01, E10. En la microplaca se pipetearon 25 µl de cada estándar, control y muestra y se adicionan 75 µl del Working Strength Conjugate para incubar la placa agitándose a 700-900 rpm por 2 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 6 veces con 350 µl del Working Strength Wash Buffer, se agregaron 100 µl de sustrato TMB y se incubó la placa en agitación a 700-900 rpm por 30 min a temperatura ambiente. Por último, se agregaron 100 µl del Stop Solution, se agitó suavemente y se determinó la absorbancia a 450 nm.

5.10 Inmunocitoquímica

Después de los diferentes tratamientos, las células se fijaron en cubreobjetos con una solución 50% etanol/50% acetona a -20°C. La permeabilización se realizó con Triton X-100 al 0.01%, posteriormente se realizaron dos bloqueos, el primero con un inhibidor con peroxidasa endógena por 5 min, y el segundo con suero bovino al 1 % por 20 min en una cámara húmeda. Se desechó el exceso y se incubó con el anticuerpo primario (XBP1s, CHOP, ATF6, BiP, PMCA, c-Jun, β-actina), incubándose en cámara húmeda durante la noche a 4°C. Posteriormente se agregó el anticuerpo secundario por 40 min en cámara húmeda a temperatura ambiente, se retiró el

anticuerpo y añadió diaminobenzidina (DAB) de 1-3 minutos, y por último se realizó la contratinción con hematoxilina.

5.11 Fraccionamiento celular para la determinación de triglicéridos

Al terminar el tratamiento, las células fueron lavadas con PBS 1X y se pasaron a un tubo de 2 mL. Los tubos se centrifugaron a 2,000 *g* por 2 minutos, el pellet se resuspendió en 200 uL de la solución de sacarosa (60% sacarosa en buffer de lisis) y se incubó en hielo por 10 minutos. Posteriormente se agregaron 800 ul de buffer de lisis (10 mM HEPES, 1 mM EDTA), se incubaron en hielo por 10 minutos y se le dieron cinco pases con una jeringa de insulina a cada tubo para ser centrifugados a 100 *g*. Se agregaron 600 u L del mix del colorante (azul de metileno) y se centrifugaron a 20,000 g por 2 horas a 4°C. Las muestras fueron congeladas a -70°C. Una vez congelados los tubos se separó la parte del "floating" (parte superior con el colorante) y se le agregaron 100u L de buffer de lisis.

Para la cuantificación de triglicéridos (floating) se utilizó el kit SPINREACT Triglicéridos-LQ. En una placa de ELISA se pipetearon 100 uL del blanco, patrón y muestras en cada pozo por duplicado. A cada pozo se le agregaron 50 uL del reactivo, se incubó la placa 3 h a 37°C y se determinó la absorbancia 560 nm.

5.12 Cuantificación de Ca^{2+}

Finalizado el tratamiento, cada pozo se lavó con PBS 1X e incubado en OptiMEM/1.5 µM Fura por 1 h 15 minutos a 37°C. Las células fueron lavadas con PBS 1X e incubadas 20 minutos a temperatura ambiente en PBS 1X. Posteriormente se lavaron de nuevo con PBS 1X atemperado. Las células se incubaron en PBS 1X frío para su traslado al Centro de Graduados del Instituto Tecnológico de Tijuana, donde se utilizó el fluorómetro Cary Eclipse con un rango de longitud de onda de 340-380 nm y una longitud de onda de emisión de 510 nm. Se adicionaron 2.5 mL de PBS 1X a cada muestra. Se midió R_0 a 340/380, se le agregó Tritón a la muestra y se midió

nuevamente para obtener la R_{max}. Por último, se le agregó EGTA y se volvió a medir para obtener la R_{min}. Cada tratamiento se realizó por triplicado y a cada muestra se le realizaron 4 mediciones. Se recopilaron los datos y mediante la siguiente fórmula se obtuvo la concentración intracelular de Ca^{2+}, donde K_d es igual a 225 nM y Sfb es el radio de la fluorescencia basal del Ca^{2+} libre y el Ca^{2+} unido a la sonda [94]:

$$[Ca^{2+}]i\ (nM) = K_d\ \times \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \times Sfb$$

5.13 Determinación de óxido nítrico

Al término del tratamiento, las células se incubaron 1.5 h con medio RPMI. Se recuperó el medio y centrifugó a 8000 rpm por 5 min para obtener el sobrenadante. Para la determinación de óxido nítrico se utilizó el reactivo de Griess a una concentración de 40 mg/mL. En una placa de ELISA se pipetearon 90 µL de medio sobrenadante de cada muestra por pozo por duplicado, a lo que se le adicionaron 57 uL del reactivo de Griess. Se determinó la absorbancia a 540 nm.

5.14 Análisis estadístico

Considerando que la mayor parte experimental se llevó a cabo en ensayos estandarizados, en donde la variabilidad entre el modelo de estudio es reducida comparada con estudios clínicos, el análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la comparación de medias y desviación estándar de las diferentes condiciones experimentales estudiadas con respecto al control. Asimismo, la diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) entre tratamientos sobre las células beta se determinó mediante un análisis de ANOVA de una vía.

El análisis de la expresión de proteínas bajo los diferentes tratamientos se procesó de forma semi-cuantitativa de acuerdo a la intensidad de bandeo, tomando como referencia al control de carga con β-actina.

6. CRONOGRAMA

	2016			2017						2018			
Actividad	Ago Sep	Oct Nov	Dic	Ene Feb	Mar Abr	May Jun	Jul Ago	Sep Oct	Nov Dic	Ene Feb	Mar Abr	May Jun	Jul Ago
Redacción protocolo													
Cultivo celular													
Preparación de AGL													
Preparación de LPS													
Aplicación de tratamientos													
Ensayos de viabilidad celular													
Lisado celular													
Extracción de proteína													
Cuantificación de proteína													
Western blot													
Fijación de células													
Inmunocitoquímica													
Cuantificación de Ca^{2+} intracelular													
Análisis y discusión de resultados													
Redacción de tesis													
Presentación examen profesional													

7. RESULTADOS

En un primer panel experimental para definir el efecto de los LPS sobre la vía UPR en células β (línea celular RIN-m5F de ATCC), se realizó un ensayo de viabilidad celular y la caracterización de varios blancos mediante la técnica de western blot. En la figura 1A se observa que el tratamiento bajo concentraciones crecientes de LPS por 5 h no modificó la viabilidad celular. Sin embargo, bajo el tratamiento con LPS en concentraciones crecientes sobre los cultivos celulares, se observó un aumento en la expresión de XBP1s, factor de transcripción activado por la vía de IRE1a, no obstante, al llegar a la concentración de 1000 ng/mL disminuyó su expresión. Un patrón similar se observó en c-Jun y ATF6α (Fig 1B), los cuales son factores de transcripción que ayudan a disminuir el estrés de RE. Aunque, en el ensayo con MTT, se mantuvo el mismo nivel de viabilidad celular entre las condiciones incluso en concentraciones elevadas de LPS.

De manera que al observar que los LPS causan estrés de RE mediante la activación de la vía UPR sin afectar la viabilidad celular, se evaluó el efecto de los ácidos grasos. En un primer enfoque se caracterizaron los tres principales ácidos grasos saturados que se encuentran en condiciones fisiológicas celulares, por ejemplo, en membranas celulares tanto citoplásmica como de los principales orgánulos; los cuales en la literatura se ha demostrado su papel citotóxico en la fisiología celular. Se evaluó al ácido palmítico (16C), ácido mirístico (14C) y ácido esteárico (18C), para caracterizar el papel del largo de la cadena hidrocarbonada sobre las células beta. Se puede ver que bajo este tratamiento se activó la vía UPR con todos los ácidos grasos saturados (Fig. 1C), aunque en mayor medida por el ácido palmítico (PA). Por esta razón en la mayoría de los experimentos nos decidimos enfocar en el efecto celular del ácido palmítico. En este experimento se utilizó la tunicamicina (Tun) como control positivo, una molécula que induce estrés de retículo endoplásmico, a través de la inhibición de la glicosilación de proteínas [95].

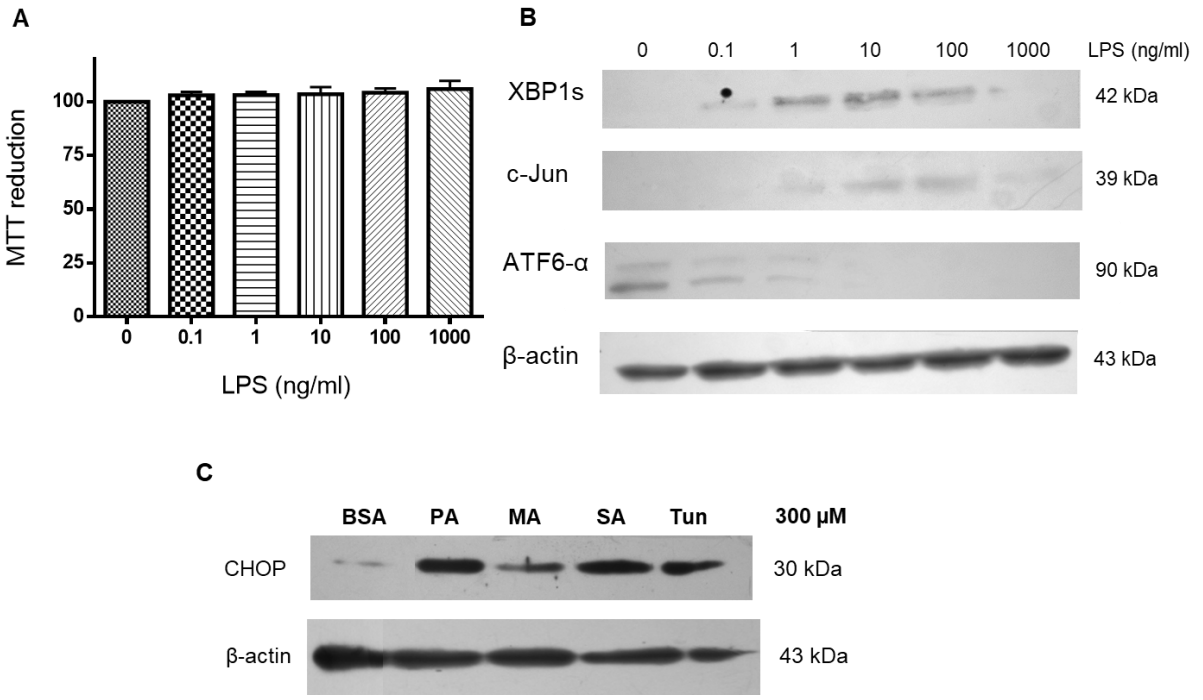


Figura 1. Los LPS y los ácidos grasos saturados (300 μM) inducen la activación de la vía UPR. A) Caracterización de la viabilidad celular con concentraciones crecientes de LPS evaluada mediante el ensayo de MTT. B) Western-blot de marcadores de la vía UPR bajo un tratamiento en concentraciones crecientes de LPS. C) Western blot de marcadores de la vía UPR bajo el tratamiento con ácidos grasos saturados. La proteína β-actina se usó como control de carga.

Al observar el daño causado por el PA, se realizó un experimento con PA y LPS para evaluar el efecto conjunto de ambos estímulos, tomando en cuenta que estas condiciones no se han caracterizado previamente en células β. En el tratamiento de palmitato (300 μM) en conjunto con LPS, la viabilidad celular disminuyó aproximadamente 20% en comparación a ambos compuestos solos (Fig. 2A). Bajo el estímulo de LPS, no disminuye la viabilidad, sin embargo, la vía UPR se activó levemente a través de CHOP, como se había registrado en experimentos anteriores (Fig. 2B). Así mismo, cuando se encuentran ambos estímulos, se enciende de forma importante la vía UPR mediante la activación de XBP1s. También aumenta la expresión de CHOP, un posible indicador de apoptosis que podría explicar el decaimiento de la viabilidad. La disminución de la viabilidad y el aumento de XBP1s bajo el estímulo con palmitato, concuerda con la inmunocitoquímica para XBP1s. En las células tratadas con el vehículo (BSA) (Fig. 2C, D) no se observa la expresión de XBP1s, mientras que en las células que tuvieron

tratamiento con ácido palmítico (Fig. 2E, F) se registró la expresión de XBP1s, con una localización principalmente citoplásmica.

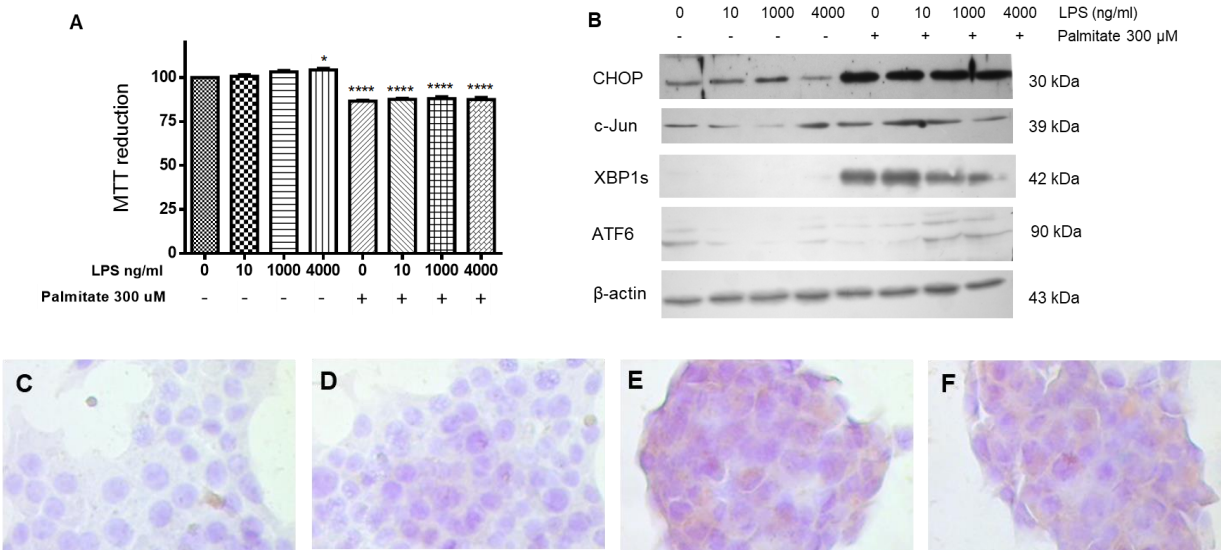


Figura 2 El estímulo con ácido palmítico (300 µM) sobreactiva la vía UPR. A) Caracterización de la viabilidad celular evaluada mediante el ensayo de MTT. *En todos los análisis $p<0.05$, con respecto al control; ****$p<0.001$. B) Western-blot de los marcadores de la vía UPR. C-F) Inmunocitoquímica contra XBP1s, C y D controles, E y F células con estímulo de ácido palmítico (40X).

Por otro lado, los ácidos grasos insaturados han mostrado un papel protector sobre la fisiología celular, por ejemplo, el OA, un ácido graso de 18C con una insaturación en el carbono 9 [96]. Como se muestra en la figura 3, bajo el tratamiento con ácidos grasos, se observa que el OA no modifica la viabilidad celular, ni causa estrés de RE (Fig. 3A, B); a diferencia del palmitato, como se había registrado en los resultados previos. De forma importante, como un experimento control se realizó el procesamiento de muestras mediante inmunocitoquímica para la detección de CHOP, bajo el estímulo de LPS y PA se registró el aumento en la expresión de CHOP (Fig. 3E, F). Esto podría deberse a la disminución de la viabilidad en un 30-40% en las células estimuladas con palmitato, posiblemente relacionados con la inducción de la apoptosis celular, ya que en el análisis proteico por western-blot sólo se aumenta la expresión de CHOP bajo este estímulo.

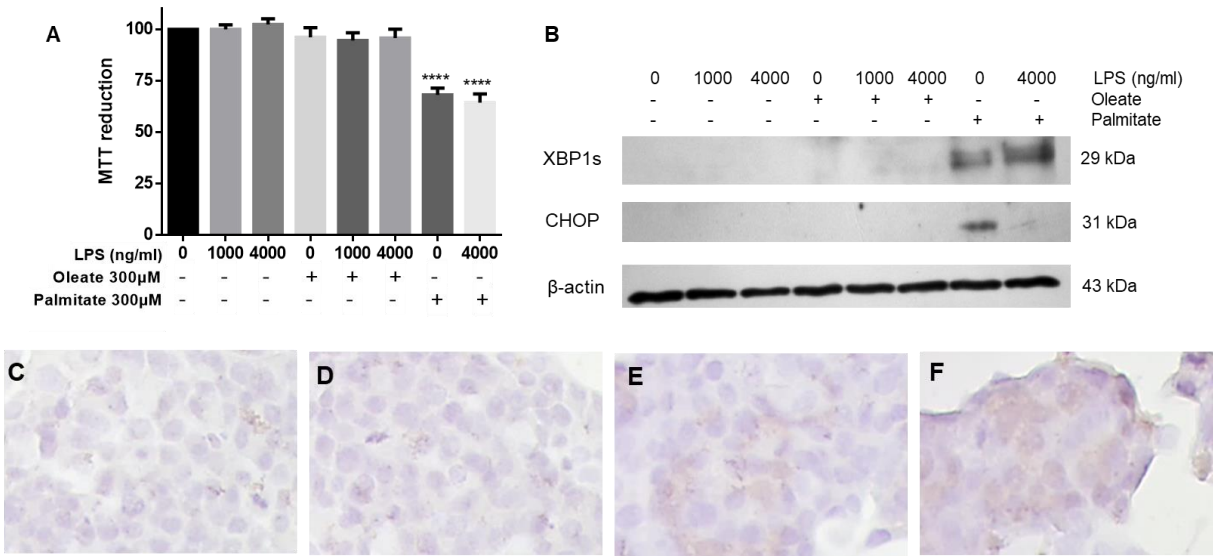


Figura 3. El palmitato (300 µM) afecta la viabilidad celular y activa la vía UPR, pero no el ácido oleico (300 µM). A) Western-blot de marcadores de la vía UPR, se activan en presencia de palmitato, pero no con oleico. ****En todos los análisis p<0.001 con respecto al control. B) Caracterización de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT, disminuye con el tratamiento con palmitato. C-F) Inmunocitoquímica contra CHOP, C y D con estímulo de LPS 4000 ng/mL, E y F con estímulo de palmítico (40X). * En los cuatro análisis p<0.0001, con respecto a los controles.

Al comprobar una vez más el efecto estresor del ácido palmítico y por otro lado que el ácido oleico no originó estrés de retículo endoplásmico, se realizó un experimento con ambos ácidos grasos para evaluar la posibilidad de encontrar un posible papel protector o restaurador del ácido oleico bajo la citotoxicidad que induce el ácido palmítico. Al tener ambos estímulos de ácidos grasos al mismo tiempo, el efecto del palmitato se revierte (Fig. 4A) y la viabilidad celular se mantiene igual que con ácido oleico exclusivamente. Esto posiblemente se debe a un papel protector del ácido oleico, o incluso una competencia entre los ácidos grasos por el mismo receptor (GPCR), ya que el tratamiento con palmitato previo a la incorporación del oleico disminuye la viabilidad y activa CHOP. Por otro lado, al tener un tratamiento por 12 h con palmitato y las 12 h posteriores solamente con OA, CHOP no se activa, pero la viabilidad celular disminuye (Fig. 4B). Sin embargo, el tratamiento con oleico previo a palmitato, no disminuye la viabilidad, pero sí activó CHOP, pudiendo ser una consecuencia del tratamiento con palmitato. Esto se podría traducir a un posible papel protector parcial del ácido oleico.

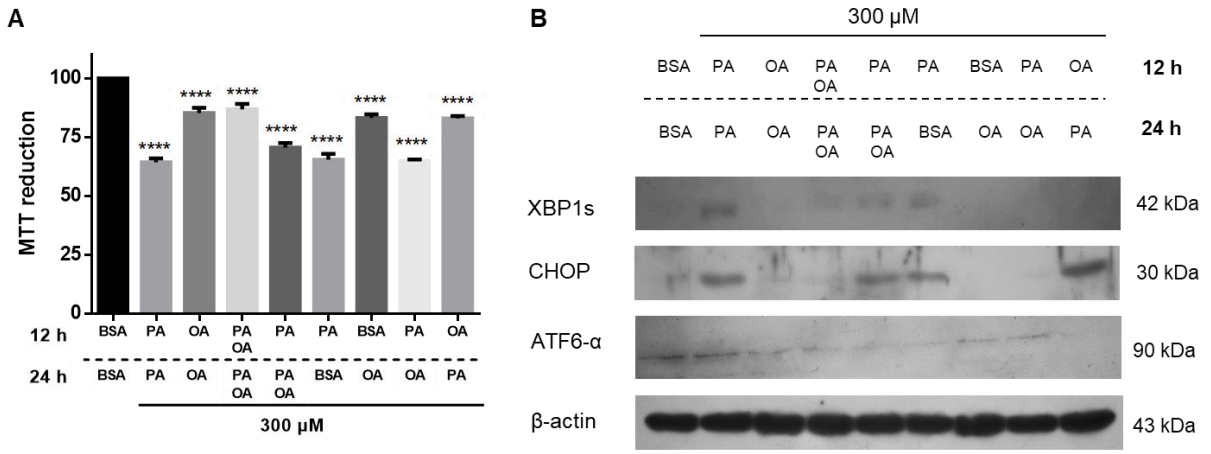


Figura 4. El tratamiento con ácido oleico puede proveer un papel protector a células β del estrés de retículo endoplásmico inducido por ácido palmítico. A) Caracterización de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT, que se ve disminuida en las células tratadas con palmitato. ****En todos los análisis p<0.001 con respecto al control. B) Western-blot de marcadores de la vía UPR (XBP1s, CHOP, ATF6), la cual no se activa en presencia del ácido oleico.

Al demostrar la activación de la vía UPR, se corroboró una vez más mediante la estimulación de las células por 16 h con palmitato, se registró una ligera activación de la vía UPR mediante ATF6α de igual manera que con el estresor tunicamicina (Tun). Pero esta vez usando una molécula control y potencialmente con la finalidad de evaluar una de las funciones más relevantes de las células β, la liberación de insulina. Al aumentar la exposición a 36 h, un ligero aumento en la expresión de ambos fue registrada. De forma interesante, con la chaperona BiP ocurre lo opuesto, a las 16 h aumenta, pero a las 36 h disminuye su expresión (Fig. 5A). Tomando en cuenta que el aumento de Ca^{2+} citoplásmico en las células β es uno de los detonantes de la liberación de insulina, se observa que la bomba PMCA (Fig. 5B) a las 36 h de exposición disminuye ligeramente su expresión, coincidiendo con la disminución de la secreción de insulina (Fig. 5C) a las 36 h bajo el estímulo de palmitato y tunicamicina. Al contrario de lo que se esperaba, que al disminuir la expresión de PMCA habría una mayor liberación de insulina por una mayor [Ca^{2+}] intracelular, los resultados obtenidos nos pudieran indicar que otros sistemas regulatorios están siendo activados.

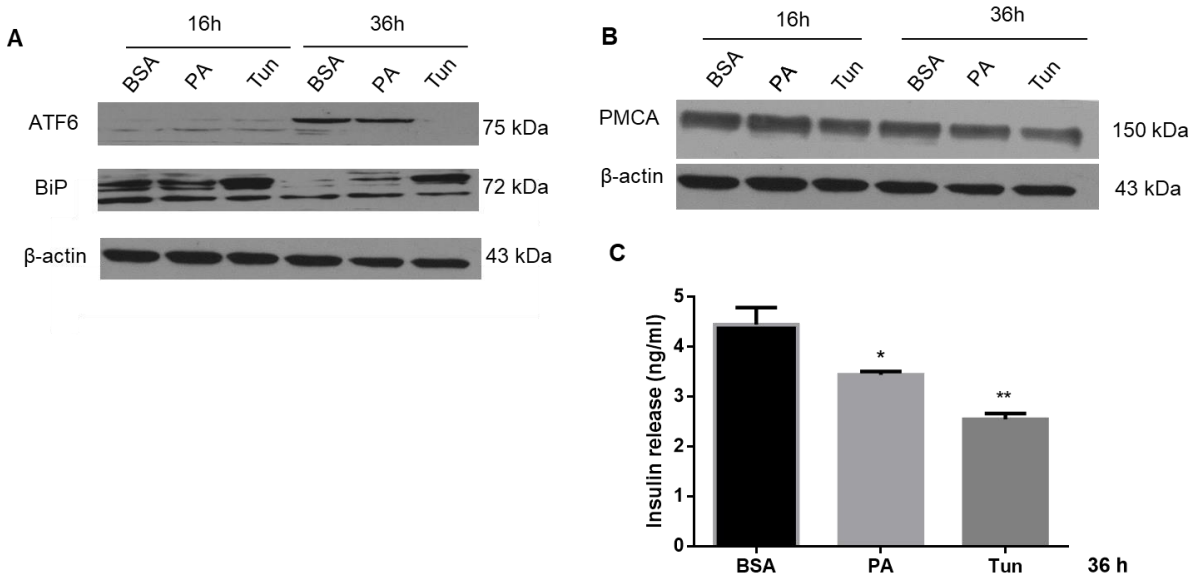


Figura 5. El tratamiento con ácidos grasos saturados por 36 h disminuye la secreción de insulina y activa la vía UPR. A) Western blot de marcadores de la vía UPR, la cual se activa a las 36 horas. B) Western blot de la bomba PMCA. C) Medición de la secreción de insulina en células expuestas 36 h al tratamiento. *En todos los análisis $p<0.05$ con respecto al control.

Considerando que el ácido oleico puede tener un papel protector parcial (Fig. 3), se evaluó el papel de otros ácidos grasos insaturados, como el palmitoleico. La viabilidad celular disminuyó con el ácido palmitoleico con palmítico y con LPS (Fig. 6A). Al igual que en otros experimentos, con palmítico y su combinación con LPS también disminuye la viabilidad, pero con palmítico y oleico se mantiene. En este sentido, el aumento en la expresión de XBP1s se asocia de forma importante con palmítico, LPS y su combinación (Fig. 6B), sin embargo, disminuye con palmitoleico. Bajo el tratamiento con ácido palmítico y LPS se observó una disminución drástica en la secreción de insulina (Fig. 6C), acompañado de un aumento en la formación de nitritos en el medio extracelular con el mismo estímulo. Los nitritos están asociados con la generación de un ambiente oxidativo, propiciando estrés de RE. En este caso, concuerda la activación de BiP y XBP1s con el aumento de nitritos (Fig. B, D). Estudios sugieren que la estimulación de la síntesis de óxido nítrico en células β amplifica la liberación de insulina por el aumento de la $[Ca^{2+}]$ intracelular estimulada por glucosa [97], proceso que no ha sido dilucidado

completamente. Sin embargo, con el ácido palmítico y LPS se aumentan los nitritos, pero disminuye la liberación de insulina (Fig. 6C, D).

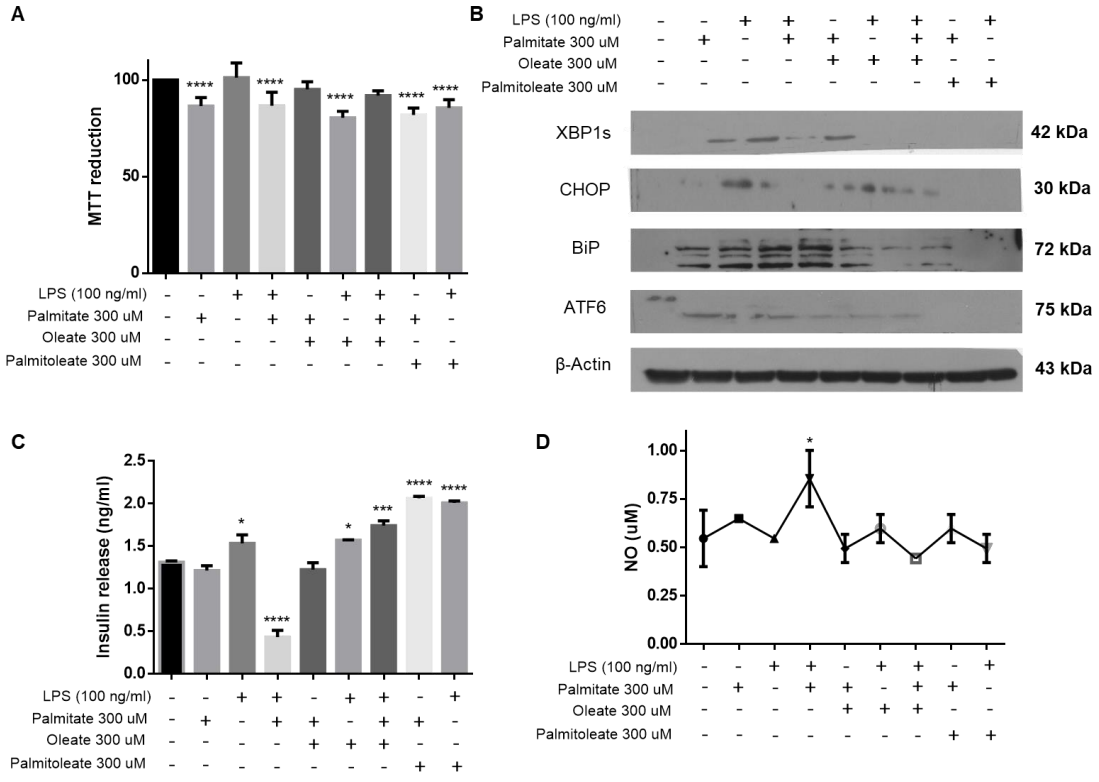


Figura 6. El tratamiento ácidos grasos insaturados por 24 horas disminuye la expresión de marcadores del a vía UPR. A) Caracterización de la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT que aumenta con oleico y palmitoleico. B) Western blot de marcadores de la vía UPR, la cual disminuye al incorporar ácido oleico y palmitoleico. C) Medición de la secreción de insulina en células expuestas 24 horas al tratamiento, disminuyendo la secreción con ácido palmítico. D) Liberación de óxido nítrico, la cual se aumenta con palmítico y lipopolisacáridos. * En todos los análisis $p<0.05$ con respecto al control y **** $p<0.001$ con respecto al control.

Interesantemente, se observó una disminución en la expresión de PMCA bajo el estímulo de palmítico/LPS (Fig. 7A, 7B), de igual manera la secreción de insulina disminuyó bajo este mismo tratamiento (Fig. 6C). La expresión de PMCA disminuyó aún más con el tratamiento de palmitoleico/palmítico y palmitoleico/LPS, pero la secreción de insulina aumentó. De forma importante, se detectó una segunda banda en el western blot de PMCA (Fig. 7A), que se observa bajo el tratamiento de palmítico/LPS. Esto pudiera ser un indicio de un corte proteolítico por degradación que puede afectar la actividad de la bomba [98]. De la misma manera se midió la expresión proteica del intercambiador NCX1 encargado de bombear tres

iones de Na^+ y sacar un ion de Ca^{2+} en contra del gradiente. Se encontró disminuida su expresión bajo los tratamientos con palmitoleico (Fig. 7A), con los cuales se observó un aumento en la liberación de insulina (Fig. 6C. La concentración de Ca^{2+} intracelular disminuyó con ácido palmítico (Fig. 7C), sin embargo, no se observó efecto en la liberación de insulina con este estímulo. Pero con ácido palmitoleico aumentó la concentración de Ca^{2+} y también aumentó la liberación de insulina (Fig. 6C). De manera interesante, con 10 h de tratamiento se observa un efecto contrario en la [Ca2+] intracelular (Anexo 1). También se midió la acumulación celular de triglicéridos (Fig. 7D), la cual disminuyó con LPS y se registró un aumento bajo el estímulo de palmítico/LPS.

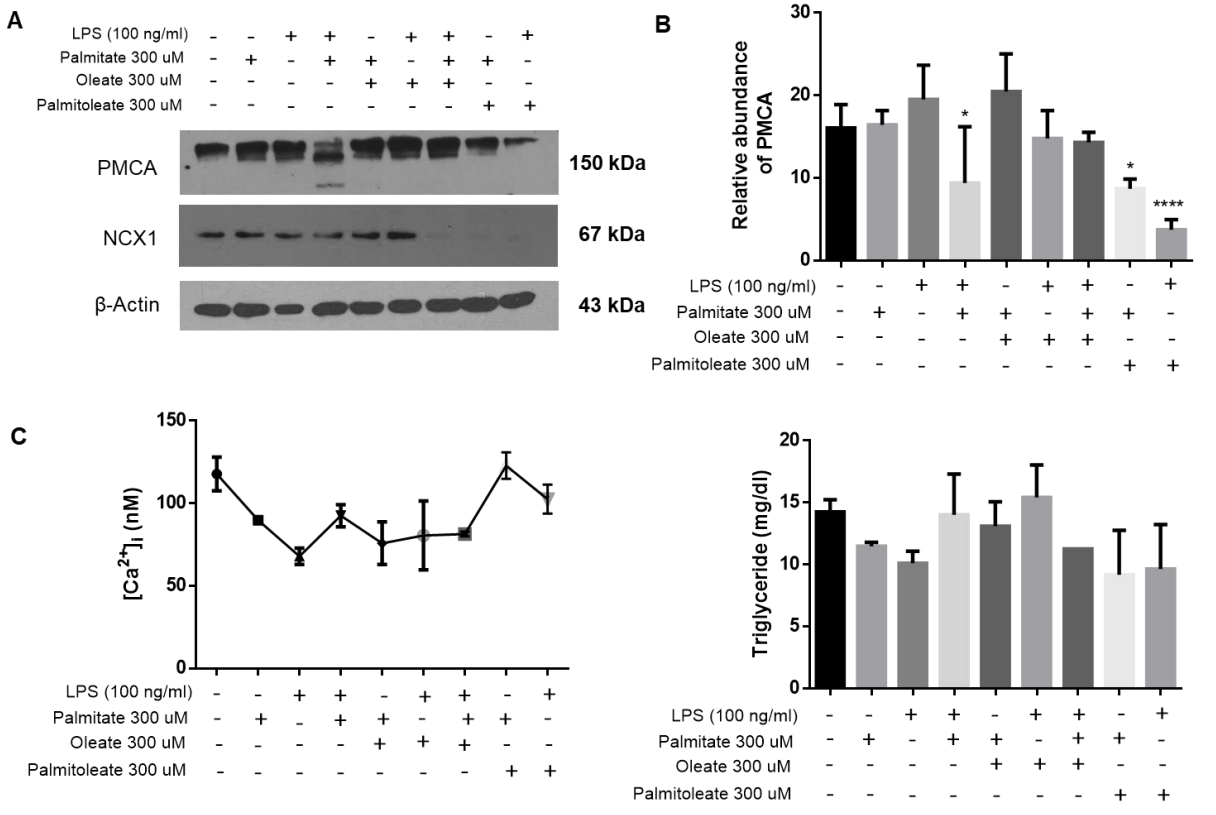


Figura 7. El tratamiento ácidos grasos saturados por 24 horas aumenta la expresión de la bomba PMCA. A) Western blot de la bomba PMCA, disminuyendo su expresión al estado basal bajo estímulos con ácido oleico y palmitoleico. B) Caracterización cuantitativa del western blot de PMCA normalizado con el control de carga β-actina. *En todos los análisis $p<0.05$ con respecto al control; y **** análisis $p<0.001$ con respecto al control. C) Cuantificación de la concentración intracelular de Ca^{2+}; TAP: tapsigargina, TUN: tunicamicina. D) Acumulación celular de triglicéridos.

Posteriormente, se evaluó el efecto específico del ácido palmitoleico, de manera que un estudio más detallado sobre su papel en la activación de la vía UPR y la secreción de insulina fue realizado. Es evidente un aumento en la viabilidad en células tratadas con ácido palmitoleico por 24 h (Fig. 8A) y la activación de CHOP y XBP1s (Fig. 8B) es casi nula. La expresión de PMCA se ve aumentada bajo el estímulo de palmítico/LPS (Fig. 8C), mientras que la secreción de insulina se ve disminuida, sin embargo, con palmitoleico aumenta. (Fig. 8D). Cabe mencionar que el ácido oleico y el ácido palmitoleico, siendo ambos ácidos grasos monoinsaturados, ejercen efectos muy distintos siendo la diferencia entre ellos la posición del doble enlace.

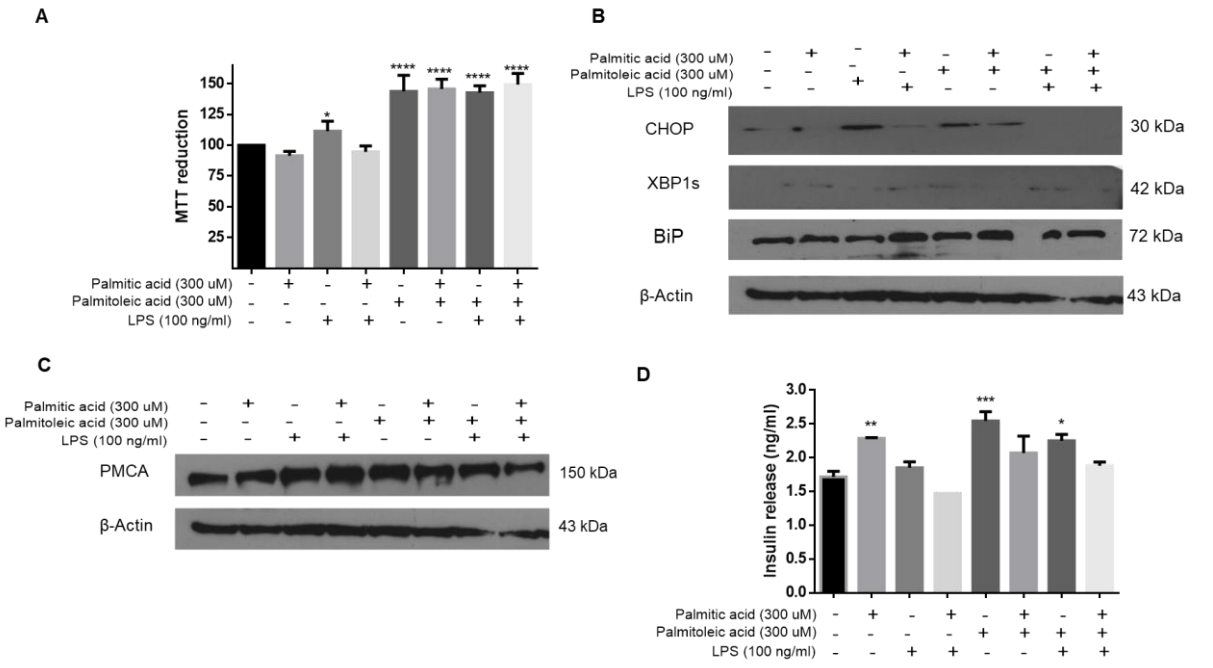


Figura 8. El tratamiento ácido palmítico y palmitoleico por 24 horas aumenta la expresión de marcadores de la vía UPR y afectan la expresión de la ATPasa PMCA. A) Western blot de marcadores de la vía UPR, la cual se activa bajo el estímulo de ácido palmítico y LPS, y se inactiva al incorporar palmitoleico. B) Caracterización de la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT que aumenta con palmitoleico. *En todos los análisis $p<0.05$ con respecto al control; y **** análisis $p<0.001$ con respecto al control. C) Western blot de la bomba PMCA, aumentando su expresión bajo estímulos con ácido palmítico, y en su combinación con LPS; se restaura al agregar palmitoleico. D) Medición de la secreción de insulina en células expuestas 24 horas al tratamiento, aumentando la secreción con ácido palmítico, pero disminuyendo al agregar LPS. Esta determinación corresponde a una única medición. *En todos los análisis $p<0.05$ con respecto al control; y **** análisis $p<0.001$ con respecto al control.

Al confirmar en varios experimentos el papel del ácido palmítico en las células β sobre la activación de la vía UPR y la disminución de la secreción de insulina, se evaluó el papel de

otro ácido graso saturado, el ácido esteárico (18C). Bajo un estímulo con ácido esteárico por 24 h no disminuyó la viabilidad celular, sin embargo, con LPS se observó una disminución. No obstante, la combinación de ácido esteárico/LPS restauró la viabilidad conforme al control, lo que no se había observado con el ácido palmítico (Fig. 9B). La expresión de CHOP aumentó con todos los estímulos excepto ácidos esteárico y palmitoleico por sí solos (Fig. 9A). La activación de la vía UPR es evidente por el aumento considerable de BiP con ácido esteárico, LPS y su combinación. Al utilizar palmitoleico disminuyó su expresión, así como en la combinación con esteárico, y la viabilidad celular se reestablece. Sin embargo, un ligero aumento se puede apreciar en la presencia de LPS con ambos ácidos grasos. Por otro lado, la expresión de PMCA disminuye con palmitoleico y la combinación de palmitoleico, esteárico y LPS (Fig. 9C) pero la secreción de insulina se mantiene con respecto al control (Fig. 9D). También se observa un aumento en la secreción de insulina con la combinación de palmitoleico y esteárico, así como la expresión de PMCA, al compararlo con palmitoleico solo. Interesantemente, un dato importante es que con la combinación de esteárico y LPS la secreción de insulina no se modifica, mientras que en nuestros datos previos se observa una disminución en la secreción de insulina con la combinación de palmítico y LPS (Figura 8).

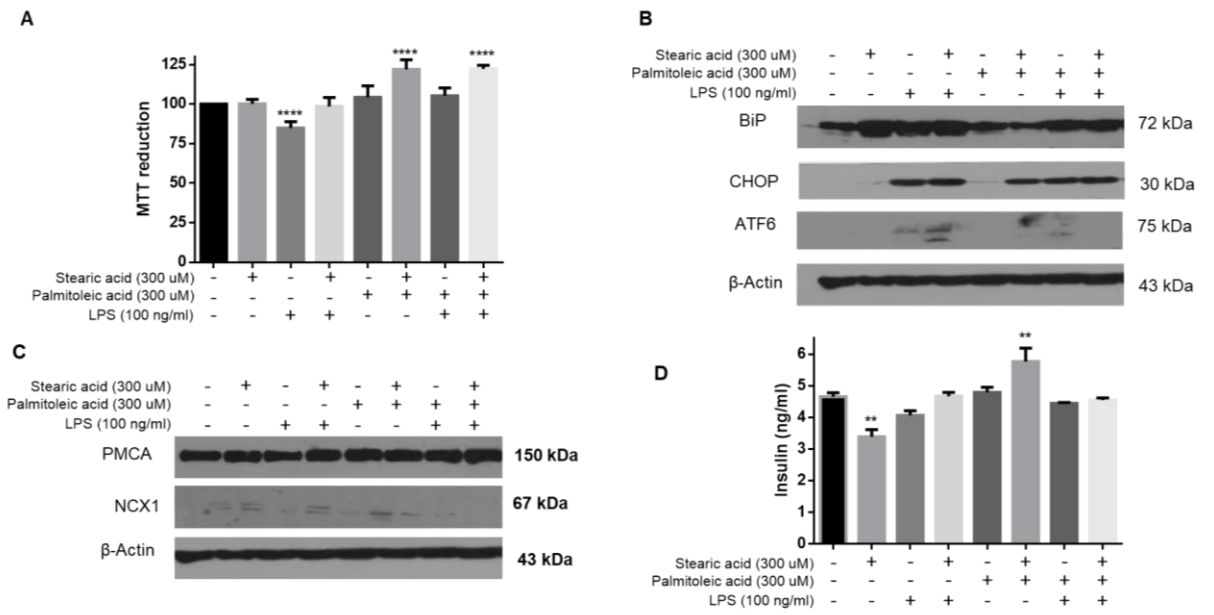


Figura 9. El tratamiento ácido esteárico por 24 horas aumenta la expresión de marcadores del a vía UPR, y disminuye la expresión de la ATPasa PMCA. A) Western blot de marcadores de la vía UPR, la cual se activa bajo el estímulo de ácido LPS junto con ácido esteárico, y en combinación con ácido palmitoleico. B) Caracterización de la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT que disminuye con LPS. **En todos los análisis $p<0.05$ con respecto al control. C) Western blot de la bomba PMCA, disminuyendo su expresión con ácido esteárico. D) Medición de la secreción de insulina en células expuestas 24 horas al tratamiento, disminuyendo la secreción con ácido esteárico.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Si bien se ha descrito ampliamente que los LPS promueven la secreción de citocinas proinflamatorias mediante el receptor TLR4, activando una cascada de señalización que termina con la activación del factor de transcripción NF-kB [88], dicha cascada podría disminuir la expresión del gen de la insulina [99]. Asimismo, se describe su participación en el estrés de RE, activando la vía UPR por medio del transductor IRE1α, evaluándose mediante el factor de transcripción XBP1s [100]. Aunado a esto, el lumen del RE es el sitio principal del plegado proteico, y la insulina es un polipéptido que en sus modificaciones postraduccionales pasa por este orgánulo, la disminución de la expresión del gen de la insulina podría ser mediada por una condición de estrés de RE, mediante la activación del XBP1s (figura 1A). También, este factor está directamente ligado a la regulación de la expresión de chaperonas y proteínas de degradación [31], efecto importante para mediar el estrés de RE, que pudiera tener una relación con la degradación del mRNA de la insulina. Un patrón similar se observa en c-Jun y ATF6α (figura 1A), factores de transcripción que ayudan a disminuir el estrés de RE. Sin embargo, la viabilidad celular se mantiene incluso a concentraciones elevadas de LPS. Esto indica que no está iniciando un proceso apoptótico, de lo que se puede concluir que la célula intenta recuperar la homeostasis activando la vía UPR (XBP1s, c-Jun, ATF6α).

Sin embargo, al comprobar la participación de los LPS en la activación de la vía UPR, fue de nuestro interés evaluar el efecto de los ácidos grasos libres. La exposición crónica a niveles elevados de AGL se relaciona con el estrés de RE, causando disfunción y apoptosis celular [59-62], fenómeno descrito como lipotoxicidad. Existe evidencia que la vía UPR puede ser regulada por una sobrecarga de proteínas desplegadas debido a la lipotoxicidad, comprometiendo la función correcta del RE. Por esto, se evaluó en primera instancia la función de los ácidos grasos saturados sobre la vía UPR en la fisiología de las células β. Fueron utilizados los ácidos palmítico, mirístico y esteárico, siendo el ácido palmítico, el descrito con

mayor amplitud debido a que se encuentra en mayor proporción en el cuerpo humano, incorporado en las membranas plasmática celulares, así como membranas de orgánulos como el RE. En la figura 2 se registró un aumento en la viabilidad celular a las 18 h, pero fue hasta las 30 h donde se observó la activación de la vía UPR por los tres ácidos grasos. Como el ensayo de MTT se basa en la reducción del compuesto por deshidrogenasas mitocondriales, y siendo la mitocondria es el lugar de la degradación de ácidos grasos, esta pudiera ser una razón por la que la viabilidad celular esta aumentada, la mitocondria puede encontrarse bajo una condición activa de β-oxidación por los estímulos de los ácidos grasos saturados (300 µM), o disminuida por el daño celular.

Al comprobar la participación de los LPS y los ácidos grasos saturados en la activación de la vía UPR, se evaluó el efecto en conjunto con un ácido graso saturado. En este caso se seleccionó el ácido palmítico por ser el que se encuentra en mayor proporción en el cuerpo humano y en el experimento anterior fue el que mostró una mayor activación de la vía UPR. Se ha descrito un papel del estrés de RE en el desarrollo de DM2, y estas dos biomoléculas se han visto involucrados en el proceso, por ello en el experimento siguiente se utilizaron ambos estímulos para evaluar la activación de la vía UPR. En este experimento se comprobó una vez más lo descrito en la figura 1, la vía UPR se enciende con LPS, pero no disminuye la viabilidad celular. Los LPS no son suficientes para causar un daño grave en la fisiología celular. Sin embargo, cuando el estímulo va en conjunto con el ácido palmítico, la viabilidad disminuye de forma significativa (Figura 3). Al momento de tratar a las células con palmitato, la vía UPR se activa aún más (CHOP, c-Jun, ATF6α, XBP1s). Esto podría estar relacionado con el hecho que las células están en vía de salvamento, intentando recuperar la homeostasis a través de la vía UPR.

Los ácidos grasos insaturados pudieran prevenir o incluso revertir el daño generado por un exceso en AGS, como el ácido oleico (18:1n-9), que se ha visto mejora la sensibilidad a la

insulina [80, 81]. Al utilizar el ácido oleico observamos que no causa estrés de RE, ya que no activa la vía UPR ni disminuye la viabilidad celular, esto sucede hasta el momento de agregar palmítico como estímulo. De esta manera comprobamos que este ácido graso insaturado no afecta la fisiología de las células β. Por esto, en el siguiente experimento se utilizaron ambos ácidos grasos con diferentes tiempos de exposición. Aquí se describió que el ácido oleico pudiera tener un papel protector parcial ante los daños generados por el ácido palmítico; ya que al tener ambos estímulos no se activa la vía UPR ni se disminuye la viabilidad celular. También, con un tratamiento previo con palmitato (12 h) y posteriormente con ácido oleico (12 h) no se activó la vía UPR. Con esta información se puede proponer que el ácido oleico tiene un papel parcial de restaurador de daño. Una posibilidad, es que el ácido oleico y el ácido palmítico pudieran tener un fenómeno de competencia por receptores como el FFAR1, o el transportador CD36. Esto podría deberse a que el ácido oleico impida la incorporación del palmitato a las células, protegiendo a la célula del estrés de RE, y a su vez manteniendo la homeostasis, sin embargo, en nuestras mediciones no encontramos una modificación significativa en la acumulación de triglicéridos. En células INS-1 se demostró que CD36 facilita el transporte de ácidos grasos y su sobreexpresión afecta la secreción de insulina y el metabolismo de ácidos grasos aumentando su entrada y salida de la célula [101]. Siendo una posible explicación de los efectos lipotóxicos que causan los ácidos grasos sobre la liberación de insulina. Otra posible explicación es el aumento de chaperonas por el ácido oleico, mejorando la respuesta de las células β al estrés, mientras que el palmitato las disminuye [102], sin embargo experimentos adicionales son requeridos para comprobar esta propuesta.

Una vez más corroboramos el papel estresor del ácido palmítico a través de la activación de la vía UPR a las 36 h (ATF6α y disminución de BiP) (Figura 5). En esta ocasión evaluamos la PMCA, teniendo en cuenta que la entrada de Ca^{2+} es el detonante de la liberación de insulina. PMCA es una ATPasa encargada de bombear Ca^{2+} fuera de la célula [16]. Interesantemente,

nosotros observamos una disminución en la expresión de PMCA a las 36 h de exposición, que concuerda con una disminución en la secreción de insulina (Figura 5). Cabe mencionar que el anticuerpo utilizado reconoce primordialmente las isoformas 1 y 4, las cuales tienen una mayor expresión en las células β. Si PMCA se encarga de sacar Ca^{2+}, y el detonante de la liberación de insulina es el Ca^{2+}, se esperaría que la disminución de PMCA genere el efecto contrario. Esto pudiera deberse a otro mecanismo encargado del manejo del Ca^{2+} dentro de la célula β, como el intercambiador NCX1 que introduce tres iones de Na^{+} y exporta un ion de Ca^{2}, y la bomba SERCA que transporta Ca^{2+} del citoplasma al retículo sarcoplásmico. También, al estar encendida la vía UPR existe un estrés de RE, el cual pudiera ser originado por un fallo en el procesamiento de la insulina al haber una sobrecarga en el RE. Al no haber suficiente insulina lista para su liberación, la preproinsulina pudiera estarse acumulando en el RE, y por esto no ser liberada. No se puede descartar la lipotoxicidad causada por los ácidos grasos, generando un fallo en la expresión de PMCA que en periodos prolongados termine en la disminución de la secreción de insulina o en la disminución de la formación de los mismos gránulos.

También se estudió el efecto del ácido palmitoleico, el cual en un primer experimento no se observaron diferencias entre los efectos causados por el ácido oleico y palmitoleico. Un efecto estudiado del ácido palmitoleico es la inhibición de la apoptosis de células β humanas y la proliferación celular, contrarrestando los efectos del ácido palmítico [103]. Lo cual corroboramos en nuestro estudio bajo el tratamiento conjunto de estos dos ácidos grasos. Por otro lado, ya que el efecto de los LPS en células β no ha sido completamente dilucidado, con base en nuestros resultados se puede concluir que tienen un efecto relevante en el mecanismo de acción de los ácidos grasos, afectando el plegamiento proteico al encender la vía UPR. También, autores han propuesto su papel en la síntesis y secreción de insulina a través de la señalización de TLR4 que disminuye el mRNA de insulina, pero un papel directo de los LPS no se dilucidó [90].

En nuestros resultados encontramos que el ácido palmitoleico no causa lipotoxicidad (Figuras 6-9), pero, en combinación con palmítico y/o LPS logra disminuir la viabilidad celular (Figura 6), sin embargo, no se activa la vía UPR (CHOP, XBP1s, ATF6). Por otro lado, la liberación de insulina es estimulada por el ácido palmitoleico, la cual se encuentra disminuida significativamente con palmítico/LPS y se restaura al agregar oleico. Esto concuerda con los nitritos, que pudieran estar teniendo un efecto dañino a la célula β, por lo que se ve afectado el mecanismo de liberación de insulina. El daño causado por los nitritos también pudiera estar regulando las proteínas asociadas al estrés de RE y esto a su vez afectar la síntesis y liberación de insulina. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con los obtenidos en estudios previos [97], posiblemente los ácidos grasos estén generando un fallo en la vía del óxido nítrico. También el modificar la expresión de las bombas reguladoras del Ca^{2+} se bloquea la liberación de los gránulos de insulina de la primera fase de la GSIS. De forma interesante, acompañado de la disminución de la liberación de insulina por el estímulo palmítico/LPS se observó una disminución en la expresión de PMCA (Figura 7). La expresión de PMCA continuó disminuyendo aún más con palmitoleico/palmítico y palmitoleico/LPS, pero la secreción de insulina aumentó. Al estar disminuida la expresión de PMCA, el Ca^{2+} se acumularía dentro de la célula y esto detonaría la liberación de insulina. De la misma manera, también disminuyó la expresión del intercambiador NCX1 con palmitoleico, esto explicaría el aumento en la liberación de insulina, ya que PMCA ni NCX1 están sacando el Ca^{2+} y al medir la concentración de Ca^{2+} intracelular se encontraba aumentada con palmitoleico.

Un dato importante encontrado fue la detección de una segunda banda en el western blot de PMCA que se observó bajo el tratamiento de palmítico/LPS. Esto pudiera ser un indicio de un corte proteolítico por degradación, un signo de modificaciones oxidativas mediado por calpaínas y caspasas que pueden afectar la actividad de la ATPasa [98]. Este dato pudiera explicar la disminución en la expresión y posiblemente en la actividad de PMCA para bombear

el Ca^{2+}. Por otro lado, la concentración de Ca^{2+} intracelular disminuyó con ácido palmítico, sin embargo, no se observó un efecto en la liberación de insulina con este estímulo. La disminución de la [Ca^{2+}] citosólica pudiera causando apoptosis celular por la lipotoxicidad generada por el ácido palmítico, que concuerda con la disminución de la viabilidad celular. Esto pudiera ser un factor que contribuye al desarrollo de DM2. De manera interesante, con 10 h de tratamiento se observa un aumento en la [Ca^{2+}] intracelular con el ácido palmítico, pero con el ácido palmitoleico se observa el mismo efecto que a las 24 h (Anexo 1). Posiblemente el ácido palmítico en un inicio causa un aumento abrupto del Ca^{2+} y genere hiperinsulinemia que al llegar a una exposición prolongada (24 h) los mecanismos regulación del Ca^{2+} se encuentran afectados. La concentración de triglicéridos son otro factor que puede afectar la homeostasis celular, su acumulación celular puede llegar a regular mecanismos intracelulares. Un aumento ligero se registró con el estímulo de palmítico/LPS, que concuerda con la disminución en la liberación de insulina y en el aumento de nitritos. Estos datos pudieran ser una de las explicaciones del daño celular que cambia el efecto del palmítico en un efecto corto (10 h) y un efecto prolongado (24 h) como se observó experimentalmente.

Un efecto interesante fue en la secreción de insulina y la expresión de la ATPasa PMCA (Figura 8). Se observa una tendencia similar, sin embargo, el efecto del ácido oleico y del ácido palmitoleico es muy diferente en las células β, dando a entender que el doble enlace que tiene el palmitoleico hace la diferencia en el efecto de un ácido graso en el mecanismo de secreción de insulina. Interesantemente, bajo la combinación de ácido palmitoleico/palmítico/LPS, la expresión de CHOP es nula. Esto podría indicar que el ácido palmitoleico pudiera restaurar/prevenir el daño que causa el ácido palmítico en conjunto con LPS. El palmitoleico tiene un efecto contrario al palmítico en cuanto a la secreción de insulina, el palmitoleico disminuye la expresión de PMCA pero en este caso aumenta la secreción de insulina, este efecto es contrario con el ácido palmítico. Una posible explicación es la insaturación del

palmitoleico, que podría generar un papel restaurador de la secreción de insulina, al disminuir el estrés de RE y una sobreacumulación de la preproinsulina. Mientras que el palmítico afecta las membranas de los orgánulos generando estrés de RE ocasionando un fallo en la expresión y posiblemente en la actividad de PMCA. Por otro lado, la entrada de ácidos grasos a la célula β, a través de FFAR1 y CD36 ocasiona la liberación de insulina, pero en el caso del ácido palmítico y LPS la sobreexpresión de PMCA está disminuyendo la liberación de insulina. Posiblemente la sobreacumulación de Ca^{2+} citoplasmático libre dentro de la célula causada por los ácidos grasos ocasiona la sobreexpresión de PMCA, para regular el Ca^{2+} en exceso, y al intentar remediar el estrés, se disminuye la síntesis o secreción de insulina.

Un ácido graso saturado poco estudiado es el ácido esteárico (18C). Una diferencia importante con el ácido palmítico, es que en este caso después de 24 h de exposición el ácido esteárico por sí solo no causó estrés de RE y la viabilidad celular se mantuvo basal. Ambos ácidos grasos sólo difieren en dos carbonos, pero esta divergencia es relevante al activar la vía UPR. Al estar incorporado el ácido esteárico y el ácido palmitoleico se aumenta la viabilidad celular, esto indica una posible competencia entre ácidos grasos por el transportador de ácidos grasos, y a su vez posiblemente una β oxidación más activa que en conjunto tienen un papel benéfico para la célula β. Esto es una vez más corroborado a través de la expresión de PMCA y la liberación de insulina. Estando ambos ácidos grasos juntos se observa un aumento en la secreción de insulina, así como en la expresión de PMCA, indicando un efecto conjunto sobre el mecanismo de secreción de insulina, regulando a la ATPasa PMCA.

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró de manera experimental que todos los ácidos grasos estudiados ejercen un efecto diferencial sobre la fisiología de las células β, siendo el largo de la cadena hidrocarbonada un factor importante. El ácido palmítico fue el más perjudicial afectando la viabilidad celular y activando la vía UPR, así como su combinación con LPS. Esta combinación fue la que generó un mayor efecto negativo en todos los parámetros: disminuyó la liberación de insulina, promovió la degradación proteolítica de PMCA y aumentó los nitritos. Mientras que el ácido esteárico no generó un daño relevante, sólo disminuyó la secreción de insulina. De igual manera que el ácido palmítico, el ácido esteárico en combinación con LPS fue más citotóxico.

Uno de los puntos relevantes de nuestro estudio fue al incluir los ácidos grasos insaturados oleico y palmitoleico. Ninguno de los ácidos grasos (por sí solos) generó estrés de RE. De lo más significativo fue el papel parcial de restaurador de daño del ácido oleico cuando tienen un tratamiento previo con palmítico. El ácido palmitoleico sólo activa la vía UPR en conjunto con palmítico y/o LPS. El efecto del ácido oleico y del ácido palmitoleico es muy diferente en la liberación de insulina en las células β, sugiriendo que el doble enlace que tiene el palmitoleico hace la diferencia en el efecto de un ácido graso en este mecanismo.

De nuestros hallazgos más importantes, fueron los efectos del ácido oleico y palmitoleico sobre la secreción de insulina y la expresión de PMCA, en conjunto con el almacenamiento de Ca^{2+}. El ácido oleico tuvo la capacidad de restaurar la liberación de insulina, pero la expresión de PMCA y NCX1 se vio aumentada. Por otro lado, la expresión de PMCA y NCX1 disminuyó con palmitoleico/palmítico y palmitoleico/LPS, pero la secreción de insulina aumentó manteniendo los niveles de Ca^{2+} intracelular normales.

Con estos resultados podemos concluir que el ácido oleico tiene un papel restaurador del daño inducido por ácidos grasos saturados como el ácido palmítico, principalmente en la generación de estrés de RE. Mientras que el ácido palmitoleico mejora la liberación de insulina y tiene efectos más relevantes en la expresión de las bombas reguladoras del Ca^{2+} intracelular, que se ven afectadas por mecanismos como el estrés de RE, la acumulación de triglicéridos y el aumento en los nitritos.

10. PERSPECTIVAS

La repetición de algunos experimentos sería necesario para corroborar resultados obtenidos en este estudio. La cuantificación del mRNA de la insulina y *Pdx1* mediante RT-PCR en tiempo real sería un método ideal para comprobar la acumulación de esta proteína que genera estrés de RE. Acompañado de esto, la medición de isoformas de PMCA(1-4) por medio de western blot y RT-PCR en tiempo real para concretar la isoforma que se ve mayormente afectada por estímulos de ácidos grasos. También relacionado con PMCA, medir la actividad enzimática de esta ATPasa, ya que lo que demostramos nosotros fue expresión proteica, pero esto no indica que tanta actividad está teniendo la bomba. Para concretar la parte del estrés de RE y nitritos, la utilización de sondas fluorescentes que tienen la capacidad de detectar el daño celular mediante microscopía confocal.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Remedi, M.S. and C. Emfinger, *Pancreatic beta-cell identity in diabetes.* Diabetes Obes Metab, 2016. **18 Suppl 1**: p. 110-6.
2. IDF. *Diabetes Atlas*. International Diabetes Federation 2017; 8th [Available from: www.diabetesatlas.org.
3. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.* Diabetes Care, 2007. **30**(suppl 1): p. S42-S47.
4. Ashcroft, F.M. and P. Rorsman, *Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years.* Cell, 2012. **148**(6): p. 1160-71.
5. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes.* J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1111-9.
6. Leto, D. and A.R. Saltiel, *Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(6): p. 383-96.
7. Seino, S., T. Shibasaki, and K. Minami, *Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes.* J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2118-25.
8. Konner, A.C., et al., *Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production.* Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 438-49.
9. Scheuner, D. and R.J. Kaufman, *The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes.* Endocr Rev, 2008. **29**(3): p. 317-33.
10. Rorsman, P. and E. Renstrom, *Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells.* Diabetologia, 2003. **46**(8): p. 1029-45.
11. Schuit, F.C., P.A. In't Veld, and D.G. Pipeleers, *Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependent recruitment of pancreatic beta cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(11): p. 3865-9.
12. Hasnain, S.Z., J.B. Prins, and M.A. McGuckin, *Oxidative and endoplasmic reticulum stress in beta-cell dysfunction in diabetes.* J Mol Endocrinol, 2016. **56**(2): p. R33-54.
13. Uldry, M. and B. Thorens, *The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters.* Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 480-9.
14. Jensen, M.V., et al., *Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(6): p. E1287-97.
15. Bratanova-Tochkova, T.K., et al., *Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion.* Diabetes, 2002. **51 Suppl 1**: p. S83-90.
16. Herchuelz, A., et al., *Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca2+-ATPase in beta cell function and death.* Ann N Y Acad Sci, 2007. **1099**: p. 456-67.
17. Bruce, J.I.E., *Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival.* Cell Calcium, 2018. **69**: p. 28-36.
18. Carafoli, E., *Calcium pump of the plasma membrane.* Physiol Rev, 1991. **71**(1): p. 129-53.
19. Brini, M. and E. Carafoli, *The plasma membrane Ca(2)+ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(2).
20. Cunha, D.A., et al., *Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells.* J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 14): p. 2308-18.
21. Melloul, D., S. Marshak, and E. Cerasi, *Regulation of insulin gene transcription.* Diabetologia, 2002. **45**(3): p. 309-26.
22. Poitout, V., et al., *Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids.* J Nutr, 2006. **136**(4): p. 873-6.
23. Ma, Y. and L.M. Hendershot, *ER chaperone functions during normal and stress conditions.* J Chem Neuroanat, 2004. **28**(1-2): p. 51-65.
24. Gass, J.N., et al., *Stressed-out B cells? Plasma-cell differentiation and the unfolded protein response.* Trends Immunol, 2004. **25**(1): p. 17-24.
25. Walter, P. and D. Ron, *The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation.* Science, 2011. **334**(6059): p. 1081-6.
26. Schuck, S., et al., *Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response.* J Cell Biol, 2009. **187**(4): p. 525-36.

27. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 519-29.
28. Mori, K., *Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals.* J Biochem, 2009. **146**(6): p. 743-50.
29. Fonseca, S.G., J. Gromada, and F. Urano, *Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta-cell death.* Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(7): p. 266-74.
30. McCracken, A.A. and J.L. Brodsky, *Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD).* Bioessays, 2003. **25**(9): p. 868-77.
31. Bertolotti, A., et al., *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(6): p. 326-32.
32. Shen, J., et al., *ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals.* Dev Cell, 2002. **3**(1): p. 99-111.
33. Zhang, K., et al., *Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response.* Cell, 2006. **124**(3): p. 587-99.
34. Rutkowski, D.T., et al., *Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins.* PLoS Biol, 2006. **4**(11): p. e374.
35. Cox, J.S., C.E. Shamu, and P. Walter, *Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase.* Cell, 1993. **73**(6): p. 1197-206.
36. Calfon, M., et al., *IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA.* Nature, 2002. **415**(6867): p. 92-6.
37. Poothong, J., W. Tirasophon, and R.J. Kaufman, *Functional analysis of the mammalian RNA ligase for IRE1 in the unfolded protein response.* Biosci Rep, 2017. **37**(2).
38. Reimold, A.M., et al., *Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1.* Nature, 2001. **412**(6844): p. 300-7.
39. Fuest, M., et al., *The transcription factor c-Jun protects against sustained hepatic endoplasmic reticulum stress thereby promoting hepatocyte survival.* Hepatology, 2012. **55**(2): p. 408-18.
40. Zhao, P., et al., *c-Jun inhibits thapsigargin-induced ER stress through up-regulation of DSCR1/Adapt78.* Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(10): p. 1289-300.
41. Yoshida, H., et al., *A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response.* Dev Cell, 2003. **4**(2): p. 265-71.
42. Oda, Y., et al., *Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation.* J Cell Biol, 2006. **172**(3): p. 383-93.
43. Hollien, J. and J.S. Weissman, *Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response.* Science, 2006. **313**(5783): p. 104-7.
44. Pirot, P., et al., *Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs.* Diabetologia, 2007. **50**(5): p. 1006-14.
45. Harding, H.P., Y. Zhang, and D. Ron, *Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase.* Nature, 1999. **397**(6716): p. 271-4.
46. Harding, H.P., et al., *Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells.* Mol Cell, 2000. **6**(5): p. 1099-108.
47. Marciniak, S.J., et al., *CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum.* Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3066-77.
48. Tsaytler, P., et al., *Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis.* Science, 2011. **332**(6025): p. 91-4.
49. Haze, K., et al., *Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress.* Mol Biol Cell, 1999. **10**(11): p. 3787-99.
50. Ye, J., et al., *ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs.* Mol Cell, 2000. **6**(6): p. 1355-64.
51. Wu, J., et al., *ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress.* Dev Cell, 2007. **13**(3): p. 351-64.
52. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11041-8.

53. Cnop, M., et al., *Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis.* J Biol Chem, 2007. **282**(6): p. 3989-97.
54. Oslowski, C.M. and F. Urano, *The binary switch between life and death of endoplasmic reticulum-stressed beta cells.* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2010. **17**(2): p. 107-12.
55. Szegezdi, E., et al., *Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis.* EMBO Rep, 2006. **7**(9): p. 880-5.
56. Mensink, R.P., et al., *Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials.* Am J Clin Nutr, 2003. **77**(5): p. 1146-55.
57. Lopez-Garcia, E., et al., *Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction.* J Nutr, 2005. **135**(3): p. 562-6.
58. Sun, Q., et al., *A prospective study of trans fatty acids in erythrocytes and risk of coronary heart disease.* Circulation, 2007. **115**(14): p. 1858-65.
59. Harding, H.P., et al., *Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk-/- mice reveals a role for translational control in secretory cell survival.* Mol Cell, 2001. **7**(6): p. 1153-63.
60. Oyadomari, S., et al., *Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes.* J Clin Invest, 2002. **109**(4): p. 525-32.
61. Oyadomari, S., et al., *Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10845-50.
62. Scheuner, D., et al., *Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis.* Mol Cell, 2001. **7**(6): p. 1165-76.
63. Unger, R.H., *Lipotoxic diseases.* Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 319-36.
64. Shinjo, S., et al., *Comparative analysis of the expression patterns of UPR-target genes caused by UPR-inducing compounds.* Biosci Biotechnol Biochem, 2013. **77**(4): p. 729-35.
65. Huang, C.J., et al., *High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes.* Diabetes, 2007. **56**(8): p. 2016-27.
66. Laybutt, D.R., et al., *Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes.* Diabetologia, 2007. **50**(4): p. 752-63.
67. Marchetti, P., et al., *The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients.* Diabetologia, 2007. **50**(12): p. 2486-94.
68. Cardozo, A.K., et al., *Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca2+ ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca2+, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells.* Diabetes, 2005. **54**(2): p. 452-61.
69. Hara, T., et al., *Calcium efflux from the endoplasmic reticulum leads to beta-cell death.* Endocrinology, 2014. **155**(3): p. 758-68.
70. Boslem, E., et al., *A lipidomic screen of palmitate-treated MIN6 beta-cells links sphingolipid metabolites with endoplasmic reticulum (ER) stress and impaired protein trafficking.* Biochem J, 2011. **435**(1): p. 267-76.
71. Petremand, J., et al., *HDLs protect pancreatic beta-cells against ER stress by restoring protein folding and trafficking.* Diabetes, 2012. **61**(5): p. 1100-11.
72. Preston, A.M., et al., *Reduced endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi protein trafficking contributes to ER stress in lipotoxic mouse beta cells by promoting protein overload.* Diabetologia, 2009. **52**(11): p. 2369-73.
73. Veret, J., et al., *Role of palmitate-induced sphingoid base-1-phosphate biosynthesis in INS-1 beta-cell survival.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(2): p. 251-62.
74. Karaskov, E., et al., *Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis.* Endocrinology, 2006. **147**(7): p. 3398-407.
75. Oyadomari, S. and M. Mori, *Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress.* Cell Death Differ, 2004. **11**(4): p. 381-9.
76. Kitiphongspattana, K., et al., *Proteasome inhibition alters glucose-stimulated (pro)insulin secretion and turnover in pancreatic {beta}-cells.* J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 15727-34.

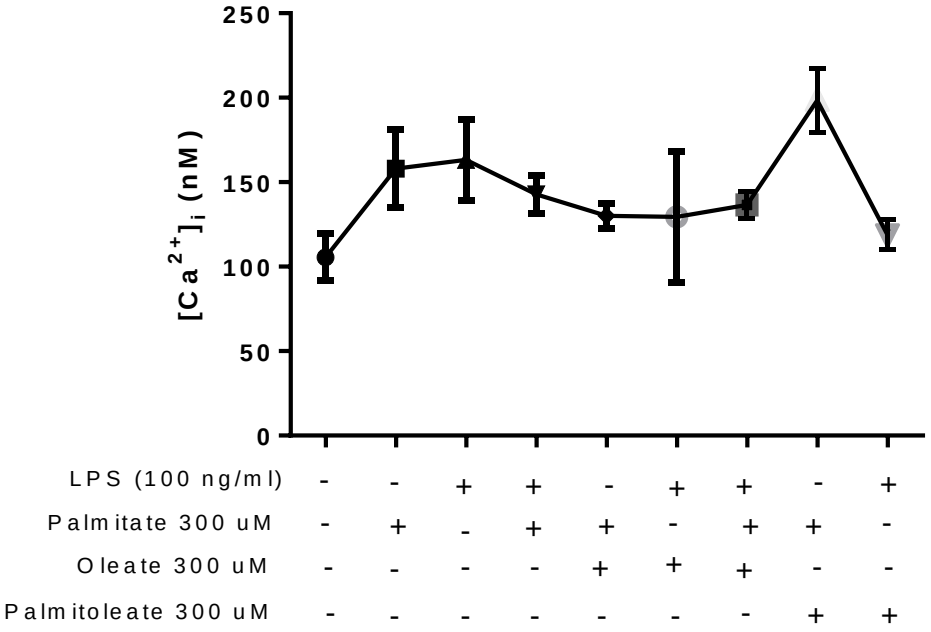
77. Gwiazda, K.S., et al., *Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca2+ homeostasis in beta-cells.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(4): p. E690-701.
78. Hu, F.B., R.M. van Dam, and S. Liu, *Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate.* Diabetologia, 2001. **44**(7): p. 805-17.
79. Vessby, B., et al., *Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study.* Diabetologia, 2001. **44**(3): p. 312-9.
80. Parillo, M., et al., *A high-monounsaturated-fat/low-carbohydrate diet improves peripheral insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic patients.* Metabolism, 1992. **41**(12): p. 1373-8.
81. Ryan, M., et al., *Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity.* QJM, 2000. **93**(2): p. 85-91.
82. Berry, E.M., *Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus.* Am J Clin Nutr, 1997. **66**(4 Suppl): p. 991S-997S.
83. Salvado, L., et al., *Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism.* Diabetologia, 2013. **56**(6): p. 1372-82.
84. Carlsson, C., L.A. Borg, and N. Welsh, *Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro.* Endocrinology, 1999. **140**(8): p. 3422-8.
85. Maestre, I., et al., *Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1.* Endocrinology, 2003. **144**(1): p. 335-45.
86. Piro, S., et al., *Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress.* Metabolism, 2002. **51**(10): p. 1340-7.
87. Shimabukuro, M., et al., *Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2498-502.
88. Zuany-Amorim, C., J. Hastewell, and C. Walker, *Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases.* Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(10): p. 797-807.
89. Vives-Pi, M., et al., *Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells.* Clin Exp Immunol, 2003. **133**(2): p. 208-18.
90. Amyot, J., et al., *Lipopolysaccharides impair insulin gene expression in isolated islets of Langerhans via Toll-Like Receptor-4 and NF-kappaB signalling.* PLoS One, 2012. **7**(4): p. e36200.
91. Larsen, N., et al., *Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults.* PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9085.
92. Cani, P.D. and N.M. Delzenne, *Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007. **10**(6): p. 729-34.
93. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.* J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 3015-25.
94. Patel, A., et al., *Measurement of [Ca(2)(+)]i in whole cell suspensions using Fura-2.* Methods Mol Biol, 2013. **937**: p. 37-47.
95. Savage, K.E. and P.S. Baur, *Effect of tunicamycin, an inhibitor of protein glycosylation, on division of tumour cells in vitro.* J Cell Sci, 1983. **64**: p. 295-306.
96. Goncalves-de-Albuquerque, C.F., et al., *Omega-9 Oleic Acid Induces Fatty Acid Oxidation and Decreases Organ Dysfunction and Mortality in Experimental Sepsis.* PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0153607.
97. Smukler, S.R., et al., *Exogenous nitric oxide and endogenous glucose-stimulated beta-cell nitric oxide augment insulin release.* Diabetes, 2002. **51**(12): p. 3450-60.
98. Zaidi, A., *Plasma membrane Ca-ATPases: Targets of oxidative stress in brain aging and neurodegeneration.* World J Biol Chem, 2010. **1**(9): p. 271-80.
99. Garay-Malpartida, H.M., et al., *Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in human and murine pancreatic beta-cells affects cell viability and insulin homeostasis.* BMC Immunol, 2011. **12**: p. 18.
100. Martinon, F., et al., *TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages.* Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 411-8.

101. Wallin, T., et al., *Facilitation of fatty acid uptake by CD36 in insulin-producing cells reduces fatty-acid-induced insulin secretion and glucose regulation of fatty acid oxidation.* Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(2): p. 191-7.
102. Sargsyan, E., et al., *Oleate protects beta-cells from the toxic effect of palmitate by activating pro-survival pathways of the ER stress response.* Biochim Biophys Acta, 2016. **1861**(9 Pt A): p. 1151-60.
103. Maedler, K., et al., *Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function.* Diabetes, 2001. **50**(1): p. 69-76.

12. ANEXOS

Anexo 1. Imagen suplementaria

Medición de la concentración de Ca^{2+} intracelular posterior a 10 h con el tratamiento correspondiente.



Anexo 2. Publicación experimental en proceso.

Differential regulation of fatty acid metabolism on Ca^{2+} control and their impact on insulin secretion.

Diabetes mellitus type 2 (DM2) is a metabolic disorder characterized by pancreatic β cell disfunction and progressive loss, which are responsible for the synthesis and secretion of insulin, resulting in organ damage and multiple long-term complications. Continuous decay of beta cell function, impaired glucose-stimulated insulin secretion, decrease of beta cells and increase in apoptosis have been reported in human pancreatic islets with DM2. An increase in intracellular Ca^{2+} triggers insulin granules release in pancreatic beta cells. Several mechanisms regulate Ca^{2+} efflux and influx within the cell, such as the plasma membrane Ca^{2+}-ATPase (PMCA) and the sodium-calcium exchanger (NCX1). PMCA and NCX1 show a fundamental role in the beta cell, given that both contribute to Ca^{2+} extrusion, and therefore to the regulation of insulin granules release. Likewise, lipotoxicity has been corelated with endoplasmic reticulum (ER) stress by activation of the unfolded protein response (UPR). This condition affects beta cell physiology by altering insulin secretion mechanism which contributes to DM2 development. Pancreatic beta cells dysfunction in DM2 has been associated with a condition of low-grade inflammation and lipopolysaccharides (LPS). However, there are no studies that connect the effects of LPS and fatty acids upon UPR pathway in pancreatic beta cells. Our findings demonstrate an alteration in PMCA expression caused by saturated fatty acids such as palmitic acid (16C) which directly affects insulin release and contribute to beta cell mass reduction. Nonetheless, stearic acid (18C) does not have these effects. Palmitic acid was the most cytotoxic of all fatty acids studied by activating UPR pathway and increasing reactive nitrogen species, this effect was enhanced by LPS treatment. This combination also promoted the decrease of insulin secretion and favored the proteolytic degradation of PMCA. We also propose a protective role for monounsaturated fatty acids, oleic and palmitoleic acid. Oleic acid recovered cell viability after treatment with palmitic acid and more interestingly relieved ER stress. While palmitoleic acid improved the insulin release and has more relevant effects on the expression of regulatory pumps of intracellular Ca2+. Thus, a differential role of free fatty acids was described, where chain length and number and positions of double bonds marked the difference in the effect of each one of them on beta cell physiology.

Anexo 3. Publicación: Effects of Dietary Fatty Acids in Pancreatic Beta Cell Metabolism, Implications in Homeostasis. Acosta-Montaño, P.; García-González, V. *Nutrients* 2018, 10, 393.

nutrients

MDPI

Review

Effects of Dietary Fatty Acids in Pancreatic Beta Cell Metabolism, Implications in Homeostasis

Paloma Acosta-Montaño and Víctor García-González *

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21000, Mexico; paloma.acosta@uabc.edu.mx

* Correspondence: vgarcia62@uabc.edu.mx; Tel.: +52-1-686-557-1622 (ext. 121); Fax: +52-1-686-557-1622 (ext. 109)

Received: 10 January 2018; Accepted: 13 March 2018; Published: 22 March 2018

Abstract: Fatty acids are involved in several metabolic processes, including the development of metabolic and cardiovascular diseases. In recent years a disease that has received escalated interest is type 2 diabetes (T2D). Many contributing factors including a high-caloric diet rich in dietary saturated fats have been broadly characterized as triggers of T2D. Insulin resistance resulting from a high saturated fat diet leads to alterations in lipid cellular intake and accumulation which generate lipotoxic conditions, a key phenomenon in the metabolism of β-cells. Alternatively, unsaturated fatty acids have been described to show opposite effects in pancreatic β-cells. The purpose of this work is to perform a critical analysis of the complex role of saturated and unsaturated fatty acids in β-cell metabolism. We discuss the diverse effects main dietary fatty acids have upon pancreatic β-cell metabolism as a key factor to maintain homeostasis by focusing in the cellular and molecular mechanisms involved in the development and progression of T2D. For instance, modifications in protein homeostasis as well as the intracellular management of lipid metabolism which are associated with inflammatory pathways. These conditions initiate critical metabolic rearrangements, that in turn have repercussions on insulin β-cell metabolism. This review allows an integral and broad understanding of different functions of fatty acids inside β-cells, being important metabolites for novel therapeutic targets in T2D treatment.

Keywords: fatty acids; type 2 diabetes; lipotoxicity; homeostasis

1. Introduction

Fatty acids (FAs) are essential components of the human diet and are obtained from two main sources: animals and plants. The difference lies in the FA composition. Animal fats are rich in saturated fatty acids (SFAs), whereas lipids obtained from plants contain unsaturated fatty acids (UFAs), that can be classified as mono (MUFAs) or polyunsaturated (PUFAs) [1]. Several studies associate dietary FAs with prevention and progression of non-transmissible chronic diseases such as type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular diseases [2]. The study of these pathologies is relevant because said pathologies form part of the main causes of death. According to the World Health Organization, in 2015 the main causes of death were ischemic heart disease and stroke, which together reported 15 million deaths around the world. These diseases have remained the leading causes of death globally since 2000. T2D was listed as the sixth main cause of death accounting for 1.58 million lives [3]. The International Diabetes Federation calculated approximately 4 million deaths from diabetes in 2017 and estimated 425 million adults with diabetes worldwide. This means that 1 out of every 11 adults has diabetes [4], of which the most common type is T2D accounting for around 90–95% of all cases [5]. Furthermore, an additional 352 million adults have impaired glucose tolerance. Added to the original 425 million adults diagnosed with diabetes, this has a cost of nearly 727 billion dollars worldwide in patients between 20 and 79 years old. For instance, Mexico

is the second Latin American country and fifth in the world in prevalence of diabetes with nearly 12 million patients [4]. Due to all of this, diabetes has become a major public health problem internationally.

T2D is the main type of diabetes and its complex etiology combines environmental and genetic factors. This disease is a result of a high demand of insulin synthesis in pancreatic β-cells caused by hypercaloric diets and lifestyle conditions such as the lack of physical activity which produces insulin resistance in the liver and insulin-dependent tissues including adipose tissue and muscle. Pancreatic β-cells are capable of sensing glucose fluctuations and in response release insulin, a hormone that is responsible for stimulating glucose uptake in the muscle and adipose tissue normalizing plasmatic glucose [6]. It is estimated that upon receiving a glucose stimulus, the endoplasmic reticulum (ER) of each β-cell synthetizes close to one million insulin molecules per minute packed in small granules. Each β-cell contains approximately 10,000 granules, of which only 0.14%/min (first phase) and 0.05%/min (second phase) is released upon stimuli [7–9]. The phenomenon of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) is biphasic. The first phase results from the triggering of ATP-sensitive K^+ channel-dependent that increases cytoplasmic Ca^{2+} and discharges from a readily releasable pool of granules that are in contact with the plasma membrane [10]. The release rate of this first phase is around 15 granules per minute lasting between 5 and 10 min for each β-cell [7]. The second phase entails the preparation, translocation and priming of granules (reserve pool) for release, also triggered by elevated intracellular Ca^{2+} levels given by the K^+(ATP) channel-dependent pathway [10]. In this second phase, the release rate decreases to five granules per minute [7].

An increase in protein load for insulin synthesis in β-cells due to hyperglycemic conditions can result in β-cell expansion and generate hyperinsulinemia as a compensatory mechanism. However, this process gradually leads to β-cell mass loss, generating ER stress [11]. Conditions that disrupt metabolic homeostasis cause distension of ER cisterns, affecting protein folding [12] and alteration of post-translational modifications. As a result, the ER generates an adaptive response known as the unfolded protein response (UPR). This pathway consists of three major signaling transducers initiated by protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), activating transcription factor 6 (ATF6) and a serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease the inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), which function as sensors of alterations in the load of misfolded proteins in the ER lumen [13]. This pathway as a whole is responsible for enhancing folding capacity by increasing the production of chaperones and enzymes of protein maturation [8]. This phenomenon is followed by the reduction of the ER overload by decreasing mRNA translation and improving mRNA degradation by an increase of ER-associated degradation proteins and components of autophagy to promote elimination of unfolded and aggregated proteins [14]. The UPR pathway is critical, since it is part of the cellular response to modulate general cell homeostasis [15] by regulating insulin synthesis and consequently plasmatic glucose as well as the energetic metabolism.

Importantly, chronic exposure to high levels of free fatty acids (FFAs) leads to lipotoxicity [16]. In high-fat diets, adipose tissue storage capacity for triacyclglycerols (TAGs) can be overloaded. Lipotoxicity describes the deleterious effects that lipid accumulation can cause in peripheral tissues. This condition has been recognized as a contributing factor to the development of T2D, characterized by the loss of β-cells functionality that eventually leads to cellular apoptosis. This phenomenon is described as lipoapoptosis [17].

Evidence suggests FFAs play a specific role in β-cells, however, some mechanisms by which FFAs exert their harmful or even beneficial effects remain to be elucidated. Furthermore, the properties of each FFA provide particular functions in β-cells, such as chain length, number or position of double bonds, affinity and interaction with other FFAs as well as with the cell itself. In this review, we describe the impact that FFAs have on β-cells homeostasis focusing on their metabolism and molecular effects.

2. Fatty Acids Properties

SFAs have been associated with adverse health effects, including palmitic acid (16:0, PA), myristic acid (14:0, MA) and stearic acid (18:0, SA). Palmitic acid is the most common saturated fatty acid found in the human body, representing 20–30% of total FAs in membrane phospholipids and adipose tissue TAGs, and on

average a 70 kg man is made up of 3.5 kg of PA [18], with an intake of approximately 20–30 g/day [19]. Palmitate can be obtained in the diet or synthesized endogenously from fatty acids, carbohydrates and amino acid metabolism. It is a major component of palm oil (44% of total fats), and can also be found in meat and dairy products (50–60% of total fats), as well as cocoa butter (26%) and olive oil (8–20%) [20].

On the other hand, UFAs are generally related to protective effects, like preventing β-cell apoptosis, regulating plasmatic glucose concentrations and enhancing insulin sensitivity, and can be classified into MUFAs and PUFAs. The first ones include oleic (18:1, OA) and palmitoleic acid (16:1, PAO), and can be found in several animal and vegetable oils. Also, it can be obtained from the regulation of palmitate accumulation, which under normal physiological conditions is prevented by enhanced Δ^9 desaturation to PAO and/or elongation to stearic acid, and further Δ^9 desaturation to OA [20]. PUFAs are hydrocarbon chains with two or more double bonds located along the chain (Figure 1) [2]. Depending in the location of the first double bond and according to the methyl group, UFAs are classified as n-6 or n-3. α-Linolenic acid (ALA; 18: 3n-3) initiates n-3 PUFA, an essential FA found in leafy vegetables, nuts, soybeans, flaxseed, chia and vegetable oils. Linoleic acid (LA; 18: 2n-6) is the precursor of n-6 PUFA, also an essential FA that cannot be synthesized by mammals, found in vegetable oils, seeds and nuts. Both fatty acids, linoleic and linolenic, are metabolized through desaturation and elongation reactions. LA is metabolized into arachidonic acid (AA; 20: 4n-6); while ALA in eicosapentaenoic acid (EPA; 20: 5n-3) and, finally, in docosahexaenoic acid (DHA; 22: 6n-3) (Figure 1) [2]. Importantly, EPA and DHA are obtained from fish and fish oil supplements, as well as other marine products [21], as a result of plankton and algae consumption [22].

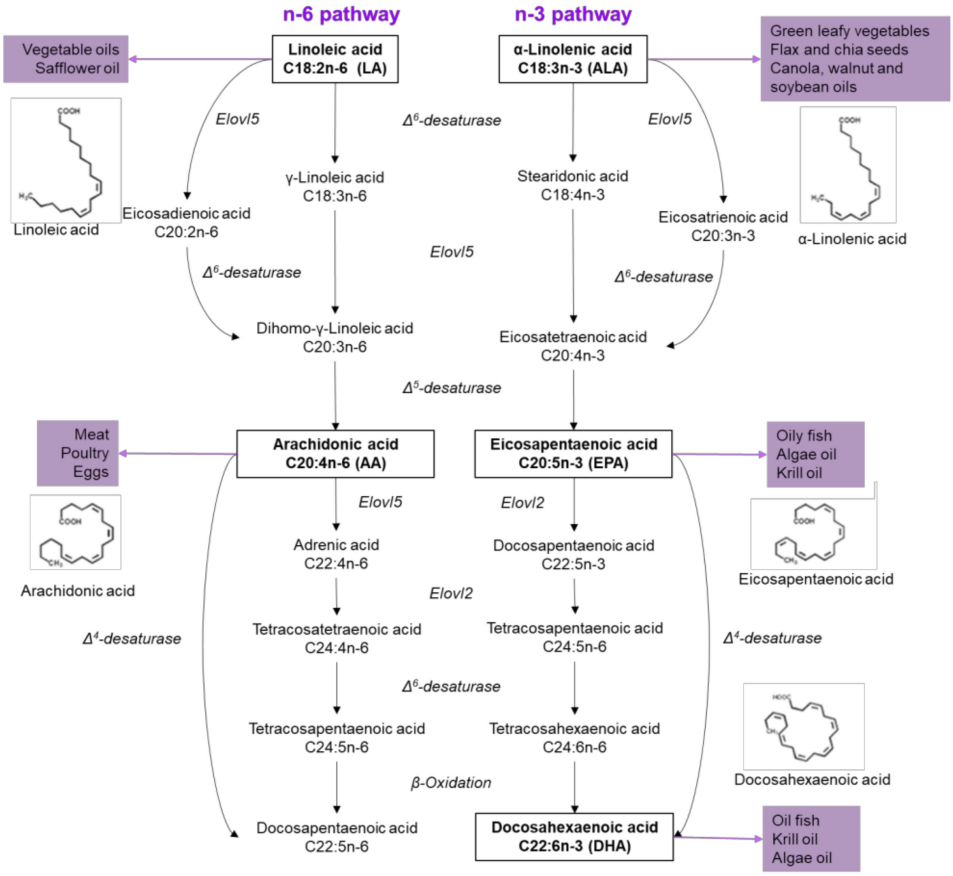


Figure 1. Sources and metabolism of n-6 and n-3 fatty acids. On the left side, the pathway of n-6 FA is described, which begins with linoleic acid to generate arachidonic acid through the enzyme Δ^5-desaturase. On the right side, the n-3 FA pathway starts with linolenic acid and eicosapentaenoic acid is obtained through two steps, competing for the Δ^5-desaturase enzyme in n-6 pathway. Subsequently, docosahexaenoic acid is generated by four consequent reactions.

3. Fatty Acid Metabolism in β-Cells

Humans can synthesize SFAs and de novo MUFAs, however, we lack the enzymes to incorporate a double bond at position n-3 or n-6 of the fatty acid [22]; consequently, they are considered essentials. ALA and LA have a common metabolic pathway, therefore, competing for enzymes such as Elovl5, an elongase, and for the Δ^6-desaturase (D6D) (Figure 1) [23]. However, D6D activity is higher in n-3 than in n-6 PUFAS, suggesting n-3 PUFAs are more rapidly synthesized than n-6 PUFAs, since both substrates (ALA and LA) compete for active sites on D6D. ALA is also the preferred substrate due to an affinity two to three times higher for ALA than of LA [24,25]. Ingested PUFAS could have several metabolic fates, including β-oxidation, carbon recycling and direct incorporation into structural lipids [26].

Several studies show that β-oxidation normally consumes the majority of linoleate and α-linolenate intake, accounting for 65–85% of their intake, rising up to 100% during energy deficit; besides, PUFAs are more easily β-oxidized than saturated, as seen in hepatocytes and neonatal metabolism [27,28]. Also, LA and ALA normally accumulate in skin, muscle and adipose tissue, but LA tissue concentration is higher in the liver [29]. However, significant components of the carbon backbone from LA and ALA that are not completely β-oxidized are incorporated into newly synthesized cholesterol or fatty acids through acetyl CoA or acetoacetate [29,30]. Nonetheless, studies are needed to elucidate n-6 PUFA metabolism in β-cells.

Under fasting conditions, fatty acids are the main source of endogenous energy in β-cells [31]. These cells have a low glycogen reserve; almost all glucose entering the β-cell is oxidized via glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation to ATP, only <10% of glucose uptake accounts for glycogen synthesis [32]. Also, these cells maintain high levels of oxygen consumption in the absence of glucose [33]. In a state where glycemia is below basal levels, fatty acids are converted by acyl-CoA synthetase (ACS) into long-chain acyl-CoA and enter the mitochondria for β-oxidation for energy production [33]. An increase in glycemia, usually after a meal, decreases fatty acid oxidation, increasing the catabolism of glucose [34]. Glucose metabolism causes an increase in intracellular levels of long chain acyl-CoA [35], augmentation of the conversion of glucose to malonyl-CoA, promotion of nutrient storage [36] and an inhibition of CPT-1, hence, blocking the oxidation of fatty acids [33]. Low levels of de novo fatty acid synthesis within the β-cell indicates malonyl-CoA is been used as a "switch" metabolite, instead of a precursor (Figure 2) [33].

Internalization of FAs into cells is vital for cellular metabolism, including their incorporation into the phospholipids of plasmatic and specific organelle membranes [37]. Glucose and amino acids are known to cross the plasma membrane via transmembrane transport proteins [38]. Exogenous FAs enter the cell primarily by facilitated transport [39] mediated by plasma membrane fatty acid-binding proteins (FABPs) (Figure 2), which facilitate the dissociation of fatty acids from albumin [40]. A fatty acid transporter, CD36, with high affinity for long chain fatty acids [41] has been identified in the plasma membrane of muscle, liver and platelet cells [42,43]; indeed, expression has been demonstrated in human pancreatic cells [39]. Upon fatty acid entry, cytoplasmic FABPs bind one fatty acid molecule at a time and transports lipids to specific compartments in the cell [44]. In INS-1 cells, CD36 facilitates FA transport and overexpression induces effects on insulin secretion and FA metabolism, increasing entry and release in β-cells [43].

Recently, expression of a G-protein-coupled receptor (GPCR) specific for medium and long chain saturated FAs, and unsaturated fatty acids, GPR40/FFAR1, was identified, which is expressed almost exclusively in the pancreas (Figure 2) [45,46]. As a GPCR, the binding of FAs to the receptor activates a pathway aiming to activate PKC, and under glucose stimulus in a postprandial state generates oscillations in intracellular Ca^{2+} to stimulate insulin granule release [47]. A study with MIN6 cells showed that FFAR1 regulates the acute potentiation of GSIS induced by palmitate, and the inhibition of FFAR1 during a prolonged exposure with palmitate decreases FA oxidation and positively regulates β-cell function. Therefore, a regulatory effect of the FFAR1 signaling pathway when mediating the deleterious effects triggered by fatty acids is present [48]. Also, studies in GPR40/FFAR1-deficient

mice confirmed a role for FFAs in the amplification of insulin secretion; these mice did not develop hyperinsulinemia nor glucose intolerance when given a high-fat diet, since this deficiency protected from the harmful metabolic effects of high-fat feeding [49]. Additionally, downregulation of FFAR1 by RNAi caused impaired FA augmentation of insulin secretion [46]. FFAR1 deficiency protected from hepatic steatosis and hypertriglyceridemia and FFAR1 overexpression led to liver steatosis and, subsequently, impairment of islet function and diabetes [49]. Whether FFAR1 plays a role in β-cell compensation processes and is a possible link between energy surplus and β-cell failure in type 2 diabetes remains to be completely characterized [36].

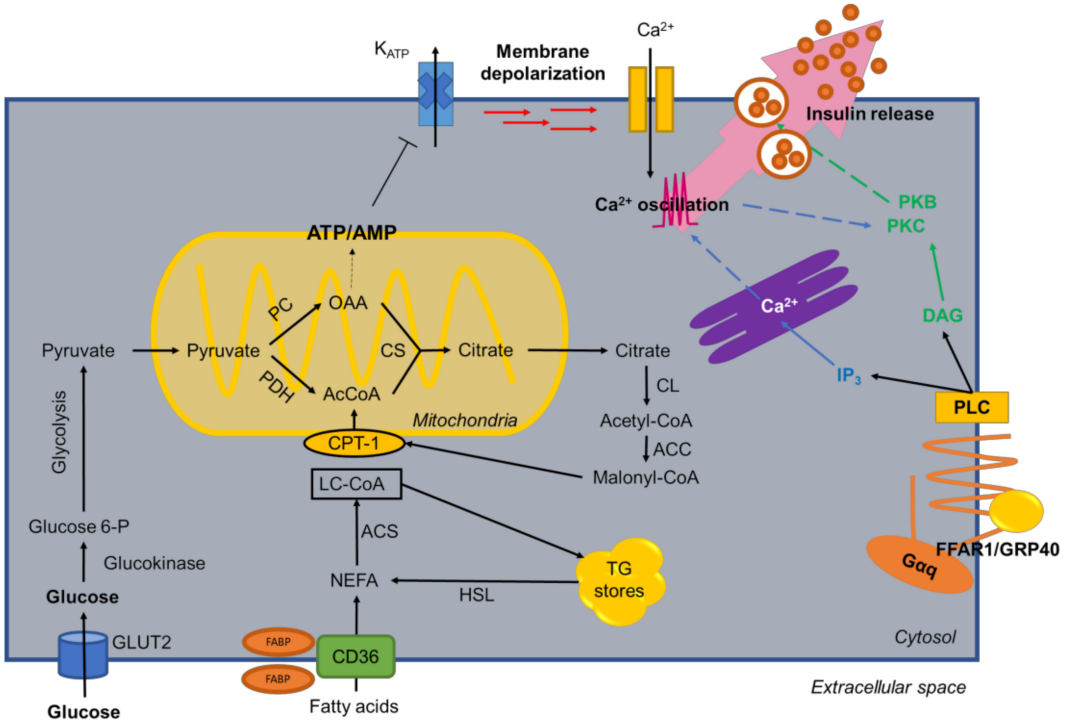


Figure 2. General metabolism of fatty acids in β-cells. The main metabolic pathways of FFAs are outlined in the figure, such as glycolysis, FA biosynthesis, β-oxidation. Glycolysis produces an increase in ATP, which closes K(ATP)-dependent channels and causes membrane depolarization and the opening of voltage-dependent Ca^{2+} channels, stimulating insulin release. Also, the binding of fatty acids to free fatty acid receptor 1 (FFAR1) generates changes of Ca^{2+} in ER lumen promoting insulin release in β-cell.

High levels of FFAs have been proposed as a determinant factor in β-cells apoptosis in different models [50]. Also, recent studies suggest this phenomenon depends on the degree of fatty acid saturation, rather than chain length, in addition to being considered a contributing factor for T2D evolution in patients with obesity [51]. In β-cells, prolonged exposure to high concentrations of long chain FFAs leads to the inhibition of insulin biosynthesis [52] and secretion [53]. Also, palmitic acid inhibits the expression of transcription factor PDX-1 by decreasing DNA binding activity, GLUT-2 transporter [54] and the enzyme acetyl-CoA carboxylase (ACC) expression [31], while increasing the expression of CPT-I [55]. The islet transcription factor PDX-1 was originally discovered as an activator of the insulin and somatostatin genes [56]. Moreover, PDX-1 plays a key role in pancreatic development, regulates transcription of GLUT2 and glucokinase. Mutations in PDX-1 lead to abnormalities in islet function and diabetes in humans and mice [57]. In the PDX-1 heterozygote mouse model and in non-diabetic humans with a mutation in one PDX-1 allele, fasting blood glucose is normal, but there is impairment in insulin secretion and glucose clearance after glucose stimuli [58,59]. Also, PDX-1 heterozygotes mice showed decreased insulin secretion, caused by the inability of the PDX-1 heterozygotes to respond to extracellular glucose, explained by the dramatically reduced

expression of glucose transporter GLUT2 [58]. Altogether, these conditions cause an imbalance in the metabolism of the β-cell, generating greater fatty acid accumulation which affects insulin secretion, which is an important factor in the development of diabetes.

4. Effects of Saturated Fatty Acids on β-Cells

Palmitic acid (16C) is the highest saturated fatty acid present in the human body. This fatty acid can reduce β-cell proliferation capacity and induce cell death [60]. A critical event in apoptosis development is the release of apoptogenic factors from the mitochondrial intermembrane space to the cytosol, like cytochrome C [61]. Recent studies proposed that proapoptotic proteins such as Bax or Bak interact with the adenine nucleotide translocator (ANT), an internal mitochondrial membrane protein, which facilitates membrane permeabilization and contributes to the release of cytochrome C. It should be noted that palmitoyl-CoA esters are natural ligands of the ANT [62]. For instance, in pancreatic islets of Sprague–Dawley rats under fatty acid stimuli, palmitic acid decreases the expression of ANT, accompanied by cytochrome C release and promoting apoptosis [60].

Another report using pancreatic β-cell culture observed that SFAs including palmitic and stearic acid induce lipoapoptosis, whereas UFAs showed opposite effects. Furthermore, there are differences between cell lines and human islets, for example, human β-cells are more resistant to apoptosis, while in a study with RIN1046-38, both fatty acids induced cellular apoptosis, and in human β-cells, an effect was only seen with stearic acid [51]. Moreover, the accumulation of palmitate-rich triglycerides in the ER of β-cells induced apoptosis, affecting TAG cellular handling and disrupting membrane phospholipid composition [63].

Palmitic acid has been described to generate ER stress, altering the microenvironment of this organelle as a result of the repression of ER-to-Golgi protein trafficking, accumulating unfolded proteins due to protein build-up in the ER lumen [64]. Additionally, the perturbation of membrane lipid composition promotes IRE1 and PERK activation, enhancing dimerization of these transducers since saturated acyl chains are less flexible and interact weakly with transmembrane domains [65]. Also, palmitate modifies the distribution of GRP78/BiP [66], a chaperone responsible for sensing the accumulation of unfolded proteins in the ER lumen [67]. Another study proposed that proinsulin binds to GRP78 and accumulates in the ER of β-cells of mice that had a high fat diet [68]. In INS-1 cells, palmitate treatment induced stored TAGs in the ER, contributing to morphological changes that would promote cell death [63]. The prolonged activation of PERK by palmitate leads to apoptosis via ATF4 overexpression and subsequent CHOP and ATF3 induction. In contrast, all FFAs induce transcription of GRP78/BiP and XBP1 mRNA, which are markers of ATF6 transducer [69].

In a proteomic screen performed to determine changes in the β-cell proteome during ER stress and apoptosis caused by palmitate, analysis showed a link between palmitate and carboxypeptidase-E protein (CPE) levels. CPE is a well-known essential enzyme in the production of insulin, which has been associated with T2D [70,71]. This study reported a protease- and calcium-dependent proteolysis of the CPE protein caused by palmitate treatment [72,73], suggesting a critical effect of palmitate upon insulin processing, mediated by the chronic reduction of CPE levels. Recently, an exome sequencing of morbidly obese women with intellectual disability, T2D and hypogonadotrophic hypogonadism led to the discovery of a new monogenic obesity syndrome with CPE deficiency [74]. An obesity-diabetes syndrome is elicited by a genetic defect in CPE previously described in *fat/fat* and Cpe knockout mouse models [71]. Studies revealed the importance of this enzyme in regulating body weight and metabolism. Likewise, in a study carried out in the INS-1 cell line, β-cells treated with myristic, palmitic and stearic acid, the synthesis of ACC mRNA was inhibited in the basal state and with glucose stimulation; this enzyme is responsible for the formation of malonyl-CoA. However, the mechanism by which the expression of ACC is inhibited is not completely understood. In addition, prolonged exposure to palmitate significantly altered GSIS and suppressed the glucose secretagogue effect. This phenomenon was registered with the exacerbated increase in FA oxidation [53].

In pancreatic islets of Sprague–Dawley rats, it was observed that stimulation with palmitic acid decreases the expression of PDX-1 by 70%, which reduces the expression of GLUT2 and glucokinase, and under prolonged palmitic acid stimulation, insulin mRNA is reduced [54]. Moreover, in isolated rat islets, palmitate did not inhibit PDX-1 expression, but significantly reduced its nuclear localization by sequestration of PDX-1 in the cytosol [75], since its own transcription is regulated by a feedback mechanism [76].

5. Effects of Unsaturated Fatty Acids on β-Cells

On the other hand, there is evidence about the protective effect that UFAs exert upon β-cells viability. The response was first defined during the exposure of cells with combinations of saturated and unsaturated FFAs, and improvement observed in the viability reflected a metabolic antagonism between the different fatty acids. This response is probably associated with a condition of molecular competition for the same GPCR (FFAR1) [48]. Under in vitro conditions, the long-chain species were incorporated into TAG molecules, which are composed mostly of SFAs. The progressive accumulation of TAG droplets leads to a physical alteration of cellular architecture within organelles membranes and cell death. Incorporation of UFAs into palmitic-acid-rich TAGs (solid at 37 °C) lowers molecular melting temperatures, increasing fluidity in TAG molecules, and improving TAG cellular metabolism [63]. Also, changes in the composition of phospholipids show implications upon fluidity in membrane systems, such as the ER, the Golgi apparatus and the plasmatic membrane [37], which are relevant to maintaining cellular homeostasis. This could affect membrane signaling, insulin secretion by granule trafficking, fusion of secretory granules to the cell membrane during exocytosis, and protein processing in the ER [63].

For instance, under the treatment of rat insulinoma cells with palmitoleate and palmitate the number of apoptotic cells was lower than those incubated exclusively with palmitate. This suggests that UFAs prevent apoptosis of human β-cells by promoting cell proliferation and maintaining normal expression of ANT [51,60]. The evaluation of different cell lines with different fatty acids showed that SFAs have pro-apoptotic properties, while UFAs maintain protective characteristics. They also concluded that both types of UFAs, MUFAs and PUFAs, are equally effective in preventing apoptosis induced by SFAs regardless of the number of double bonds or chain length, however, MUFAs can be protective at low physiological levels (50 μM) [51]. Under apoptotic conditions, evidence indicates that palmitoleic acid exerts opposite effects compared to palmitic acid and promotes proliferation of β-cells. In addition, it can counteract the toxic effects of palmitic acid. In pancreatic islets of Sprague–Dawley rats, palmitoleic acid did not affect the expression of ANT, and improved parameters of β-cells functionality, increasing GSIS and insulin content in islets. In addition, it prevented the decrease in GSIS and insulin content in islets induced by palmitic acid [60].

Interestingly, n-6 PUFAs have also shown beneficial effects. For instance, ALA supplementation was associated with decreased fasting plasma glucose concentrations in patients [77], higher plasmatic insulin concentrations in nondiabetic participants [78], and a lower prevalence of insulin resistance in normal-weight individuals [79]. However, in overweight or obese patients the protective effects of ALA against insulin resistance were diminished [79]. On the other hand, EPA supplementation in overweight patients with T2D decreased concentrations of fasting plasma glucose, insulin, HbA1c and HOMA-IR [80]. EPA also improved glucose tolerance and decreased plasma glucose [81,82]. Lastly, DHA treatment reduced blood glucose concentrations with enhanced insulin sensitivity in obese diabetic model [83]. Altogether, n-6 PUFA-regulated supplementation could be a therapeutic approach to improve insulin sensitivity in T2D patients.

Evidence shows the possibility that UFAs can promote viability of β-cells under different toxic stimuli. Other authors observed that in cells under MUFAs stimuli, such as palmitoleate, a step in the apoptotic pathway is blocked, i.e., the activation of the effector enzyme caspase-3 [84,85]. Importantly, reports about PUFAs indicate that DHA is associated with anti-inflammatory effects by modulating homeostasis in the ER. In monocytes, DHA treatment has been described to inhibit

palmitic acid-induced secretion of proinflammatory interleukins, such as IL-1β [86], however, studies in β-cells are lacking. In other models, DHA inhibits inflammatory pathways and blocks the activation of TLR-4 [21]. Considering that there is a minimal expression of TLR4 in beta cells [87], DHA could possibly show a regulatory role of inflammatory mechanisms as in monocytes, possibly decreasing the inflammatory effect of metabolic overload.

Interestingly, a balance between n-3 and n-6 PUFAs intake has been described. Rats consuming a high n-3/n-6 PUFA ratio diet (1:1, $PUFA^{1:1}$), when compared to SFA-fed rats, had alleviated obesity and lipid stores, as well as decreased serum triglycerides and total cholesterol levels. However, non-significant differences were found between rats consuming the low n-3/n-6 PUFA ratio diet (1:4, $PUFA^{1:4}$) and SFA diets. Also, the $PUFA^{1:1}$ diet enhanced insulin sensitivity decreasing serum fasting glucose and insulin levels, when compared to SFA or $PUFA^{1:4}$ diets [88]. Additionally, in rats fed a $PUFA^{1:1}$ diet, concentrations of TNF-α, IL-6 and C-reactive protein were significantly decreased when compared to SFA-fed rats. Furthermore, in muscle samples from rats fed with the $PUFA^{1:1}$, the expression of TLR-4 protein and mRNA were diminished and non-significant changes in SFA- and $PUFA^{1:4}$-fed rats were found. Collectively, a $PUFA^{1:1}$ diet alleviates insulin resistance and contributes to improvement of obesity in rats by suppressing TLR4 activation [88]. Nevertheless, the effect of TLR-4 activation and insulin processing in β-cells has not yet been studied.

Conversely, in INS-1 cells, a combination of FFAs, including unsaturated fatty acids, caused a minor activation of ER stress signaling. The PERK and IRE1 pathways are activated with oleate and with the combination of palmitate and oleate, but to a lesser extent than palmitate alone [69]. Another investigation with INS-1 cells showed that linoleic, oleic and n-3 fatty acids inhibit the generation of ACC mRNA in its basal state; however, with the stimulation of glucose, it had a greater effect, favoring oxidative catabolism. Also, prolonged exposure to oleic and linoleic acid, as well as to palmitate, markedly altered the insulin response induced by glucose, which authors associated with an increase in FA oxidation [53].

6. Final Considerations

A balanced diet is a major contributing factor to health or disease, particularly, T2D which is one of the most relevant pathologies due to its high prevalence and incidence. Several components in diet can modulate T2D development such as dietary fats, specifically, unsaturated fatty acids. The main fatty acid is palmitic acid, which has been known to cause ER stress repressing ER-to-Golgi protein trafficking [64] and, consequently, the accumulation of palmitic-acid-rich TAGs in the ER [63]. Among the most important causes of ER stress is probably the accumulation of new proinsulin associated with GRP78 [68] and proteolysis of CPE [72,73]. Likewise, it reduces GLUT2 expression [54], probably by mechanisms that favor sequestration of PDX-1 in the cytosol, hence, reducing its nuclear localization [75]. Evidence suggests a crucial role of SFAs like palmitic acid in β-cell failure to respond to extracellular glucose causing proinsulin build-up in the ER lumen and generating ER stress. This is a condition which could eventually lead to β-cell apoptosis.

However, UFAs could reverse or prevent the damage generated by excess SFAs. A clear example is palmitoleate, which prevents apoptosis of human β-cells as well as promotes β-cell proliferation and counteracts the deleterious effects of palmitic acid [60]. Indeed, data obtained in our group suggest that palmitoleate treatment inhibits the UPR overactivation (personal communication). In addition, palmitoleate showed anti-apoptotic effects [84,85], improved parameters of β-cell functionality preventing the diminution of GSIS and insulin content in islets induced by palmitic acid [60]. Interestingly, n-6 PUFAs supplementation has been associated with a decrease in fasting plasma glucose, improved glucose tolerance, and, showed an anti-inflammatory activity blocking TLR-4 signaling [21]. Moreover, a high n-3/n-6 PUFA ratio diet (1:1, $PUFA^{1:1}$) treatment has been shown to decrease serum triglycerides and total cholesterol levels and enhance insulin sensitivity and anti-inflammatory effects by reducing inflammatory cytokines [88]. Therefore, a controlled supplementation of PUFAs could become the foundation in the development of optimized treatments and, overall, a deeper

knowledge of metabolic pathway alterations which control human body homeostasis; in this case, in hormone-producing cells that regulate energy metabolism.

Several targets could be implied in T2D development and treatment. Such as FFAR1, which plays a key role in β-cell compensatory processes and could be a possible link between energy surplus and β-cell failure in T2D. Targeting PDX-1 and CPE protein [72,73] with UFA treatment could help reduce protein build-up and alleviate ER stress. All this could be achieved by supplementation with UFAs and $PUFA^{1:1}$ to counteract the effects of a high SFA diet, which is a signature condition in T2D and obesity patients. This enhances insulin sensitivity, diminishes inflammation and, overall, improves β-cell function. Although further information is required to confirm the therapeutic role of UFAs in disease.

7. Conclusions

SFAs have been broadly related with cell apoptosis and this has been associated with several metabolic diseases including T2D. Specifically a decrease in β-cell mass caused by an increase in apoptosis has been linked to palmitic acid. Lipotoxicity triggered by palmitic acid affected the response of β-cells to extracellular glucose causing proinsulin build-up and generating ER stress and therefore origin an imbalance in energetic metabolism of the body. On the other hand, UFAs such as palmitoleic and oleic could reverse or prevent the damage generated by excess of SFAs. MUFAs have shown to control β-cell parameters such as GSIS and insulin content. Also, a controlled supplementation of PUFAs has shown to optimized plasmatic cholesterol and triglycerides levels and enhance insulin sensitivity. This could lead to the development of healthier and improved dietary treatments of patients with T2D, taking into account de novo lipogenesis as an important source of palmitoleate is altered. Further information is required to confirm the therapeutic role of UFAs in disease. Nonetheless, evidence suggests unmistakably that a dietary approach, instead of pharmacological, could improve and possibly prevent the development of T2D and other metabolic diseases. This review raises the importance of a balanced fatty acids diet in health and disease, suggesting alternative therapeutic approaches against diabetes.

Acknowledgments: This study was supported by Coordinación de Posgrado e Investigación-UABC grant 106/2/N/57/1 (1983). The authors recognized the help of Josefina Ruiz-Esparza and Alejandro Montaño who critically reviewed and edited the manuscript.

Author Contributions: V.G.-G. and P.A.-M. conceived the idea and wrote the manuscript; P.A.-M. was involved in discussions and manuscript preparation; and V.G.-G. contributed reagents/materials/analysis tools. All authors approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Poudyal, H.; Panchal, S.K.; Ward, L.C.; Brown, L. Effects of ALA, EPA and DHA in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 1041–1052. [CrossRef] [PubMed]
2. Anderson, B.M.; Ma, D.W. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? *Lipids Health Dis.* **2009**, *8*, 33. [CrossRef] [PubMed]
3. WHO. The Top 10 Causes of Death. Available online: www.who.int/mediacentre/facsheet/fs310/en/ (accessed on 30 November 2017).
4. IDF. Diabetes Atlas. Available online: www.diabetesatlas.org (accessed on 4 December 2017).
5. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2018. *Diabetes Care* **2018**, *41*, S13–S27.
6. Konner, A.C.; Janoschek, R.; Plum, L.; Jordan, S.D.; Rother, E.; Ma, X.; Xu, C.; Enriori, P.; Hampel, B.; Barsh, G.S.; et al. Insulin action in agrp-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab.* **2007**, *5*, 438–449. [CrossRef] [PubMed]
7. Rorsman, P.; Renstrom, E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **2003**, *46*, 1029–1045. [CrossRef] [PubMed]

8. Scheuner, D.; Kaufman, R.J. The unfolded protein response: A pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr. Rev.* **2008**, *29*, 317–333. [CrossRef] [PubMed]
9. Schuit, F.C.; In't Veld, P.A.; Pipeleers, D.G. Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependent recruitment of pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 3865–3869. [CrossRef] [PubMed]
10. Bratanova-Tochkova, T.K.; Cheng, H.; Daniel, S.; Gunawardana, S.; Liu, Y.J.; Mulvaney-Musa, J.; Schermerhorn, T.; Straub, S.G.; Yajima, H.; Sharp, G.W. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* **2002**, *51*, S83–S90. [CrossRef] [PubMed]
11. Remedi, M.S.; Emfinger, C. Pancreatic beta-cell identity in diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* **2016**, *18*, 110–116. [CrossRef] [PubMed]
12. Pulido-Capiz, A.; Martínez-Navarro, I.; Guevara-Olaya, L.; Díaz-Molina, R.; Mas-Oliva, J.; Rivero, I.; García-González, V. Modulation of amyloidogenesis controlled by the c-terminal domain of amylin, shows new functions on hepatocyte cholesterol metabolism. Unpublished work, 2018.
13. Walter, P.; Ron, D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **2011**, *334*, 1081–1086. [CrossRef] [PubMed]
14. Fonseca, S.G.; Gromada, J.; Urano, F. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta-cell death. *Trends Endocrinol. Metab.* **2011**, *22*, 266–274. [PubMed]
15. Diaz-Villanueva, J.F.; Diaz-Molina, R.; Garcia-Gonzalez, V. Protein folding and mechanisms of proteostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 17193–17230. [CrossRef] [PubMed]
16. Harding, H.P.; Zeng, H.; Zhang, Y.; Jungries, R.; Chung, P.; Plesken, H.; Sabatini, D.D.; Ron, D. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk/mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol. Cell* **2001**, *7*, 1153–1163. [CrossRef]
17. Yang, Y.; Ren, J.; Tong, Y.; Hu, X.; Lv, Q.; Tong, N. Protective role of ppardelta in lipoapoptosis of pancreatic beta cells. *Lipids* **2016**, *51*, 1259–1268. [CrossRef] [PubMed]
18. Carta, G.; Murru, E.; Lisai, S.; Sirigu, A.; Piras, A.; Collu, M.; Batetta, B.; Gambelli, L.; Banni, S. Dietary triacylglycerols with palmitic acid in the sn-2 position modulate levels of N-acylethanolamides in rat tissues. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120424. [CrossRef] [PubMed]
19. Sette, S.; Le Donne, C.; Piccinelli, R.; Arcella, D.; Turrini, A.; Leclercq, C.; Group, I.-S.S. The third Italian national food consumption survey, Inran-Scai 2005-06—Part 1: Nutrient intakes in Italy. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2011**, *21*, 922–932. [CrossRef] [PubMed]
20. Carta, G.; Murru, E.; Banni, S.; Manca, C. Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 902. [CrossRef] [PubMed]
21. Lee, J.Y.; Zhao, L.; Hwang, D.H. Modulation of pattern recognition receptor-mediated inflammation and risk of chronic diseases by dietary fatty acids. *Nutr. Rev.* **2010**, *68*, 38–61. [CrossRef] [PubMed]
22. Poudyal, H.; Panchal, S.K.; Diwan, V.; Brown, L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Prog. Lipid Res.* **2011**, *50*, 372–387. [CrossRef] [PubMed]
23. Parker-Barnes, J.M.; Das, T.; Bobik, E.; Leonard, A.E.; Thurmond, J.M.; Chaung, L.T.; Huang, Y.S.; Mukerji, P. Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8284–8289. [CrossRef] [PubMed]
24. Portolesi, R.; Powell, B.C.; Gibson, R.A. Competition between 24:5n-3 and ALA for delta 6 desaturase may limit the accumulation of DHA in hepg2 cell membranes. *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 1592–1598. [CrossRef] [PubMed]
25. Rodriguez, A.; Sarda, P.; Nessmann, C.; Boulot, P.; Leger, C.L.; Descomps, B. Delta6- and delta5-desaturase activities in the human fetal liver: Kinetic aspects. *J. Lipid Res.* **1998**, *39*, 1825–1832. [PubMed]
26. Vermunt, S.H.; Mensink, R.P.; Simonis, M.M.; Hornstra, G. Effects of dietary alpha-linolenic acid on the conversion and oxidation of 13c-alpha-linolenic acid. *Lipids* **2000**, *35*, 137–142. [CrossRef] [PubMed]
27. Cunnane, S.C.; Menard, C.R.; Likhodii, S.S.; Brenna, J.T.; Crawford, M.A. Carbon recycling into de novo lipogenesis is a major pathway in neonatal metabolism of linoleate and alpha-linolenate. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **1999**, *60*, 387–392. [CrossRef]
28. Emmison, N.; Gallagher, P.A.; Coleman, R.A. Linoleic and linolenic acids are selectively secreted in triacylglycerol by hepatocytes from neonatal rats. *Am. J. Physiol.* **1995**, *269*, R80–R86. [CrossRef] [PubMed]
29. Cunnane, S.C.; Ryan, M.A.; Nadeau, C.R.; Bazinet, R.P.; Musa-Veloso, K.; McCloy, U. Why is carbon from some polyunsaturates extensively recycled into lipid synthesis? *Lipids* **2003**, *38*, 477–484. [CrossRef] [PubMed]

30. Edmond, J. Ketone bodies as precursors of sterols and fatty acids in the developing rat. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 72–80. [PubMed]
31. Malaisse, W.J.; Best, L.; Kawazu, S.; Malaisse-Lagae, F.; Sener, A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: Fuel metabolism in islets deprived of exogenous nutrient. *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *224*, 102–110. [CrossRef]
32. Ashcroft, F.M.; Rohm, M.; Clark, A.; Brereton, M.F. Is type 2 diabetes a glycogen storage disease of pancreatic beta cells? *Cell Metab.* **2017**, *26*, 17–23. [CrossRef] [PubMed]
33. Yaney, G.C.; Corkey, B.E. Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **2003**, *46*, 1297–1312. [CrossRef] [PubMed]
34. Fatehi-Hassanabad, Z.; Chan, C.B. Transcriptional regulation of lipid metabolism by fatty acids: A key determinant of pancreatic beta-cell function. *Nutr. Metab.* **2005**, *2*, 1. [CrossRef] [PubMed]
35. Deeney, J.T.; Gromada, J.; Hoy, M.; Olsen, H.L.; Rhodes, C.J.; Prentki, M.; Berggren, P.O.; Corkey, B.E. Acute stimulation with long chain acyl-coa enhances exocytosis in insulin-secreting cells (hit t-15 and nmri beta-cells). *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9363–9368. [CrossRef] [PubMed]
36. Nolan, C.J.; Madiraju, M.S.; Delghingaro-Augusto, V.; Peyot, M.L.; Prentki, M. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes* **2006**, *55*, S16–S23. [CrossRef] [PubMed]
37. Cimen, I.; Kocaturk, B.; Koyuncu, S.; Tufanli, O.; Onat, U.I.; Yildirim, A.D.; Apaydin, O.; Demirsoy, S.; Aykut, Z.G.; Nguyen, U.T.; et al. Prevention of atherosclerosis by bioactive palmitoleate through suppression of organelle stress and inflammasome activation. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 358ra126. [CrossRef] [PubMed]
38. Hamilton, J.A.; Civelek, V.N.; Kamp, F.; Tornheim, K.; Corkey, B.E. Changes in internal pH caused by movement of fatty acids into and out of clonal pancreatic beta-cells (hit). *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20852–20856. [PubMed]
39. Noushmehr, H.; D'Amico, E.; Farilla, L.; Hui, H.; Wawrowsky, K.A.; Mlynarski, W.; Doria, A.; Abumrad, N.A.; Perfetti, R. Fatty acid translocase (fat/cd36) is localized on insulin-containing granules in human pancreatic beta-cells and mediates fatty acid effects on insulin secretion. *Diabetes* **2005**, *54*, 472–481. [CrossRef] [PubMed]
40. Zhang, W.; Chen, R.; Yang, T.; Xu, N.; Chen, J.; Gao, Y.; Stetler, R.A. Fatty acid transporting proteins: Roles in brain development, aging, and stroke. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2017**. [CrossRef] [PubMed]
41. Pepino, M.Y.; Kuda, O.; Samovski, D.; Abumrad, N.A. Structure-function of cd36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **2014**, *34*, 281–303. [CrossRef] [PubMed]
42. Febbraio, M.; Guy, E.; Coburn, C.; Knapp, F.F., Jr.; Beets, A.L.; Abumrad, N.A.; Silverstein, R.L. The impact of overexpression and deficiency of fatty acid translocase (fat)/cd36. *Mol. Cell Biochem.* **2002**, *239*, 193–197. [CrossRef] [PubMed]
43. Wallin, T.; Ma, Z.; Ogata, H.; Jorgensen, I.H.; Iezzi, M.; Wang, H.; Wollheim, C.B.; Bjorklund, A. Facilitation of fatty acid uptake by cd36 in insulin-producing cells reduces fatty-acid-induced insulin secretion and glucose regulation of fatty acid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1801*, 191–197. [CrossRef] [PubMed]
44. Furuhashi, M.; Hotamisligil, G.S. Fatty acid-binding proteins: Role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 489–503. [CrossRef] [PubMed]
45. Briscoe, C.P.; Tadayyon, M.; Andrews, J.L.; Benson, W.G.; Chambers, J.K.; Eilert, M.M.; Ellis, C.; Elshourbagy, N.A.; Goetz, A.S.; Minnick, D.T.; et al. The orphan g protein-coupled receptor gpr40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11303–11311. [CrossRef] [PubMed]
46. Itoh, Y.; Kawamata, Y.; Harada, M.; Kobayashi, M.; Fujii, R.; Fukusumi, S.; Ogi, K.; Hosoya, M.; Tanaka, Y.; Uejima, H.; et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through gpr40. *Nature* **2003**, *422*, 173–176. [CrossRef] [PubMed]
47. Sakuma, K.; Yabuki, C.; Maruyama, M.; Abiru, A.; Komatsu, H.; Negoro, N.; Tsujihata, Y.; Takeuchi, K.; Habata, Y.; Mori, M. Fasiglifam (tak-875) has dual potentiating mechanisms via galphaq-gpr40/ffar1 signaling branches on glucose-dependent insulin secretion. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2016**, *4*, e00237. [CrossRef] [PubMed]
48. Kristinsson, H.; Smith, D.M.; Bergsten, P.; Sargsyan, E. Ffar1 is involved in both the acute and chronic effects of palmitate on insulin secretion. *Endocrinology* **2013**, *154*, 4078–4088. [CrossRef] [PubMed]
49. Steneberg, P.; Rubins, N.; Bartoov-Shifman, R.; Walker, M.D.; Edlund, H. The FFA receptor gpr40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab.* **2005**, *1*, 245–258. [CrossRef] [PubMed]

50. Unger, R.H. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent niddm. Genetic and clinical implications. *Diabetes* **1995**, *44*, 863–870. [CrossRef] [PubMed]
51. Eitel, K.; Staiger, H.; Brendel, M.D.; Brandhorst, D.; Bretzel, R.G.; Haring, H.U.; Kellerer, M. Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *299*, 853–856. [CrossRef]
52. Bollheimer, L.C.; Skelly, R.H.; Chester, M.W.; McGarry, J.D.; Rhodes, C.J. Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic beta cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation. *J. Clin. Investig.* **1998**, *101*, 1094–1101. [CrossRef] [PubMed]
53. Brun, T.; Assimacopoulos-Jeannet, F.; Corkey, B.E.; Prentki, M. Long-chain fatty acids inhibit acetyl-coa carboxylase gene expression in the pancreatic beta-cell line ins-1. *Diabetes* **1997**, *46*, 393–400. [CrossRef] [PubMed]
54. Gremlich, S.; Bonny, C.; Waeber, G.; Thorens, B. Fatty acids decrease idx-1 expression in rat pancreatic islets and reduce glut2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30261–30269. [CrossRef] [PubMed]
55. Assimacopoulos-Jeannet, F.; Thumelin, S.; Roche, E.; Esser, V.; McGarry, J.D.; Prentki, M. Fatty acids rapidly induce the carnitine palmitoyltransferase i gene in the pancreatic beta-cell line ins-1. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1659–1664. [CrossRef] [PubMed]
56. Habener, J.F.; Stoffers, D.A. A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc. Assoc. Am. Phys.* **1998**, *110*, 12–21. [PubMed]
57. Stoffers, D.A.; Thomas, M.K.; Habener, J.F. Homeodomain protein idx-1: A master regulator of pancreas development and insulin gene expression. *Trends Endocrinol. Metab.* **1997**, *8*, 145–151. [CrossRef]
58. Brissova, M.; Shiota, M.; Nicholson, W.E.; Gannon, M.; Knobel, S.M.; Piston, D.W.; Wright, C.V.; Powers, A.C. Reduction in pancreatic transcription factor pdx-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 11225–11232. [CrossRef] [PubMed]
59. Macfarlane, W.M.; Frayling, T.M.; Ellard, S.; Evans, J.C.; Allen, L.I.; Bulman, M.P.; Ayres, S.; Shepherd, M.; Clark, P.; Millward, A.; et al. Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *J. Clin. Investig.* **1999**, *104*, R33–R39. [CrossRef] [PubMed]
60. Maedler, K.; Spinas, G.A.; Dyntar, D.; Moritz, W.; Kaiser, N.; Donath, M.Y. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* **2001**, *50*, 69–76. [CrossRef] [PubMed]
61. Kroemer, G.; Reed, J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 513–519. [CrossRef] [PubMed]
62. Woldegiorgis, G.; Yousufzai, S.Y.; Shrago, E. Studies on the interaction of palmitoyl coenzyme a with the adenine nucleotide translocase. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 14783–14787. [PubMed]
63. Moffitt, J.H.; Fielding, B.A.; Evershed, R.; Berstan, R.; Currie, J.M.; Clark, A. Adverse physicochemical properties of tripalmitin in beta cells lead to morphological changes and lipotoxicity in vitro. *Diabetologia* **2005**, *48*, 1819–1829. [CrossRef] [PubMed]
64. Preston, A.M.; Gurisik, E.; Bartley, C.; Laybutt, D.R.; Biden, T.J. Reduced endoplasmic reticulum (er)-to-golgi protein trafficking contributes to er stress in lipotoxic mouse beta cells by promoting protein overload. *Diabetologia* **2009**, *52*, 2369–2373. [CrossRef] [PubMed]
65. Volmer, R.; van der Ploeg, K.; Ron, D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 4628–4633. [CrossRef] [PubMed]
66. Karaskov, E.; Scott, C.; Zhang, L.; Teodoro, T.; Ravazzola, M.; Volchuk, A. Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to ins-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* **2006**, *147*, 3398–3407. [CrossRef] [PubMed]
67. Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Hendershot, L.M.; Harding, H.P.; Ron, D. Dynamic interaction of bip and er stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 326–332. [CrossRef] [PubMed]
68. Scheuner, D.; Vander Mierde, D.; Song, B.; Flamez, D.; Creemers, J.W.; Tsukamoto, K.; Ribick, M.; Schuit, F.C.; Kaufman, R.J. Control of mrna translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 757–764. [CrossRef] [PubMed]

69. Cunha, D.A.; Hekerman, P.; Ladriere, L.; Bazarra-Castro, A.; Ortis, F.; Wakeham, M.C.; Moore, F.; Rasschaert, J.; Cardozo, A.K.; Bellomo, E.; et al. Initiation and execution of lipotoxic er stress in pancreatic beta-cells. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 2308–2318. [CrossRef] [PubMed]
70. Chen, H.; Jawahar, S.; Qian, Y.; Duong, Q.; Chan, G.; Parker, A.; Meyer, J.M.; Moore, K.J.; Chayen, S.; Gross, D.J.; et al. Missense polymorphism in the human carboxypeptidase e gene alters enzymatic activity. *Hum. Mutat.* **2001**, *18*, 120–131. [CrossRef] [PubMed]
71. Naggert, J.K.; Fricker, L.D.; Varlamov, O.; Nishina, P.M.; Rouille, Y.; Steiner, D.F.; Carroll, R.J.; Paigen, B.J.; Leiter, E.H. Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase e mutation which reduces enzyme activity. *Nat. Genet.* **1995**, *10*, 135–142. [CrossRef] [PubMed]
72. Jeffrey, K.D.; Alejandro, E.U.; Luciani, D.S.; Kalynyak, T.B.; Hu, X.; Li, H.; Lin, Y.; Townsend, R.R.; Polonsky, K.S.; Johnson, J.D. Carboxypeptidase e mediates palmitate-induced beta-cell er stress and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 8452–8457. [CrossRef] [PubMed]
73. Johnson, J.D. Proteomic identification of carboxypeptidase e connects lipid-induced beta-cell apoptosis and dysfunction in type 2 diabetes. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 38–42. [CrossRef] [PubMed]
74. Alsters, S.I.; Goldstone, A.P.; Buxton, J.L.; Zekavati, A.; Sosinsky, A.; Yiorkas, A.M.; Holder, S.; Klaber, R.E.; Bridges, N.; van Haelst, M.M.; et al. Truncating homozygous mutation of carboxypeptidase e (CPE) in a morbidly obese female with type 2 diabetes mellitus, intellectual disability and hypogonadotrophic hypogonadism. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131417. [CrossRef] [PubMed]
75. Hagman, D.K.; Hays, L.B.; Parazzoli, S.D.; Poitout, V. Palmitate inhibits insulin gene expression by altering pdx-1 nuclear localization and reducing mafa expression in isolated rat islets of langerhans. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 32413–32418. [CrossRef] [PubMed]
76. Marshak, S.; Benshushan, E.; Shoshkes, M.; Havin, L.; Cerasi, E.; Melloul, D. Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: Pdx-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. *Mol. Cell Biol.* **2000**, *20*, 7583–7590. [CrossRef] [PubMed]
77. Wendland, E.; Farmer, A.; Glasziou, P.; Neil, A. Effect of alpha linolenic acid on cardiovascular risk markers: A systematic review. *Heart* **2006**, *92*, 166–169. [CrossRef] [PubMed]
78. Djousse, L.; Hunt, S.C.; Tang, W.; Eckfeldt, J.H.; Province, M.A.; Ellison, R.C. Dietary linolenic acid and fasting glucose and insulin: The national heart, lung, and blood institute family heart study. *Obesity* **2006**, *14*, 295–300. [CrossRef] [PubMed]
79. Muramatsu, T.; Yatsuya, H.; Toyoshima, H.; Sasaki, S.; Li, Y.; Otsuka, R.; Wada, K.; Hotta, Y.; Mitsuhashi, H.; Matsushita, K.; et al. Higher dietary intake of alpha-linolenic acid is associated with lower insulin resistance in middle-aged Japanese. *Prev. Med.* **2010**, *50*, 272–276. [CrossRef] [PubMed]
80. Sarbolouki, S.; Javanbakht, M.H.; Derakhshanian, H.; Hosseinzadeh, P.; Zareei, M.; Hashemi, S.B.; Dorosty, A.R.; Eshraghian, M.R.; Djalali, M. Eicosapentaenoic acid improves insulin sensitivity and blood sugar in overweight type 2 diabetes mellitus patients: A double-blind randomised clinical trial. *Singap. Med. J.* **2013**, *54*, 387–390. [CrossRef]
81. Liu, X.; Xue, Y.; Liu, C.; Lou, Q.; Wang, J.; Yanagita, T.; Xue, C.; Wang, Y. Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice. *Lipids Health Dis.* **2013**, *12*, 109. [CrossRef] [PubMed]
82. Mori, Y.; Murakawa, Y.; Yokoyama, J.; Tajima, N.; Ikeda, Y.; Nobukata, H.; Ishikawa, T.; Shibutani, Y. Effect of highly purified eicosapentaenoic acid ethyl ester on insulin resistance and hypertension in dahl salt-sensitive rats. *Metabolism* **1999**, *48*, 1089–1095. [CrossRef]
83. Shimura, T.; Miura, T.; Usami, M.; Ishihara, E.; Tanigawa, K.; Ishida, H.; Seino, Y. Docosahexanoic acid (DHA) improved glucose and lipid metabolism in KK-ay mice with genetic non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 507–510. [CrossRef] [PubMed]
84. Lupi, R.; Dotta, F.; Marselli, L.; Del Guerra, S.; Masini, M.; Santangelo, C.; Patane, G.; Boggi, U.; Piro, S.; Anello, M.; et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: Evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and bcl-2 regulated. *Diabetes* **2002**, *51*, 1437–1442. [CrossRef] [PubMed]
85. Morgan, N.G.; Dhayal, S. Unsaturated fatty acids as cytoprotective agents in the pancreatic beta-cell. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2010**, *82*, 231–236. [CrossRef] [PubMed]

86. Snodgrass, R.G.; Huang, S.; Namgaladze, D.; Jandali, O.; Shao, T.; Sama, S.; Brune, B.; Hwang, D.H. Docosahexaenoic acid and palmitic acid reciprocally modulate monocyte activation in part through endoplasmic reticulum stress. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *32*, 39–45. [CrossRef] [PubMed]
87. Amyot, J.; Semache, M.; Ferdaoussi, M.; Fontes, G.; Poitout, V. Lipopolysaccharides impair insulin gene expression in isolated islets of langerhans via toll-like receptor-4 and nf-kappab signalling. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36200. [CrossRef] [PubMed]
88. Liu, H.Q.; Qiu, Y.; Mu, Y.; Zhang, X.J.; Liu, L.; Hou, X.H.; Zhang, L.; Xu, X.N.; Ji, A.L.; Cao, R.; et al. A high ratio of dietary n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids improves obesity-linked inflammation and insulin resistance through suppressing activation of tlr4 in SD rats. *Nutr. Res.* **2013**, *33*, 849–858. [CrossRef] [PubMed]

© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).