



FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**PAPEL DE LOS ESTRÓGENOS EN LA
REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN
CELULAR Y LA APOPTOSIS EN LA CÉLULA
BETA PANCREÁTICA**

Autor: Sarai Martínez Pacheco

Tutor: Ángel Nadal Navajas

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN BÁSICA EN DIABETES

ÁREA DE FISIOLÓGÍA

CURSO 2015-2016

RESUMEN

La deficiencia de insulina es uno de los eventos tempranos en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), debiéndose probablemente a una disfuncionalidad en la capacidad secretora de la célula β pancreática, así como a una pérdida de la masa de este tipo celular. A este respecto, se ha demostrado que la exposición crónica a ácidos grasos libres provoca la muerte de la célula β , pudiendo contribuir en el desarrollo de DMT2. Varias investigaciones sugieren que el estrés de retículo endoplasmático es uno de los principales mecanismos subcelulares que subyacen al fallo funcional de la célula β . Los estudios sugieren que la hormona sexual 17β -estradiol, producida mayoritariamente en el ovario, contribuye a la preservación de la liberación de insulina en estados prediabéticos.

El trabajo de investigación propuesto se centrará en el estudio del papel que tiene la señalización estrogénica en la preservación de la célula β pancreática cuando está expuesta a un medio con una concentración elevada de ácidos grasos libres, así como otros estímulos nocivos que perjudican la viabilidad de la célula β y la secreción de insulina.

Palabras Clave: *Células beta, Receptores de Estrógenos, Palmitato, Viabilidad celular, Estrés de Retículo Endoplasmático*

ABSTRACT

Insulin deficiency is one of the early events in the pathogenesis of type 2 diabetes (T2D), probably being due to a dysfunction in the secretory capacity of pancreatic β cell, and a loss of mass of this cell type. In this regard, it has been shown that chronic exposure to free fatty acids causes the death of the β cell might contribute to the development of T2D. Several studies suggest that endoplasmic reticulum stress is a major subcellular mechanisms underlying functional failure of β cell. Studies suggest that 17β -estradiol sex hormone produced mainly in the ovaries, contributes to the preservation of insulin release in prediabetic states.

The proposed research work will focus on the study of the role of the estrogen signaling in the preservation of pancreatic β cell when exposed to an environment with a high concentration of free fatty acids and other noxious stimulus that damage the viability of the β cell and insulin.

Keywords: *Beta cells, Estrogen Receptors, Palmitate, Cell Viability, Endoplasmic Reticulum Stress*

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT.....	I
ÍNDICE	II
ABREVIATURAS	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La célula beta pancreática	1
1.1.1. Secreción de insulina inducida por glucosa.....	1
1.2. Estrógenos	2
1.3. Receptores de Estrógenos.....	4
1.3.1. Efectos rápidos de los estrógenos por vías alternativas	6
1.3.2. Papel Fisiológico de los Receptores de Estrógenos.....	7
1.3.3. Receptores de estrógeno en la célula β	9
1.4. El Retículo Endoplasmático	9
1.4.1. Estrés del Retículo Endoplasmático	10
1.4.2. La Respuesta a Estrés (UPR).....	11
1.4.3. Apoptosis promovida por estrés del RE	12
1.4.4. El Retículo Endoplasmático en células beta.....	13
1.5. La célula beta y ácidos grasos libres	14
1.6. La célula beta y enfermedades metabólicas.....	14
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES FUTURAS	32
7. BIBLIOGRAFÍA	33

ABREVIATURAS

ADP: Adenosine Diphosphate. Adenosín Difosfato

AGL: Ácidos grasos libres

AMPc: *Adenosin Monophosphate cyclic*. Adenosín Monofosfato Cíclico

ATF4: *Activating transcription factor-4*. Factor 4 activador de la transcripción.

ATF6: *Activating Transcription Factor 6*. Factor de transcripción activador 6

ATP: *Adenosine Triphosphate*. Adenosín Trifosfato

BSA: *Bovine Serum Albumin*. Albúmina de suero bovino

[Ca²⁺]_i: Concentración de Calcio Intracelular

CHOP: Proteína homóloga a C/EBP; C/EBP homologous protein

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMT1: Diabetes Mellitus Tipo 1

DMT2: Diabetes Mellitus Tipo 2

DPN: *Diarylpropionitrile*. Diarilpropionitrilo

E1: Estrona

E2: 17-β-Estradiol

E3: Estriol

eIF2α: *Eukaryotic Initiation Factor 2*. Factor de iniciación eucariota 2

ER: *Estrogen Receptor*. Receptor de estrógenos

ERAD: *Endoplasmic reticulum-associated degradation*. Sistema de degradación de proteínas asociado al retículo endoplasmático.

ERE: *Estrogen Response Element*. Elementos de respuesta a estrógenos

ERα: *Estrogen Receptor Alpha*. Receptor de Estrógenos Alfa.

ERβ: *Estrogen Receptor Beta*. Receptor de Estrógenos Beta

FBS: *Fetal Bovine Serum*. Suero fetal bovino

GK: *Glucokinase*. Glucoquinasa

GLUT-2: *Glucose Transporter*. Transportador de Glucosa

GPER/GPR30: *G protein-coupled estrogen receptor 1*. Receptor de estrógenos acoplado a proteína G

GRP78/BIP: *Glucose related protein 78/binding immunoglobulin protein*. Proteína relacionada con la glucosa/proteína de unión a inmunoglobulinas

HSP: *Heat shock protein*. Proteína de choque térmico

IRE1: *inositol-requiring protein-1*. Proteína-1 que requiere inositol

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*. Quinasa del dominio N-terminal de c-Jun

K_{ATP}: *ATP - sensitive potassium channel*. Canal de potasio dependiente de ATP.

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*. Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MNAR: *Modulator of non-genomic activity of estrogen receptor*. Modulador de la acción genómica del receptor de estrógenos

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol N-terminal.

PBS: *Phosphate Buffered Saline*. Solución salina tamponada con fosfato

PERK: *Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*

PPT: *Propyl pyrazole triol*. Propil-pirazol-triol

RE: Retículo endoplasmático

RER/REL: Retículo Endoplasmático Rugoso / Retículo Endoplasmático Liso

ROS: *Reactive oxygen species*. Especies reactivas de oxígeno

S1P/S2P: *Site-1 protease/Site-2 protease*. Proteasa de sitio 1/Proteasa de sitio 2

SRC: Tirosina quinasas no receptoras

UPR: *Unfolded Protein Response*. Respuesta a proteínas mal plegadas

XBP1: *X-Box Binding Protein 1*. Proteína de unión a la secuencia 1.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La célula beta pancreática

La célula β es la población celular mayoritaria del islote de Langerhans, constituyendo el 75% del islote. Su principal función es la secreción de insulina en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre. Dicha secreción es modulada por concentraciones variables de glucosa extracelular por medio de un proceso en el que participan el metabolismo de la glucosa, varios tipos de canales iónicos, la actividad eléctrica de la membrana plasmática y la maquinaria de exocitosis. El objetivo de la actividad eléctrica de la célula β pancreática es la generación de la señal intracelular necesaria para iniciar y modular la exocitosis de los gránulos de insulina. Además, otras vías de señalización intracelular pueden intervenir en el mecanismo de liberación de insulina.

1.1.1. Secreción de insulina inducida por glucosa

La glucosa que llega a los islotes es transportada al citosol de las células gracias al transportador específico de baja afinidad y alta capacidad llamado GLUT-2, lo que permite que se alcance un rápido equilibrio entre las concentraciones intra y extracelulares de glucosa. Una vez en el citosol, la glucosa es fosforilada por la hexoquinasa IV, también llamada glucoquinasa (GK) quedando atrapada en el interior celular. Su metabolismo por la vía glucolítica causa un aumento intracelular del cociente ATP/ADP (Adenosina Trifosfato/ Adenosina Difosfato), y de los diadenosinopolidifosfatos³³, lo que cierra los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}). Estos canales son los responsables de mantener el potencial de reposo de la célula^{4,17}. El número de K_{ATP} cerrados con concentraciones de glucosa superiores a 5-7mM es suficiente para alcanzar el umbral de despolarización de la membrana plasmática y generar actividad¹⁵.

La despolarización de la membrana provoca la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje de la membrana plasmática de las células, lo que a su vez conlleva un aumento en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). Este aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ desencadena la exocitosis a través de la activación de proteínas quinasas que interaccionan con componentes de la maquinaria microtubular/exocítica. Durante este proceso se libera el contenido de insulina de las vesículas al medio extracelular y la hormona alcanza el torrente sanguíneo, donde actúa sobre las dianas tisulares comunicando la presencia de glucosa en la sangre^{1,5} (Figura 1).

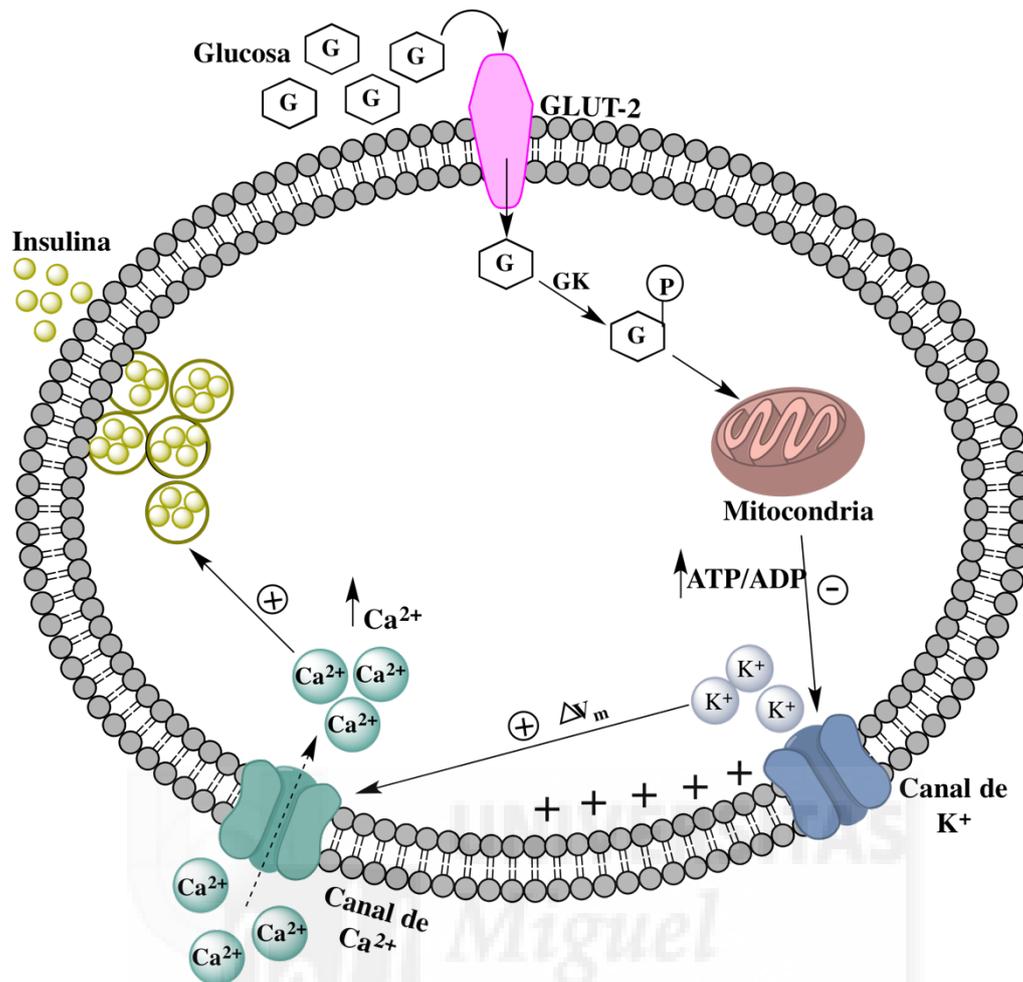


Figura. 1 Mecanismo de la secreción de insulina inducida por glucosa. Tras la elevación de la concentración de glucosa extracelular, ésta entra a través del transportador GLUT-2 a la célula β y se metaboliza de forma secuencial. A continuación, se produce la elevación de la relación ATP:ADP en el citosol, lo cual cierra los canales de K^+ sensibles al ATP (K_{ATP}) y conduce a la despolarización de la membrana, la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, entrada de Ca^{2+} y, finalmente, la elevación de la concentración Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), lo que desencadena la exocitosis de la insulina. La reducción de la salida de K^+ se indica por la ausencia de flecha de trazos a través del canal.

1.2. Estrógenos

Los estrógenos son un tipo de hormonas esteroideas que derivan del estrano (18C), más específicamente pertenecen al grupo de los esteroides sexuales. Son sustancias lipófilas, que difunden fácilmente a través de las membranas⁴¹.

Los estrógenos naturales han sido definidos como las hormonas femeninas más importantes

debido a que desempeñan un papel clave en el desarrollo de los caracteres sexuales femeninos, como el crecimiento de las mamas, aumento de tamaño de las trompas de Falopio y engrosamiento del epitelio vaginal promoviendo el crecimiento y mantenimiento del sistema reproductor femenino^{3,40}. Además afectan a la distribución de la grasa, causan aumento de peso e inducen la secreción por parte de las glándulas sebáceas, entre otros⁴⁰.

Durante los años reproductivos, la mayor parte del estrógeno en las mujeres proviene de la secreción de estradiol por parte de los ovarios, aunque también existe una fuente importante de estrógenos que proviene de la conversión extraglandular de androstendiona en estrona y, en menor medida, de la conversión de testosterona y estrona en estradiol⁴³. Los estrógenos sintetizados en las glándulas adrenales y en los testículos también participan en el desarrollo sexual masculino³⁷.

Esta conversión de andrógenos en estrógenos se denomina aromatización y se observa en varios tejidos poseedores de la enzima P450 aromatasas. Esta enzima se expresa en placenta, ovarios, testículos, cerebro, músculos, piel, adipocitos y células epiteliales de la estroma mamaria⁴³. Los tejidos muscular y adiposo constituyen los sitios de aromatización principales, siendo el tejido muscular el que presenta una mayor actividad de aromatización extraglandular. Sin embargo, en situaciones en las que aumenta la presencia de tejido adiposo como en la obesidad, los adipocitos se asocian con un mayor índice de aromatización que las células musculares⁴³.

Aunque se sintetizan diversos estrógenos durante toda la vida, el más importante y potente de los estrógenos secretados por el ovario es el 17- β estradiol (E2). Además de su papel clave en el desarrollo y mantenimiento de la función sexual y reproductiva, se sabe que E2 ejerce un gran número de acciones en otros sistemas tales como hueso, hígado, cerebro, páncreas endocrino, tejido adiposo, sistema esquelético, muscular y cardiovascular³ (Figura 2)

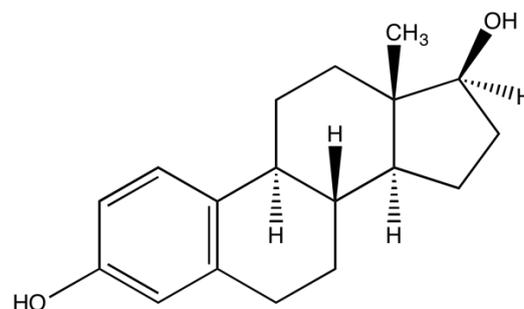


Fig 2. Estructura química del 17- β estradiol. (Realizada con ChemDraw Professional)

Igualmente, existen dos metabolitos del E2 que son importantes en mujeres: la estrona (E1), el estrógeno dominante a partir de la menopausia⁴³ y el estriol (E3), el estrógeno mayoritario en la orina. Aunque son ligandos de alta afinidad son agonistas mucho más débiles de los receptores de estrógeno. Se pensaba que estos metabolitos eran inactivos, pero evidencias recientes sugieren que también pueden tener funciones específicas de tejido²⁰.

1.3. Receptores de Estrógenos

La señalización celular de los estrógenos está mediada a través de dos receptores de estrógenos (ER), ER α (NR3A1) y ER β (NR3A2), cada uno de los cuales tiene múltiples isoformas y exhiben funciones y patrones de expresión de tejido distintos²⁶. Ambos ER pertenecen a una superfamilia de receptores nucleares (NR) que incluye el receptor de glucocorticoides, mineralocorticoides, vitamina D, progesterona, hormona tiroidea, andrógenos, ácido retinoico y ácido 9-cis retinoico. Estos receptores son factores de transcripción que se activan tras la unión a su ligando, produciendo efectos genómicos a largo plazo²⁰ (Figura 3)

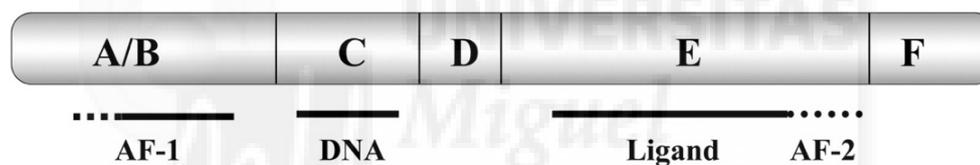


Figura 3. Representación esquemática de la distribución en dominios de los ER. En el esquema se muestra la distribución en dominios de los receptores de estrógenos, así como las regiones más importantes. El dominio A / B en el extremo NH₂ contiene el sitio de AF-1 donde interactúan otros factores de transcripción. El dominio C / D contiene la estructura de dos dedos de zinc que se une a ADN, y el dominio C / F contiene el bolsillo de unión a ligando, así como el sitio AF-2 donde se unen los coactivadores. (Tomado de Nilsson S et al. *Mechanisms of Estrogen Action. Physiol Rev. 2001 American Physiological Society;81(4):1535-65.*)

Al igual que otros miembros de la familia NR, los ER contienen distintos dominios conservados evolutivamente. En general, los receptores de hormonas presentan 6 dominios (A-F) con distinta función. Los extremos NH₂ y COOH terminales, A/B y E/F respectivamente, son el lugar donde interactúan factores de transcripción. El dominio más conservado es el dominio de unión al ADN (Dominio C), involucrado en el reconocimiento y unión al ADN, mientras que la unión del ligando se produce en el dominio E. En el dominio D se sitúan señales de localización nuclear y unión de factores de transcripción. El dominio NH₂-terminal (A/B) no se conserva y representa el dominio más variable tanto en secuencia y longitud. Ambos ER presentan

afinidades similares para E2 y se unen a los mismos elementos de respuesta a ADN^{20, 34}

Desde el punto de vista del mecanismo clásico, E2 se une a los receptores de estrógeno (ER α o ER β). Los ER inactivos están asociados a varias chaperonas (*heat shock protein*) como Hsp90 y Hsp56 formando un complejo. Al unirse a su ligando, se disocia de estas chaperonas y el receptor forma dímeros interaccionando directamente con una secuencia específica en el ADN o con elementos de respuesta a estrógenos (ERE) a través del dominio de unión al ADN, o indirectamente uniéndose a otros factores de transcripción. En consecuencia, el proceso de transcripción es activado al formarse el complejo de iniciación de la transcripción que incluye diferentes cofactores y proteínas reguladoras de la transcripción^{3, 10, 20, 34} (Figura 4).

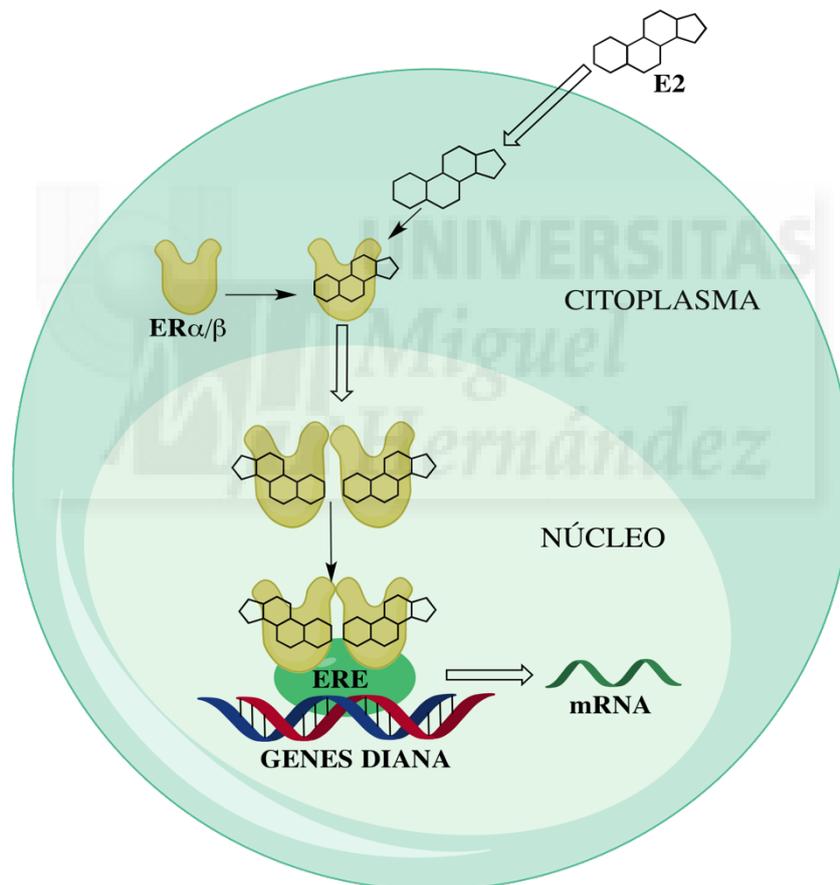


Figura 4. Vía Clásica del estradiol. Esta vía está mediada por la transcripción de genes mediante la activación de los receptores de E2 (ER) ubicados en el núcleo, que se unen al elemento de estrógeno-respuesta (ERE) de los promotores de genes e inducen la transcripción de genes. *Modificada de Nadal A et al. 2001*²⁷

1.3.1. Efectos rápidos de los estrógenos por vías alternativas

Las funciones reproductivas están mediadas principalmente por la vía clásica de ER nucleares que actúan como factores de transcripción activados por ligando. Estos mecanismos son lentos, pudiendo existir una demora entre la unión de la hormona con el receptor y los primeros efectos medibles. Esta demora suele ser de al menos 20-30 minutos, aunque puede alargarse hasta 90 minutos^{34, 41}

En los últimos años, se ha descubierto la existencia de sitios de unión para estrógenos en la membrana plasmática que permiten el inicio de respuestas no genómicas rápidas. E2 puede activar señales que actúan en cuestión de segundos o minutos a través de estos ER extranucleares asociados a membrana.

ER α y ER β están localizados en la caveola, donde se asocian con otras moléculas de señalización, facilitando de ese modo la interacción y señalización intracelular rápida²⁶. Esta señalización se lleva a cabo mediante la modulación de cascadas de señalización intracelular, incluyendo PI3K, MAPK / ERK, cíclicomonofosfato de adenosina (AMP_C) y otras proteínas quinasas²⁵ (Figura 4).

Estas proteínas señal a las que se asocian incluyen las proteínas G, los receptores del factor de crecimiento, tirosina quinasas (SRC), el Modulador de la acción no genómica del ER (MNAR), y los receptores acoplados a proteínas G. Este complejo multiproteico proporciona las interacciones necesarias para activar estas señales rápidas de E2. Sin embargo, también pueden modular la expresión génica y por lo tanto la producción de proteínas²⁶. Además de la rapidez con la que se producen los nuevos efectos de los estrógenos, la participación de la vía genómica puede ser descartada inhibiendo la síntesis de ARN y de proteínas.

Por otra parte, la existencia de un receptor en la membrana plasmática puede corroborarse con la utilización de estrógenos unidos a macromoléculas, como albúmina de suero bovino (BSA) o peroxidasa, ya que esto imposibilita su paso a través de la membrana plasmática por su gran tamaño, no pudiendo ejercer su efecto intracelular sobre los receptores clásicos³⁴.

A pesar de los numerosos ejemplos de interacción de los estrógenos con un receptor de membrana, se desconoce la naturaleza de dicho receptor. En algunos tipos celulares parecen ser

los propios receptores de estrógenos intracelulares clásicos expresándose en la membrana plasmática, mientras que en otros casos parece tratarse de otro receptor sin relación alguna con los receptores de estrógenos clásicos³⁴. Un ejemplo es el receptor GPR30, también conocido como receptor de estrógeno acoplado a proteína G 1 (GPER), que responde a estrógenos mediante la señalización celular rápida. Se ha mostrado que GPR30 se expresa en los islotes de ratones y humanos, así como en la línea de células β de ratón MIN6³⁵.

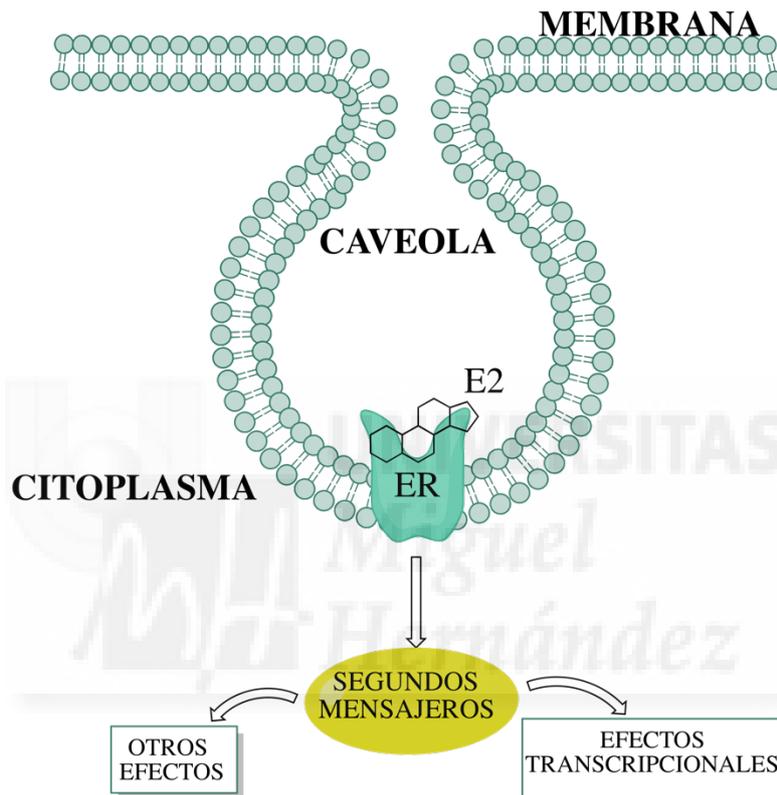


Figura 4. Vía No Clásica. ER α y ER β se localizan en la caveola, donde se asocian con otras moléculas de señalización, facilitando de ese modo la interacción y señalización intracelular rápida, además de poder modular la expresión génica.

1.3.2. Papel Fisiológico de los Receptores de Estrógenos

Los ER controlan una amplia variedad de procesos fisiológicos, y están implicados en numerosas enfermedades. A continuación se presentan algunas de las principales áreas de participación de estos:

- **Sistema Cardiovascular:** En numerosos estudios se ha relacionado el nivel de estrógenos con una protección frente a enfermedades cardiovasculares en mujeres.

Existen varios enfoques que tratan de explicar el modo en el que los estrógenos proporcionan esta protección cardiovascular. Uno de estos enfoques está relacionado en como los estrógenos participan en el metabolismo de las lipoproteínas. Otros efectos de los estrógenos están relacionados con el proceso de hemostasis, la liberación de factores relajantes en las células endoteliales y efectos directos sobre receptores de membrana del músculo liso vascular¹⁹.

- **Sistema nervioso central:** Los estrógenos pueden ejercer efectos en el cerebro, incluyendo la función cognitiva, la coordinación del movimiento, dolor y neuroprotección. Estudios clínicos recientes han demostrado el efecto protector de los estrógenos frente a diversas enfermedades neurodegenerativas. Se han descrito diversos mecanismos por los que los estrógenos pueden proporcionar neuroprotección en enfermedades como el Alzheimer y Parkinson, a través de la reducción del estrés oxidativo, aumentando el flujo sanguíneo cerebral, y aumentando el transporte de glucosa¹⁶.
- **Sistema esquelético.** Los estrógenos tienen un papel importante en el metabolismo óseo y la homeostasis, produciendo efectos significativamente beneficiosos sobre el crecimiento del esqueleto y la maduración de los huesos³². Tanto la osteoporosis temprana como la tardía son causadas por un aumento de la resorción ósea tanto en mujeres como en hombres, la cual se asocia con una deficiencia de estrógenos. Los estrógenos reducen la resorción ósea y promueven la formación de hueso, facilitando su mineralización⁴⁰.
- **Tejido Adiposo.** El tejido adiposo blanco se considera un órgano endocrino por su capacidad para almacenar y metabolizar las hormonas. Los estrógenos regulan tanto el metabolismo como la localización del tejido adiposo blanco y tienen un papel clave en la adipogénesis, la deposición de tejido adiposo, lipogénesis, lipólisis, y la proliferación de adipocitos¹⁶. Un exceso de acumulación de tejido adiposo en la región central del se correlaciona con un mayor riesgo de trastornos, incluyendo diabetes tipo 2, hiperlipidemia, hipertensión, y la aterosclerosis²⁶.

1.3.3. Receptores de estrógeno en la célula β

El 17- β estradiol es una hormona pleiotrópica que junto con los receptores de estrógeno ejerce cierto control sobre la homeostasis glucémica. Desde hace mucho tiempo se conocen efectos estrogénicos sobre diversos aspectos fisiológicos de los islotes de Langerhans y se considera un regulador de las funciones de las células β pancreáticas. En roedores, el tratamiento con E2 protege a la célula β pancreática contra varias lesiones asociadas tanto a la diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) como a la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). Estas lesiones incluyen el estrés oxidativo, la lipotoxicidad, y la apoptosis²⁵.

En los seres humanos, E2 invierte el efecto de la menopausia en el metabolismo de la glucosa y la insulina, lo que resulta en un aumento de la secreción de insulina pancreática, así como la mejora de la sensibilidad a insulina^{9, 38}.

Estudios en ratones han sugerido que una exposición a E2 a largo plazo aumenta el contenido de insulina, la expresión del gen de la insulina y la liberación de insulina sin modificar la masa de células β . También se ha comprobado que E2 aumenta de forma aguda la secreción de insulina estimulada por glucosa a concentraciones fisiológicas a través de la acción del ER α tanto in vitro como in vivo^{2, 28}. Además, se ha demostrado que E2, actuando principalmente a través de este receptor, protege las células β pancreáticas de apoptosis inducida por estrés oxidativo en ratones. A pesar de que ER α parece ser el subtipo dominante para transmitir la respuesta estrogénica en el páncreas, el papel de ER β también podrían ser importante. Ratones deficientes en ER α han mostrado hiperplasia leve de los islotes y retraso en la primera fase de la liberación de insulina⁶. A diferencia de los receptores de estrógenos nucleares clásicos que actúan activados por ligando, en las células β los receptores residen principalmente en lugares extranucleares²⁵.

1.4. El Retículo Endoplasmático

El retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo presente en la mayoría de tipos celulares de los organismos eucariotas que consiste en una red de membranas denominadas cisternas, que son una prolongación de la membrana externa que rodea el núcleo celular.

Existen dos tipos de RE: el retículo endoplasmático rugoso (RER) y el retículo endoplasmático liso (REL). Ambas formas comparten tres funciones principales: síntesis, almacenamiento y transporte de biomoléculas, pero es el REL el encargado de la síntesis de ácidos grasos, esteroides y lípidos. Es aquí donde se transforma el colesterol en hormonas esteroideas. El REL también presenta algunas funciones específicas de tejido: en las células del riñón y del hígado participan en la detoxificación de productos metabólicos de desechos, fármacos y alcohol al contener grandes cantidades de citocromo P450; en el músculo, se conoce como retículo sarcoplásmico y se encarga del almacenamiento y liberación de iones de calcio (Ca^{2+}) necesarios para la contracción muscular. El RER se encarga de la síntesis y plegamiento de proteínas. Las modificaciones de estas proteínas tienen lugar en el interior del RER, conocido como lumen o luz del retículo⁴².

El lumen del RE es un entorno único, que contiene la mayor concentración de Ca^{2+} dentro de la célula debido al transporte activo de iones de calcio por las Ca^{2+} ATPasas. El lumen presenta un ambiente oxidativo, crucial para la formación de enlaces disulfuro y el plegamiento apropiado de las proteínas. Debido a su papel en el plegamiento de proteínas y el transporte, el RE también es rico en chaperonas dependientes de Ca^{2+} , como Grp78, Grp94 y calreticulina, que estabiliza los intermedios de plegamiento de proteínas⁴⁵.

1.4.1. Estrés del Retículo Endoplasmático

Como hemos comentado anteriormente, la luz del retículo presenta un entorno oxidativo y único, lo que conduce a que el RE sea altamente sensible a situaciones de estrés que perturben los niveles de energía celular, el estado redox, la falta de glucosa o la concentración de Ca^{2+} . Tales tensiones reducen la capacidad del RE para plegar proteínas, lo que resulta en la acumulación y agregación de proteínas no plegadas, una condición conocida como estrés del RE. Esta agregación de proteínas es tóxica para las células y muchas enfermedades están relacionadas con dicho proceso, incluyendo enfermedades neurodegenerativas y diabetes⁴⁰.

Cuando la capacidad del ER para plegar proteínas correctamente se ve comprometida, se activa la respuesta a estrés (*Unfolded Protein Response, UPR*), altamente conservada en mamíferos. La UPR detiene la síntesis proteica mientras que la regulación positiva de chaperonas del RE y otros componentes reguladores de la vía secretora dotan a la célula de una oportunidad de para

restaurar la homeostasis. Sin embargo, si el daño es demasiado fuerte y la situación no puede ser corregida, la UPR iniciará la apoptosis⁸.

1.4.2. La Respuesta a Estrés (UPR)

Una serie de condiciones tales como la homeostasis alterada de lípidos, la perturbación de la señalización de calcio, el estrés oxidativo, la inhibición de la glicosilación y el aumento de la síntesis de proteínas pueden causar estrés del RE y activar la UPR.

La UPR se caracteriza por la disminución de la traducción proteica, el aumento de la expresión de las chaperonas, que promueven el plegamiento correcto de las proteínas y la activación de un sistema de degradación de proteínas asociado al RE (*Endoplasmic reticulum-associated degradation*, ERAD). Estos tres mecanismos disminuyen el riesgo de errores en el plegamiento de las proteínas. El principal objetivo de la UPR es disminuir el estrés de retículo, reduciendo la cantidad de proteínas mal plegadas y restablecer así la función normal del RE.

En los mamíferos, existen tres proteínas transmembrana del retículo endoplasmático, la quinasa PERK, la quinasa IRE1 y el factor de transcripción ATF6, que responden a la acumulación de proteínas desplegadas en el lumen. Estas proteínas transmembrana se encuentran en un estado inactivo al estar asociadas a la chaperona GRP78/BiP. Esta chaperona reside en el RE y presenta una doble función: la regulación del plegamiento de proteínas y la activación de la UPR ante estrés de RE. Cuando se acumulan proteínas desplegadas, GRP78 se disocia de estos receptores y pasan a su estado activo, lo que conduce a la activación de la UPR⁴⁰ (Figura 5).

PERK se disocia de GRP78/BIP y se dimeriza. El dímero PERK fosforila al factor de iniciación eucariota 2 (eIF2 α) para disminuir la traducción general de proteínas y disminuir la carga de proteínas que llegan al RE. eIF2 α fosforilado también estimula la traducción selectiva de ATF4, que permite de nuevo la síntesis proteica algunas horas después del estrés. ATF4 también induce la expresión de CHOP, una señal pro-apoptótica¹⁴.

En respuesta al aumento de proteínas mal plegadas en el RE, GRP78/BIP se disocia de IRE1 y éste se dimeriza. IRE1 procesa el ARN mensajero (ARNm) del factor de transcripción XBP1 generando un ARNm maduro (XBP1s). XBP1s es translocado al núcleo y se une a promotores de genes que codifican chaperonas y enzimas involucradas en el proceso de ERAD¹⁴.

Al disociarse ATF6 de GRP78, ATF6 viaja al aparato de Golgi para ser procesado por las enzimas S1P y S2P, produciendo así un factor de transcripción activo. El fragmento ATF6 N-terminal, pATF6 (N), induce la transcripción de chaperonas del RE, como GRP78/BiP. Además, induce la activación transcripcional de XBP1 y chaperonas^{44, 14}.

El resultado de la respuesta a estrés es la atenuación de la traducción de proteínas, el aumento de la transcripción de chaperonas y la capacidad de plegado del retículo así como la degradación de proteínas mal plegadas. Cuando esta respuesta no es suficiente, el estrés del RE induce la activación de señales de muerte celular programada, la más estudiada de las cuales es la apoptosis⁴⁶.

1.4.3. Apoptosis promovida por estrés del RE

En condiciones de estrés crónico o prolongado la respuesta a estrés conduce a la célula a una muerte por apoptosis. La señalización a través de la vía PERK-ATF6-IRE1 puede desencadenar señales pro-apoptóticas durante un estrés de RE prolongado.) La apoptosis inducida por estrés del RE implica varios mecanismos que incluyen la activación de caspasas, quinasas (JNK) y factores de transcripción de la apoptosis (CHOP)^{39, 14} (Figura 5).

JNK son un conjunto de enzimas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que responden a una gran variedad de señales de estrés como radiación ultravioleta, choque térmico y estrés osmótico que se encuentran implicadas en procesos de apoptosis³¹.

CHOP es una proteína homóloga a C/EBP que se encuentra en el citosol a niveles muy bajos en una situación normal. Sin embargo, se expresa fuertemente en situaciones de estrés en una amplia variedad de células y se acumula en el núcleo. El gen CHOP fue identificado durante la búsqueda de genes inducidos por estrés genotóxico como la radiación UV y agentes alquilantes como el metanosulfonato de metilo. En estudios posteriores se observó que CHOP también era inducido por el agotamiento de nutrientes tales como la escasez de glucosa y aminoácidos Otro inductor potente de CHOP es la tapsigargina, que promueve el estrés de RE por el agotamiento de las reservas de Ca^{2+} y ditiotreitól, que interrumpe la formación de enlaces disulfuro, alterando fuertemente las funciones del RE³⁰. CHOP puede ser inducida por ATF6, XBP1 y PERK, pero la vía PERK-eIF2 α es dominante.

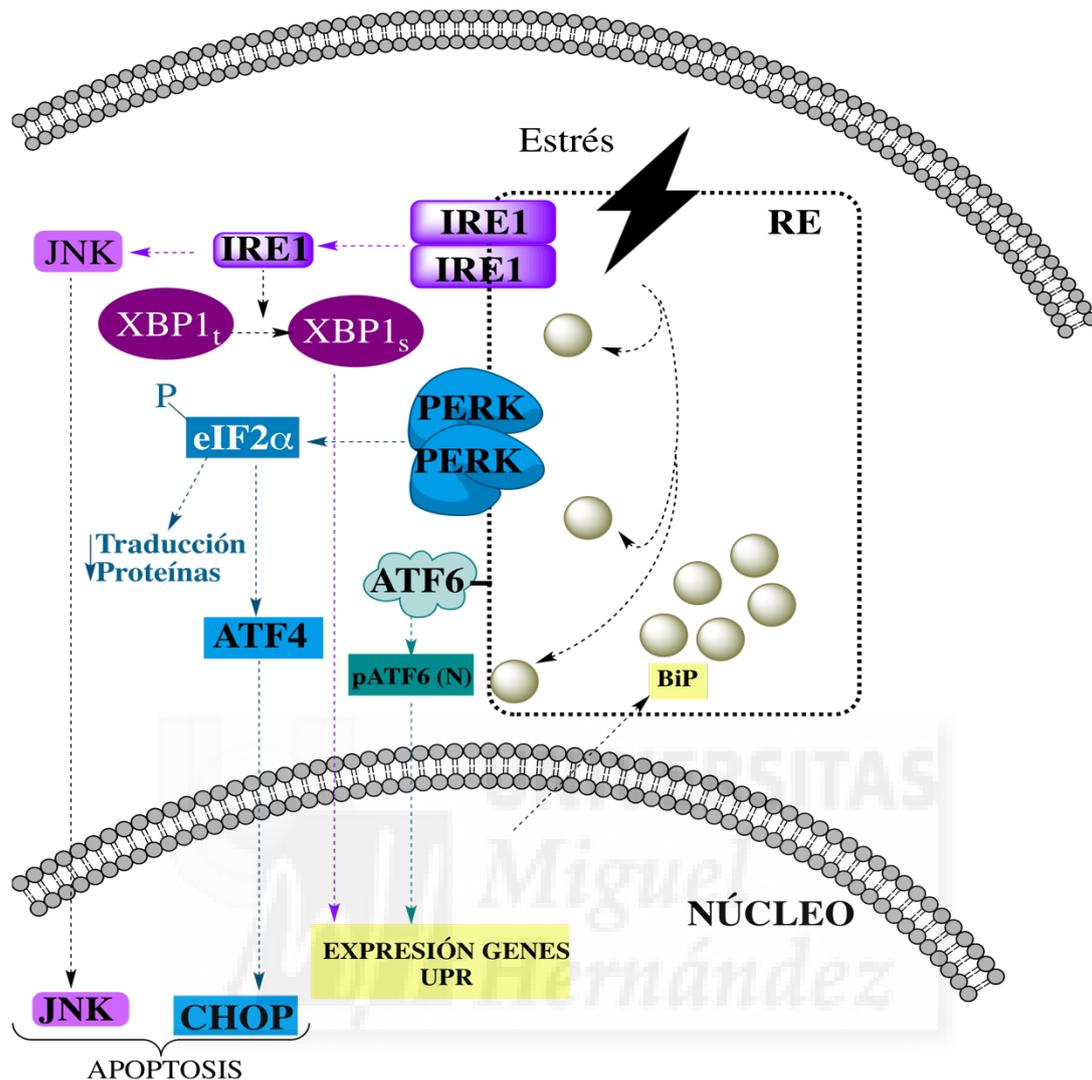


Figura 5. Respuesta a estrés del RE. En el estado fisiológico normal, las tres proteínas transmembrana permanecen inactivas debido a su unión con la chaperona GRP78/BiP. En respuesta a estrés, GRP78/BiP se disocia de los transductores de estrés de RE y se produce la activación de la UPR. El objetivo de la respuesta a estrés es restaurar la homeostasis del RE. Cuando el estrés de RE es prologando y/o excesivo, se desencadenará la apoptosis a través de JNK y CHOP. *Modificado de Szegezdi et. Al. (2006)*³⁹

1.4.4. El Retículo Endoplasmático en células beta

Las células β presenta un retículo endoplasmático altamente desarrollado, lo que refleja su papel en la secreción de grandes cantidades de insulina y diversas glicoproteínas. Los niveles de expresión de IRE1 y PERK en este tipo celular son bastante altos, lo cual refleja la alta participación en la secreción proteica. En estudios con ratones genéticamente modificados que

tenían la vía PERK-eIF2 inactivada y seres humanos que carecen del receptor PERK se observó que las células β eran más susceptibles al estrés del RE, muestra muerte de células y desarrollo de hiperglucemia progresiva con el envejecimiento. Por lo tanto, las células β pueden sufrir de estrés del RE incluso bajo condiciones fisiológicas y la alteración en la respuesta al estrés del RE conduce a la apoptosis. La apoptosis de célula β pancreática inducida por óxidos de nitrógeno es CHOP-dependiente, lo que también implica estrés de RE como causante de la muerte de células β ^{30, 44, 45}.

Se ha postulado que el estrés del RE es el resultado de la mayor demanda de biosíntesis inducida por la hiperglucemia crónica, AGL elevada, y el exceso de nutrientes crónico en la célula β .⁴⁷

1.5. La célula beta y ácidos grasos libres

La célula β puede importar ácidos grasos a través de la difusión simple a través de la membrana plasmática o por medio de transportadores de ácidos grasos. Una vez dentro de la célula, los ácidos grasos se utilizan como combustible o como intermediarios en el metabolismo de triglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos y colesterol. Cuando la célula β está expuesta de forma aguda a los ácidos grasos, la secreción de insulina estimulada por glucosa aumenta. Se han descrito varios mecanismos para este efecto insulínico, incluyendo la alteración de la relación ATP/ADP, cambios en la actividad de los canales iónicos, y la activación del receptor acoplado a la proteína G 40 (GPR40). El efecto estimulador de un ácido graso depende de su saturación, donde los ácidos grasos saturados, tales como palmitato o estearato son estimuladores más potentes que los ácidos grasos monoinsaturados, tales como palmitoleato u oleato.

1.6. La célula beta y enfermedades metabólicas

La DMT2 es una enfermedad compleja que se caracteriza por un mal funcionamiento de la regulación de la homeostasis de la glucosa. La insulina es secretada por las células β pancreáticas en respuesta a niveles elevados de glucosa en plasma, existiendo varios factores que pueden modificar su secreción. La deficiencia de insulina es uno de los eventos tempranos en la patogénesis dicha enfermedad. En estas primeras etapas, la célula β pancreática se adapta a la resistencia a la insulina mediante el aumento de su masa y función. Si la hiperglucemia y elevadas concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) se mantienen, tendrá un impacto

negativo en la función de las células β . Esto puede suceder por numerosos mecanismos, incluyendo la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), alteraciones en las vías metabólicas, aumentos en la concentración de calcio intracelular y la activación de estrés del retículo endoplasmático. Estos procesos afectan negativamente a las células β por alteración de la secreción de insulina, disminución de la expresión del gen de insulina y, finalmente, causando apoptosis¹².

La dislipidemia se caracteriza por un aumento de los AGL en circulación. Los altos niveles de AGL suelen asociarse con frecuencia a la resistencia a insulina, una condición que está asociada con la hiperglucemia y la hiperinsulineamia, condiciones que se encuentran en DMT2 y la obesidad. Un efecto directo de los AGL sobre la secreción de insulina puede explicar la coexistencia de la hiperlipidemia y la hiperinsulinemia Experimentos en humanos sugieren que la elevación de los niveles de AGL en individuos sanos tiene efectos estimulantes sobre la secreción de insulina, pero pueden contribuir a la insuficiencia progresiva de células β en algunos individuos con predisposición genética a la diabetes. Además, la evidencia actual sugiere que los efectos deletéreos de los lípidos se observan predominantemente en presencia de alto contenido de glucosa. A pesar de que se ha aceptado que el metabolismo de los AGL estimula la secreción de insulina, el mecanismo exacto por el cual esto ocurre siguen siendo desconocido^{29, 47}.

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La deficiencia de insulina es uno de los eventos tempranos en la patogénesis de DMT2, debiéndose probablemente a una disminución en la capacidad secretora de la célula β pancreática, así como a una pérdida de la masa de este tipo celular. Con respecto a esto, se ha demostrado que la exposición a corto plazo a ácidos grasos induce la secreción de insulina, mientras que la exposición a largo plazo tiene un efecto perjudicial sobre la función de las células β y la supervivencia^{7,18}. Se han propuesto diferentes mecanismos de cómo una exposición a largo plazo de palmitato puede afectar a las células β , incluyendo el aumento de la apoptosis²⁴ y la activación de estrés en el RE²¹. Varias investigaciones sugieren que el estrés de RE es uno de los principales mecanismos subcelulares que subyacen al fallo funcional de la célula β . Los estudios sugieren que la hormona sexual 17β -estradiol, producida mayoritariamente en el ovario, contribuye a la preservación de la liberación de insulina en estados prediabéticos¹⁴.

En este laboratorio se describió el efecto insulínico del 17β -estradiol en el islote de Langerhans pancreático de ratón. Se observó que el E2, a concentraciones fisiológicas, potencia en un 30% la secreción de insulina producida por 8mM glucosa. Este efecto era rápido y estaba mediado por un mecanismo no genómico, puesto que no se vio bloqueado por la utilización de inhibidores de la síntesis de proteínas y de ARN. Utilizando E2 unido a peroxidasa, se demostró un lugar de unión para estradiol en la membrana plasmática de las células que podría estar mediando esos efectos rápidos del estradiol²⁸.

Debido a la implicación de los estrógenos en la supervivencia de la célula β y basándonos en estudios anteriores, el objetivo del presente Trabajo Fin de Grado es el estudio del papel de la señalización estrogénica en la preservación de la célula β pancreática cuando está expuesta a un medio con una concentración elevada de ácidos grasos libres, así como otros estímulos nocivos que perjudican la viabilidad de la célula β y la secreción de insulina. Con este propósito, se utilizará un modelo in vitro de exposición combinada a palmitato y agonistas específicos de los receptores de estrógenos ER α y ER β para estudiar la contribución individual sobre la supervivencia celular de los receptores estrogénicos clásicos en condiciones de lipotoxicidad empleando la línea celular insulinosecretora MIN-6.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivo Celular

3.1.1. MIN-6 y establecimiento de líneas estables

En este trabajo se ha utilizado la línea celular de insulinoma de ratón, MIN-6. Estas células se hicieron crecer hasta un 80-90% de confluencia en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (SIGMA, D5030) suplementado con 25 mM Glucosa, 15% suero fetal bovino (FBS), 0.9 mM Piruvato sódico (gibco by Life Technologies), 0.1 mg/mL Penicilina-Streptomina (P/S) (gibco by Life Technologies) y 72 μ M de mercaptoethanol (β -ME) (SIGMA, M3148). Las células se cultivaron a 37°C con 5% CO₂ en atmósfera húmeda.

3.1.2. Preparación de medio de mantenimiento y descongelación MIN-6

En primer lugar se debe preparar DMEM sin suplementar, a partir del cual se realizará el medio de cultivo. Se utiliza 8.3 gramos de DMEM sin suplementar por litro de medio a preparar. El protocolo de preparación es el siguiente:

1. Se mide el 90% del volumen final de agua que necesitaremos. El agua debe ser agua destilada autoclavada y su temperatura debe estar entre 15-20°C.
2. Mientras se agita suavemente el agua, añadir DMEM en polvo. Remover hasta que se disuelva. No calentar. Como DMEM es fotosensible, se deberá tapar el vaso de precipitado con papel de aluminio.
3. Se enjuaga el frasco original con una pequeña cantidad de agua para eliminar todo rastro de polvo y se añade a la disolución. Hay que tener en cuenta este volumen para añadirlo al volumen medido anteriormente.
4. Se añaden 3.7 gr de bicarbonato sódico por cada litro de volumen final de medio que se está preparando. Remover hasta que se disuelva.
5. Mientras se agita, se ajusta el pH del medio 0.1-0.3 unidades de pH por debajo del pH deseado, ya que puede aumentar durante la filtración. Ajustar el pH entre 7.2-7.3
6. Se lleva la solución a un matraz aforado y se añade agua adicional hasta alcanzar el volumen final.
7. Esterilizar inmediatamente por filtración utilizando una membrana con una porosidad de 0.22 μ M. Conservar en condiciones asépticas en un recipiente estéril
8. Cuando se requiera, suplementar como se ha descrito anteriormente.

3.1.3. Tripsinización

Una vez alcanzado el nivel óptimo de confluencia, las células son lavadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la realización de la lisis con tripsina. Es importante atemperar todos los reactivos, medio de cultivo, tripsina y PBS antes de utilizarlos. La solución de tripsina utilizada es: 0.05% Tripsina (Sigma, Madrid) + 0.02% EDTA (Sigma, Madrid) y se aplica durante 3 minutos a 37°C. Para finalizar la reacción enzimática se añaden 3 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con 15%FBS. A Continuación, se centrifuga el tubo a 1500 rpm durante 5 minutos para coleccionar las células disgregadas en el fondo. Tras la eliminación de sobrenadante se resuspenden las células en el medio de cultivo adecuado para llevar a cabo el plaqueo o el mantenimiento de la línea en un flask.

3.1.4. Congelación de MIN-6

Las células sobrantes de la tripsinización y el plaqueo se conservan en tanques de nitrógeno hasta volver a ser utilizadas. Para llevar a cabo la congelación de dichas células, se siguió este protocolo:

1. Se centrifugan las células a 1000 r.p.m. durante 10 minutos para reunir las células disgregadas en el fondo.
2. Durante estos 10 minutos, se prepara el medio de congelación, compuesto por 95% de medio DMEM suplementado sin antibiótico y 5% de sulfóxido de dimetilo (DMSO). La cantidad de medio preparado dependerá del número de células y el número de criotubos a utilizar.
3. Una vez finalizada la centrifugación, se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en el medio de congelación preparado anteriormente.
4. Se añade en cada criotubo 1 mL de la mezcla de medio de congelación y células que hemos realizado en el punto anterior.
5. Se introducen los criotubos en un recipiente especial que contiene propanol y se coloca en el congelador de -80°C. La función del propanol es conseguir una disminución de la temperatura constante, de 1°C/minuto, hasta alcanzar la temperatura de -80°C.
6. Al día siguiente, se introducen los criotubos en el tanque de nitrógeno líquido.

3.2. Determinación de la viabilidad celular de MIN-6. MTT

Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue (MTT) es una medida indirecta de la viabilidad celular. MTT es una solución amarillenta y el ensayo se basa en la habilidad de las deshidrogenasas

mitocondriales de células viables en reducir MTT (C,N-diphenyl-N 4-5- dimethyl thiazol-2-yl tetrazolium bromide) y formar cristales azules de formazán.

Las células MIN6 se siembran a diferentes densidades en placas de 96 pocillos en medio DMEM suplementado con 25 mM Glucosa y 15% *Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum* (CHARCOAL). Este suero ha sido absorbido con carbón activo que elimina las sustancias no polares y lipófilicas (virus, factores de crecimiento, hormonas y citosinas) independientemente de su peso molecular, pero tiene poco efecto en glucosa, aminoácidos, etc. Las células serán incubadas con dicho suero para retirar selectivamente componentes apolares, como por ejemplo hormonas esteroideas, permitiéndonos controlar estrechamente la concentración de componentes estrogénicos en el medio de cultivo.

Estas células se cultivaron posteriormente durante 48h-72 horas a 37°C con 5% CO₂ en atmósfera húmeda.

A partir de entonces, el medio se retira y se sustituye con diferentes tratamientos, los cuales serán descritos posteriormente, y se mantiene durante 24 y/o 48 horas. Después del periodo de incubación, se retira cuidadosamente el contenido de los pocillos y se añade en cada uno de ellos 90 µL de medio DMEM suplementado con charcoal y 10 µL MTT a partir de una solución stock de 5mg/mL preparada en PBS. Después, se mantiene durante 3 horas a 37 ° C. A continuación, se desecha el sobrenadante, se añade 100µL de DMSO y se mantiene en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. La intensidad se mide colorimétricamente a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas. El porcentaje de viabilidad celular se calculó a partir de los valores promedio de absorbancia a 570 nm obtenidos de la siguiente ecuación:

$$\% Viabilidad celular = \frac{Abs\ 570\ nm\ Muestra}{Abs\ 570\ nm\ Control} \times 100$$

3.3. Conteo celular

El número de células se determinó mediante el uso de un hematocitometro o cámara de Neubauer. Para ello, se prepara una muestra con una concentración apta para el recuento, sin utilizar concentraciones muy altas, ya que la probabilidad de cometer errores en el conteo

aumenta, además del tiempo y esfuerzo necesario para realizar un recuento con fiabilidad.

Se prepara la mezcla formada por 90 μL de medio celular y 10 μL del cultivo celular tras la tripsinización. Se toman 10 μL de la mezcla preparada y se coloca en la cámara de Neubauer. Como en este caso la concentración celular frecuentemente suele ser muy alta, se suele utilizar un orden de conteo en forma de zig-zag para facilitar el recuento.

Este proceso se repite dos veces mínimo para verificar que los datos obtenidos en el recuento no son erróneos. La fórmula para recuento con cuadros grandes en cámara de Neubauer es:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10.000}{\text{número de cuadros}}$$

Como se ha aplicado una dilución, se deberá transformar la concentración obtenida durante el recuento celular en la concentración de la muestra original. En este caso se tendrá que dividir el resultado por la dilución aplicada:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10.000}{\text{número de cuadros} \times \text{dilución}}$$

Para una dilución de 1:10. Dilución = 0,1.

3.4. Tratamientos

3.4.1. Preparación de la solución de palmitato y medio de exposición BSA

Una solución de palmitato de 50 mM se preparó en un tubo de tipo falcon con 69,6 mg de Palmitato sódico (SIGMA, P9767-56) en 5 mL de Etanol 90% mediante calentamiento a 62°C con agitación. El etanol (control) se somete al mismo proceso de calentamiento en otro tubo de tipo falcon.

El medio de exposición a ácidos grasos libres (AGL) se preparó con DMEM suplementado con 25 mM glucosa, 5% CHARCOAL, 0.75% Suero Bovino Albumina (BSA) Fracción V, libre de ácidos grasos (ROCHE), 0.9 mM Piruvato sódico (gibco by Life Technologies), 0.1 mg/mL P/S (gibco by Life Technologies) y 72 μM de β -ME (SIGMA, M3148)

Para añadir el palmitato al medio de cultivo, el stock debe mantenerse caliente hasta que es añadido (Thermoblock a 62°C y con agitación). El etanol, utilizado como vehículo se somete al mismo proceso de calentamiento.

Se añade 10 μL de medio de exposición a AGL/ 990 μL de medio de exposición, descartando la primera toma de volumen del stock de palmitato y etanol. Tras la adición del palmitato al medio de exposición, pipetear vigorosamente y vortear.

3.4.2. Preparación de la solución de thapsigargina

La thapsigargina es un agente conocido de inducción de estrés del ER. Se añade 1 μL stock de thapsigargin (SIGMA, T9033) / 999 μL de medio DMEM suplementado con 15% CHARCOAL

3.4.3. Agonistas: DPN Y PPT

Los agonistas son sustancias capaces de unirse a un receptor celular, provocando una respuesta determinada en la célula, generalmente similar a la producida por la sustancia fisiológica.

Se prepara la solución de stock de DPN (agonista del ER- β) usando DMSO. Se añaden 10 mg en 2.089 mL de DMSO y se divide en alícuotas de 100 μL que se mantendrán a una temperatura de -20°C.

Se prepara la solución de stock de PPT (agonista del ER- α) usando DMSO. Se añaden 10 mg en 1.29 mL de DMSO y se divide en alícuotas de 50 μL que se mantendrán a una temperatura de -20°C.

3.4.4. Exposición a estresores y agonistas

Tras la resuspensión de los agonistas descrita anteriormente, se llevó a cabo la preparación de los tratamientos para cada una de las condiciones. La solución stock 20 nM de los agonistas en DMSO se utilizó para preparar una solución intermedia 10 μM en agua estéril. Al mismo tiempo, se preparó una solución control con el vehículo (DMSO) sin los agonistas, 10 μM de DMSO en agua estéril (H_2O)_d

Para los controles positivos de palmitato y tapsigargina (sin agonistas) se preparó una solución 100 nM del vehículo (DMSO) en el medio adecuado a cada estresor: Medio de exposición a AGL en el caso de palmitato y medio CHARCOAL en el caso de tapsigargina.

Por último se prepararon las soluciones dosis-respuesta de 100 nM, 10 nM y 1 nM de los agonistas utilizando la solución intermedia junto con el medio adecuado para cada uno de los estresores. En el esquema siguiente se describe la preparación de las diferentes soluciones, de forma que se mantenga la misma concentración de DMSO en todas ellas:

<u>VEH 10 μM</u> 10 mL(H ₂ O) _d 5 μ L DMSO	<u>AGONISTA 10 μM</u> 10 mL(H ₂ O) _d 5 μ L DPN o PPT
<u>VEH 100 nM</u> 1 mL Medio + estresor 100 μ L VEH 10 μ M	<u>AGONISTA 100 nM</u> 5 mL Medio + estresor 50 μ L AGONISTA 10 μ M
	<u>AGONISTA 10 nM</u> 5 mL VEH 100 nM 50 μ L AGONISTA 100 nM

3.5. Análisis estadísticos

Todos los datos se expresan como media \pm error estándar de la media (s.e.m). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, EE.UU.), con significación estadística de $p < 0,05$. Las comparaciones entre múltiples grupos se hicieron mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples. Las comparaciones entre los dos grupos fueron evaluados mediante la prueba *unpaired* t-test.

4. RESULTADOS

4.1. Palmitato y Tapsigargina causan disminución de la viabilidad en MIN-6

Las células expuestas a una solución de Palmitato 0.5 mM fueron incubadas 24h y/o 48h. Tras dicha incubación se llevó a cabo la medición de la viabilidad celular mediante MTT. Se midió la intensidad en un lector de microplacas y se consideró el control como el 100% de viabilidad. Los resultados señalan una disminución en la viabilidad celular tanto a las 24 horas, donde la viabilidad era del 81.6%, como a las 48 horas, donde la supervivencia celular era del 66.25%. Por lo tanto, la disminución se hace más notable transcurridas 48 horas. (Figura 6).

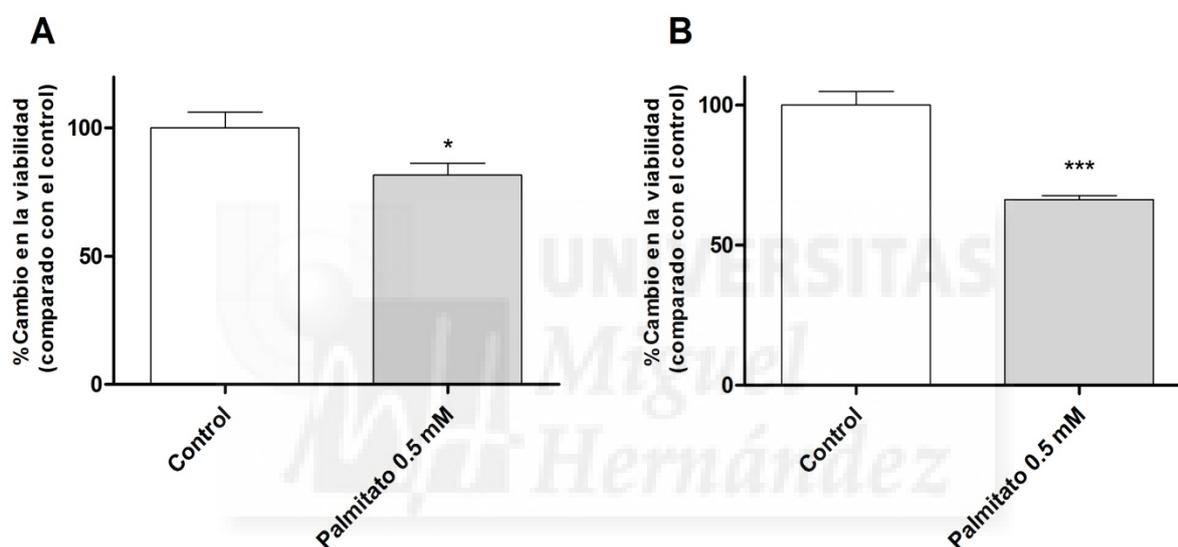


Figura 6. Cambio en la viabilidad en células MIN-6 a las 24 horas (A) y a las 48 horas (B) de la exposición a Palmitato. Cuantificación de la viabilidad en células MIN-6 en ausencia (barra blanca) o presencia de Palmitato (0.5 mM, barra gris). Los datos son expresados como la media \pm s.e.m de 4 experimentos independientes. * $P < 0.1$, *** $P < 0.001$ vs control.

En el caso de la tapsigargina se observa una disminución más drástica en la viabilidad celular, sobre todo a las 48 horas, donde la viabilidad es del 27.61%. La viabilidad a las 24 horas tras la exposición a tapsigargina es del 65.2% (Figura 7).

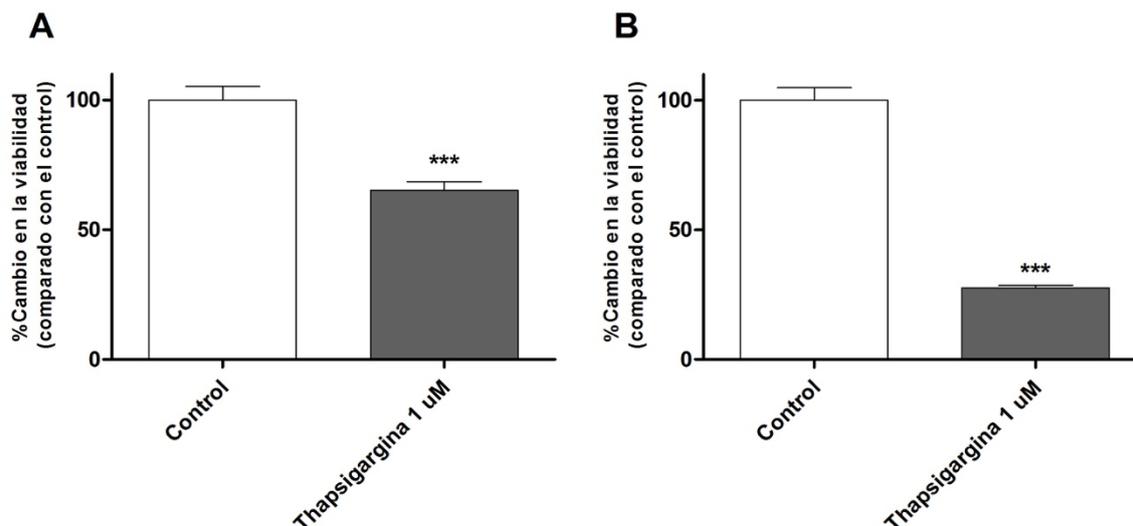


Figura 7. Cambio en la viabilidad en células MIN-6 a las 24 horas (A) y a las 48 horas (B) de la exposición a Thapsigargina. Cuantificación de la viabilidad en células MIN-6 en ausencia (barra blanca) o presencia de Thapsigargina (1 μ M, barra gris oscuro). Los datos se presentan como la media \pm s.e.m de 4 experimentos independientes. *** $P < 0.001$ vs control.

Adicionalmente se comprobó que el uso de medio con 15% CHARCOAL no interfería en los resultados al compararlo con el medio de exposición AGL. No se obtuvieron diferencias significativas en la viabilidad celular entre los medios de cultivo utilizados.

4.2. El antagonista del RE- β , DPN no presenta protección frente a Palmitato, pero sí frente a Thapsigargina

Las células fueron tratadas durante 24 y 48 horas con una solución de palmitato 0.5 mM o thapsigargina 1 μ M que contenía también el antagonista del RE- β a diferentes concentraciones. Transcurrido dicho periodo, se llevó a cabo la medición de la viabilidad celular mediante MTT.

En el caso del palmitato, no se observa protección por parte del DPN, ya que la viabilidad celular se sigue viendo disminuida por el efecto del estresor. Cabe destacar que en concentraciones elevadas de DPN (10-100 nM) se observa una mayor disminución de la viabilidad tanto a 24 como 48 horas, por lo que estas concentraciones de DPN podrían estar afectando a la supervivencia de las células (Figura 8).

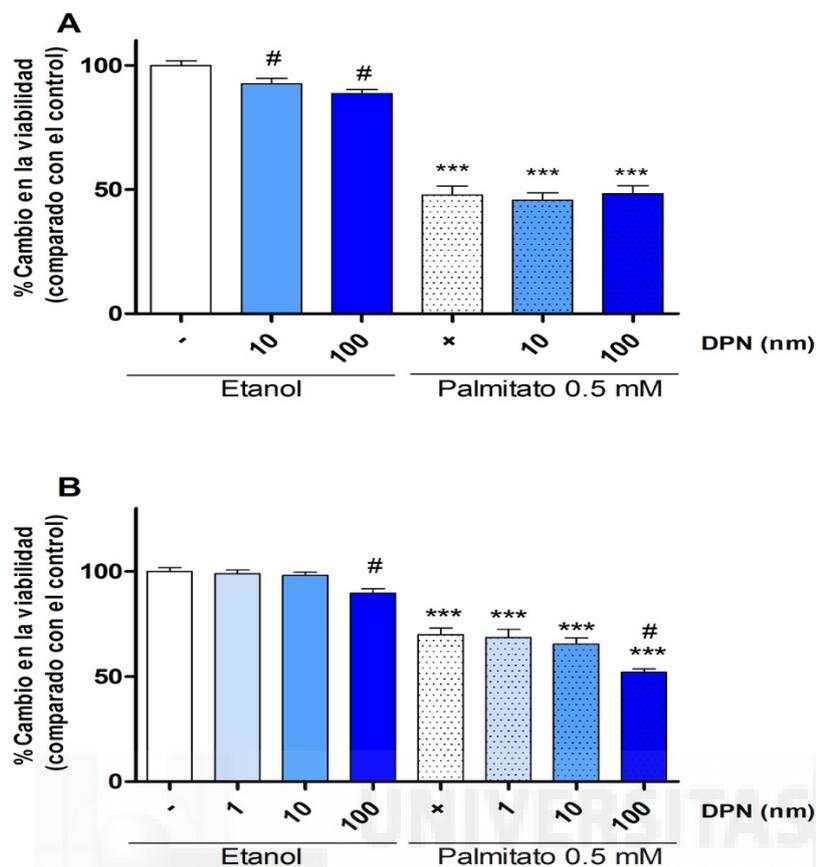


Figura 8. Cambio en la viabilidad en células MIN-6 a las 24 horas (A) y a las 48 horas (B) de la exposición a Palmitato y DPN. Cuantificación de la viabilidad en células MIN-6 en ausencia (barra lisa) o presencia de Palmitato (0.5 mM, barra con patrón de puntos) y con dosis gradual de DPN (1, 10 y 100 nM) en escala de azules. Los datos se presentan como la media \pm s.e.m de 2 a 8 experimentos independientes. Las comparaciones se realizaron mediante *unpaired* t-test junto con ANOVA one way seguido de un test post hoc de Dunnet para comparaciones múltiples. *** $P < 0.001$ vs Control etanol, # $P < 0.05$ vs Control etanol.

Sin embargo, en el caso de la taspigargina se puede observar que a las 24 horas una dosis de DPN 1 nM presenta protección frente al estresor. Esta protección hace que la viabilidad celular con DPN 1 nM sea del 70.55% frente al 65.4% de supervivencia en el control positivo. Con una dosis de DPN de 10 nM se observa una supervivencia cercana al 70%, pero las diferencias respecto al control no son significativas. Transcurridas 48 horas la viabilidad disminuye drásticamente, siendo en los tres casos cercana al 20%, por lo que el agonista no presenta protección (Figura 9).

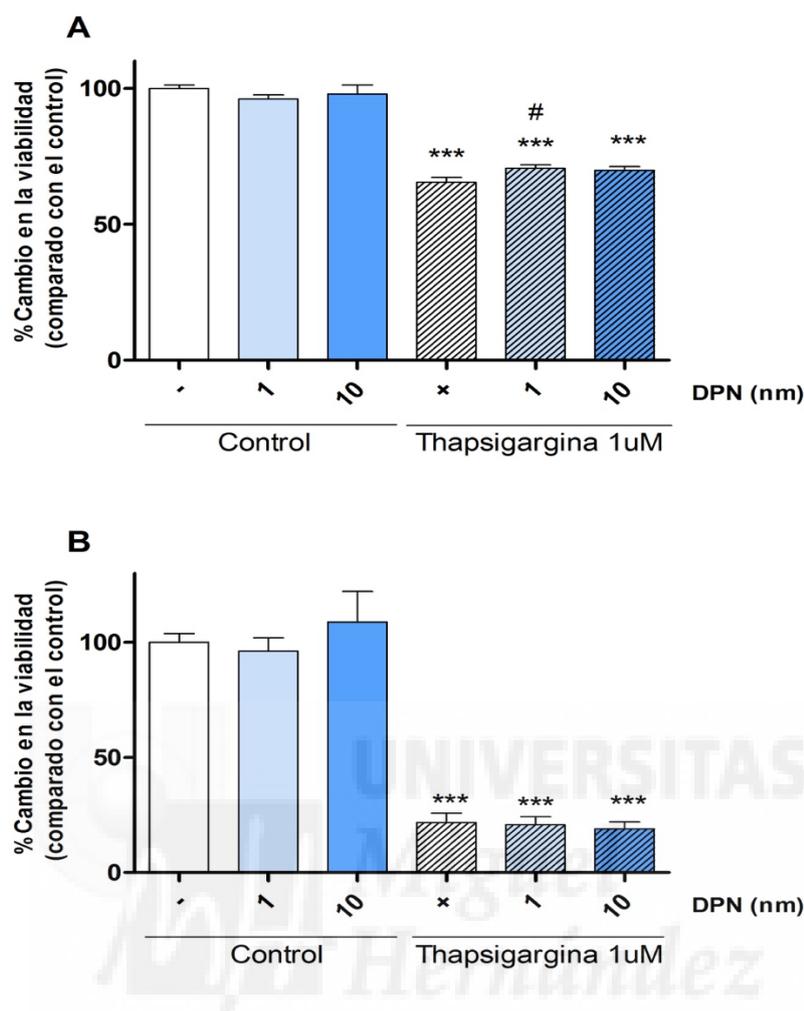


Figura 9. Cambio en la viabilidad en células MIN-6 a las 24 horas (A) y a las 48 horas (B) de la exposición a Tapsigargina y DPN. Cuantificación de la viabilidad en células MIN-6 en ausencia (barra lisa) o presencia de Tapsigargina (1 μ M, barra con patrón de rayas) y con dosis gradual de DPN (1, 10 y 100 nM) en escala de azules. Los datos se presentan como la media \pm s.e.m de 3 experimentos independientes. Las comparaciones se realizaron mediante *unpaired t*-test junto con ANOVA one way seguido de un test post hoc de Dunnet para comparaciones múltiples. *** $P < 0.001$ vs Control, # $P < 0.05$ vs Control

4.3. El antagonista de RE- α , PPT, no presenta protección frente a Palmitato, pero sí frente a Tapsigargina

Al llevar a cabo la medición de la viabilidad celular mediante MTT, se observó que en el caso del palmitato no existe protección por parte del antagonista PPT. Además, en las células tratadas con dosis de 100 nM de PPT se observa una ligera disminución en la viabilidad celular en

comparación con concentraciones menores y/o ausencia de PPT. Sin embargo, estos valores no son significativos. Los valores de supervivencia celular se mantienen entre el 50-65% en las células expuestas a palmitato (Figura 10)

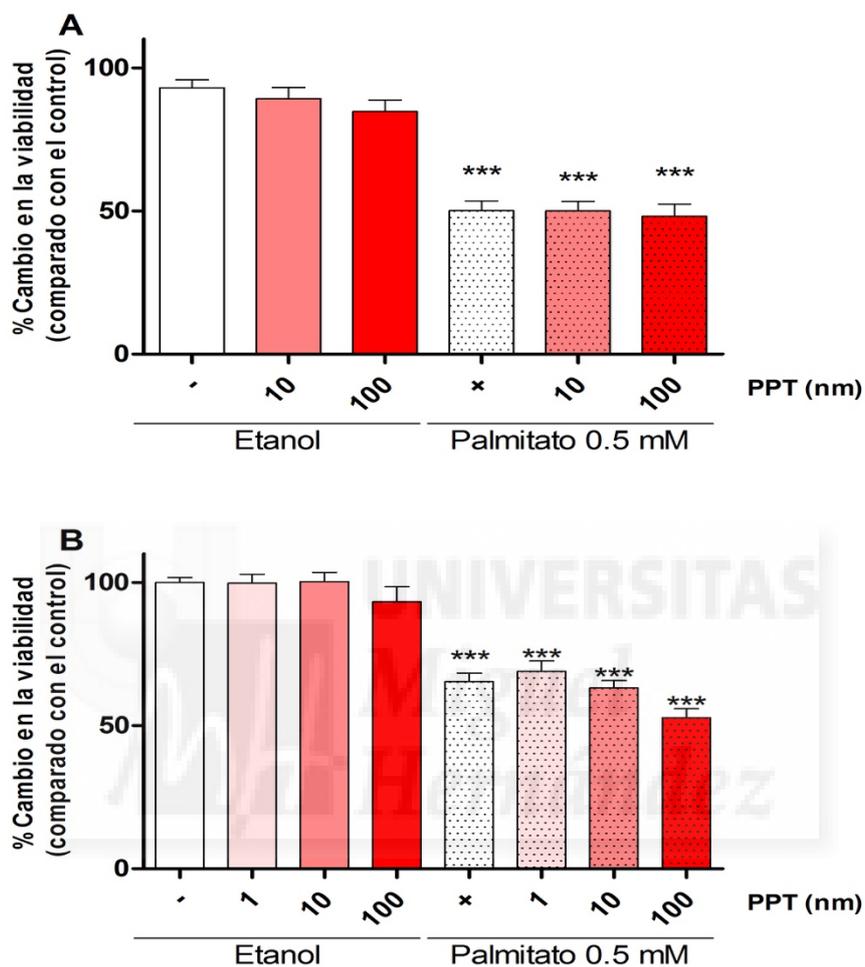


Figura 10. Cambio en la viabilidad en células MIN-6 a las 24 horas (A) y a las 48 horas (B) de la exposición a Palmitato y PPT. Cuantificación de la viabilidad en células MIN-6 en ausencia (barra lisa) o presencia de Palmitato (0.5 mM, barra con patrón de puntos) y con dosis gradual de PPT (1, 10 y 100 nM) en escala de rojos. Los datos se presentan como la media \pm s.e.m de 2 a 8 experimentos independientes. Las comparaciones se realizaron mediante *unpaired* t-test junto con ANOVA one way seguido de un test post hoc de Dunnet para comparaciones múltiples. *** $P < 0.001$ vs Control etanol.

Por otro lado, en el caso de la taspigargina se ha observado una protección frente a esta a las 24 horas con concentraciones de PPT 10 nM, siendo la viabilidad de 73.03%. Sin embargo, en este mismo periodo de tiempo, se ha registrado una disminución de la supervivencia en el control a

esta misma concentración de PPT. Al igual que en el caso del DPN, transcurridas 48 horas desde la exposición a thapsigargina la supervivencia oscila alrededor del 20% y no se observa protección (Figura 11).

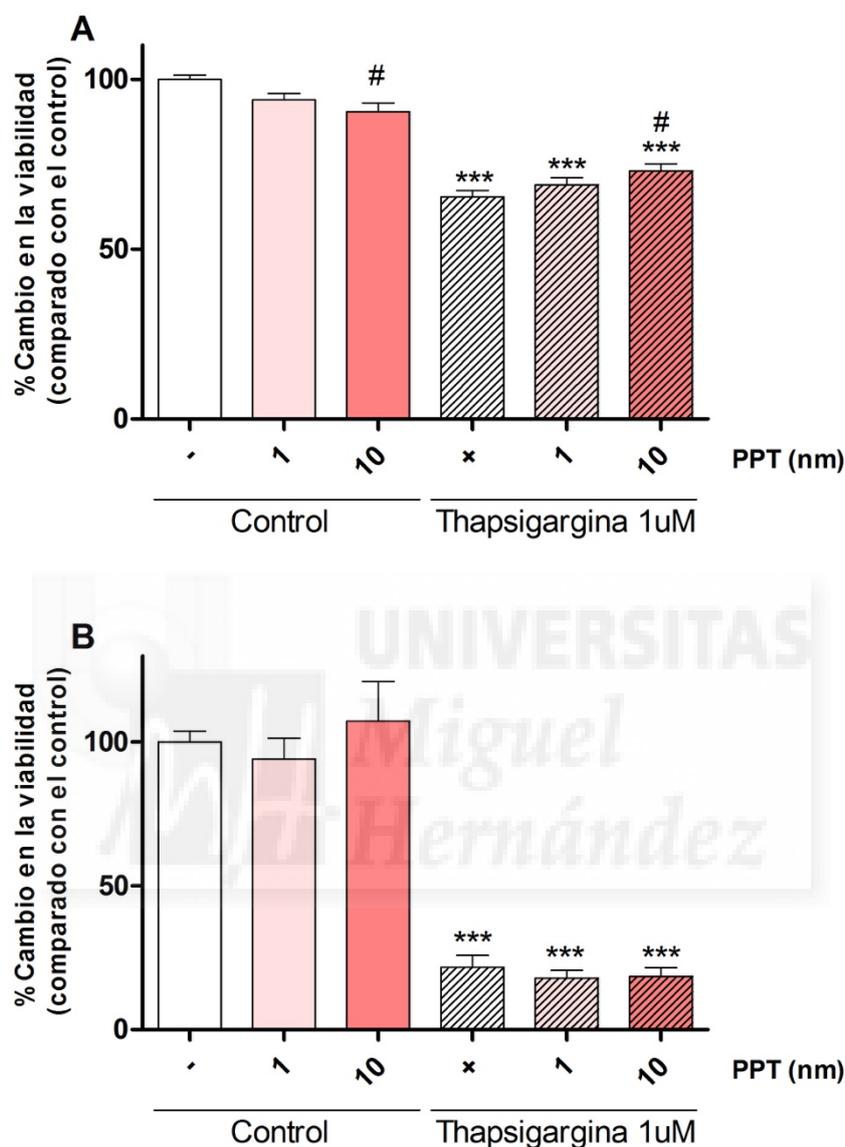


Figura 11. Cambio en la viabilidad en células MIN-6 a las 24 horas (A) y a las 48 horas (B) de la exposición a Thapsigargina y PPT. Cuantificación de la viabilidad en células MIN-6 en ausencia (barra lisa) o presencia de Thapsigargina (1 μ M, barra con patrón de rayas) y con dosis gradual de PPT (1, 10 y 100 nM) en escala de rojos. Los datos se presentan como la media \pm s.e.m de 3 experimentos independientes. Las comparaciones se realizaron mediante *unpaired* t-test junto con ANOVA one way seguido de un test post hoc de Dunnet para comparaciones múltiples. *** P <0.001 vs Control, # P <0.05 vs Control

5. DISCUSIÓN

La deficiencia de insulina se encuentra presente en los inicios de la DMT2 y empeora con el tiempo. La DMT2 se desarrolla en individuos que no logran compensar la resistencia a insulina mediante el aumento de la producción de insulina de páncreas. La prevalencia de la DMT2 está aumentando rápidamente debido a modificaciones en los hábitos, incluyendo la utilización de dietas ricas en grasas saturadas. Estas dietas aumentan las necesidades de insulina, pero también causan pérdida de función de las células β , fundamental en la patogénesis de la DMT2. La exposición crónica a elevadas concentraciones de AGL puede contribuir al aumento de apoptosis en la célula β y pérdida celular progresiva en la DMT2.

Varios estudios proponen el estrés del RE como uno de los mecanismos implicados en la apoptosis inducida por AGL en célula β ¹³ y se ha demostrado que palmitato activa una respuesta a estrés del RE en las líneas celulares INS-1 y MIN-6^{13, 14}. Esto concuerda con la disminución de la viabilidad observada tras la exposición a palmitato, que se debería a la apoptosis provocada por estrés del RE.

La protección estrogénica frente a estrés oxidativo ha sido descrita en varios estudios. E2 favorece la supervivencia de la célula β pancreática, protegiéndola de la apoptosis inducida por el estrés oxidativo, manteniendo así la producción de insulina y la prevención de la diabetes en ratones. Esta protección se observó sobre todo a través del receptor ER α , ya que su eliminación deterioró la capacidad de E2 para prevenir la apoptosis^{22, 23}.

En estudios de lipotoxicidad, se observó que la apoptosis inducida por palmitato era más acentuada por una elevada concentración de glucosa en células INS-1E, pero la apoptosis no se veía aumentada por alta glucosa en células MIN-6 ni en islotes humanos. Por tanto, los islotes humanos sanos y las células MIN-6 pueden evitar la glucolipotoxicidad, aunque la lipotoxicidad es evidente tanto a concentraciones altas como bajas de glucosa³⁶.

En el presente trabajo no se ha podido observar protección frente a Palmitato, aunque sí que se ha podido advertir cierta protección frente a la acción de la taspigargina. Una hipótesis sería que las células MIN-6 presentaran una menor capacidad estrogénica que otras líneas celulares, por lo que esta protección se vería disminuída en esta línea celular. Se requeriría de estudios adicionales para poder contrastar dichos resultados. Sería útil realizar un análisis de apoptosis

midiendo el porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas mediante marcaje con yoduro de propidio (células necróticas) y Hoescht 33348 en cada una de las etapas del tratamiento (a 0, 24 y 48 horas).

Como se ha comentado anteriormente, se ha podido observar una protección frente a la exposición a tapsigargina cuando las células son tratadas con el antagonista DPN a concentración 1 nM y con el antagonista PPT a concentración 10 nM. En el caso de PPT, esta protección se observa en las células expuestas al estresor, mientras que en el control se observa una disminución de la viabilidad. En el caso del DPN, este efecto solo puede observarse en las células expuestas a tapsigargina.

En el caso de las células expuestas a palmitato, se observa una disminución de la viabilidad en células tratadas con DPN a 10 y 100 nM, independientemente de la exposición o no a estresor. Esto puede indicarnos que concentraciones elevadas de agonistas podrían estar activando la apoptosis. Una hipótesis para este efecto sería que la respuesta a estrés de RE provocada por palmitato estaría activando vías de señalización apoptóticas en lugar de las vías de recuperación de la homeostasis.

Existen estudios donde se ha demostrado que la protección de ER α es independiente de ERE en islotes y que E2 favorece la supervivencia de estos a través de la señalización del receptor de estrógeno de membrana. Además, se ha demostrado que el ER β juega un papel citoprotector menor que ER α ²³, aunque ER β tiene un efecto insulino-trópico importante, produciendo una liberación de insulina más rápida. ER α se expresa en MIN-6 y su localización es exclusivamente nuclear²². Esto explicaría el efecto protector observado en algunas células tratadas con el antagonista de ER α , PPT, aunque también se haya podido observar disminución en la viabilidad en el control. Por tanto, ER α podría estar mediando en el efecto apoptótico, pero no lo estaría bloqueando totalmente, estando otros receptores implicados. ER β también podría estar interfiriendo en este efecto, aunque a concentraciones elevadas podría contribuir a la apoptosis. Esto podría ser debido a un aumento en la liberación de insulina, que podría resultar contraproducente en la protección frente a lipotoxicidad.

En resumen, los datos presentados en el actual trabajo ponen de manifiesto que la exposición a palmitato provoca la apoptosis de la célula β por estrés del RE, reflejando el factor de riesgo que supone una dieta rica en grasas saturadas. Además, al igual que en otros estudios, se pone

de manifiesto la importancia del ER α en la protección frente a apoptosis, un mecanismo importante para inducir la muerte celular por estrés del RE , pero cuya vía de inducción todavía no está clara.

Se conoce que E2 también activa señales por vías no genómicas a través de una forma extranuclear de ER y el receptor acoplado a proteína G de estrógeno (GPER). Por tanto, sería conveniente realizar estudios de lipotoxicidad con agonistas de GPER para poder conocer su contribución en la protección frente a apoptosis inducida por palmitato.



6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES FUTURAS

Las conclusiones del trabajo realizado se pueden recoger en los siguientes puntos:

1. La exposición a palmitato y tapsigargina produce apoptosis en la célula β disminuyendo la viabilidad celular.
2. No se ha observado protección frente a apoptosis inducida por palmitato en el caso del antagonista DPN, pero a elevadas dosis (10 y 100 nM) provoca un aumento de la disminución de viabilidad. El antagonista del ER- β , PPT, no provocó efecto protector frente a palmitato.
3. Frente a la exposición a tapsigargina, el antagonista DPN a concentración 1 nM y PPT a 10 nM muestra protección a las 24 horas. Sin embargo, también se observa una disminución de viabilidad en las células control con dosis de PPT 10 nM. Transcurridas 48 horas en todos los casos la viabilidad celular desciende hasta el 20% y no existe protección a ninguno de los estresores.
4. Una dieta rica en grasas saturadas es un factor de riesgo que se asocia con frecuencia a la resistencia a insulina pudiendo originar enfermedades metabólicas como la diabetes de tipo 2 y la obesidad.

Proyección futura

La célula β pancreática presenta un papel clave en la regulación de la homeostasis de la glucosa. A pesar de que en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento sobre los efectos de los ácidos grasos sobre la función de la célula β , su mecanismo todavía no es del todo claro.

Recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia de la relación de la hiperlipidemia con el desarrollo de enfermedades metabólicas como la diabetes, por lo que hay que subrayar la importancia no sólo de mantener niveles normales de glucosa, sino también los niveles de lípidos en individuos con DMT2. Esto hace que sean necesarios más estudios que evalúen las consecuencias metabólicas de dicha exposición a AGL en el tiempo y, especialmente, a los posibles cambios en la función y masa de la célula β . También sería conveniente realizar experimentos en los que se incluya el receptor GPER para conocer su contribución en la protección frente a AGL. Es muy importante conocer la contribución de cada uno de los receptores para poder desarrollar terapias efectivas contra enfermedades metabólicas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Aizawa T, Komatsu M, Asanuma N, Sato Y, Sharp GWG. Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic β cell. *Trends Pharmacol Sci.* 1998 12/1;19(12):496-9.
2. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquié M, Gauthier BR, et al. Pancreatic Insulin Content Regulation by the Estrogen Receptor ER α . *PLoS ONE.* 2008 03/20;3(4):e2069.
3. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, García-Arévalo M, Ripoll C, Fuentes E, et al. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 5/22;355(2):201-7.
4. Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJH. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta]-cells. *Nature.* 1984 11/29;312(5993):446-8.
5. Ashcroft FM, Rorsman P. Electrophysiology of the pancreatic β -cell. *Prog Biophys Mol Biol.* 1989;54(2):87-143.
6. Barros RPA, Gabbi C, Morani A, Warner M, Gustafsson J. Participation of ER α and ER β in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.* 2009 American Physiological Society;297(1):E124-33.
7. Boucher A, Lu D, Burgess SC, Telemaque-Potts S, Jensen MV, Mulder H, et al. Biochemical Mechanism of Lipid-induced Impairment of Glucose-stimulated Insulin Secretion and Reversal with a Malate Analogue. *Journal of Biological Chemistry.* 2004 June 25;279(26):27263-71.
8. Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene.* 2003 print;22(53):8608-18.
9. Brussaard EH, Leuven GJA, Frölich M, Kluft C, Krans JHM. Short-term oestrogen replacement therapy improves insulin resistance, lipids and fibrinolysis in postmenopausal women with NIDDM. *Diabetologia.* 1997;40(7):843-9.
10. C. Márquez D. Receptor de estrógeno: Bases moleculares aplicadas a medicina . 2010.
11. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren P, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006 February 14;103(7):2334-9.
12. Chang-Chen K, Mullur R, Bernal-Mizrachi E. β -cell Failure as a Complication of Diabetes. *Reviews in endocrine & metabolic disorders.* 2008 12;9(4):329-43.
13. Cnop M, Ladriere L, Hekerman P, Ortis F, Cardozo AK, Dogusan Z, et al. Selective

- Inhibition of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2a Dephosphorylation Potentiates Fatty Acid-induced Endoplasmic Reticulum Stress and Causes Pancreatic β -Cell Dysfunction and Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 February 09;282(6):3989-97.
14. Cunha DA, Hekerman P, Ladrière L, Bazarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, et al. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic β -cells. *J Cell Sci*. 2008 06/17;121(0):2308-18.
15. Dean PM, Matthews EK. Glucose-induced electrical activity in pancreatic islet cells. *J Physiol (Lond)*. 1970 09;210(2):255-64.
16. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*. 2006 03/01;116(3):561-70.
17. Dunne MJ, Petersen OH. Intracellular ADP activates K^+ channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett*. 1986;208(1):59-62.
18. El-Assaad W, Buteau J, Peyot M, Nolan C, Roduit R, Hardy S, et al. Saturated Fatty Acids Synergize with Elevated Glucose to Cause Pancreatic β -Cell Death. *Endocrinology*. 2003 09/01; 2016/02;144(9):4154-63.
19. Franco Y, Mendoza-Fernández V, Lemini C. Mecanismos de acción de los efectos protectores de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular . *Rev Fac Med UNAM [Internet]*. 2003;46(3):101-106. Available from: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no46-3/RFM46306.pdf>.
20. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol Rev*. 2007 American Physiological Society;87(3):905-31.
21. 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 β -Cell Apoptosis. *Endocrinology*. 2006 07/01; 2016/02;147(7):3398-407.
22. Le May C, Chu K, Hu M, Ortega CS, Simpson ER, Korach KS, et al. Estrogens protect pancreatic β -cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 10/28;103(24):9232-7.
23. Liu S, Le May C, Wong WPS, Ward RD, Clegg DJ, Marcelli M, et al. Importance of Extranuclear Estrogen Receptor- α and Membrane G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Pancreatic Islet Survival. *Diabetes*. 2009 06/26;58(10):2292-302.
24. Maedler K, Spinas GA, Dytar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. Distinct Effects of Saturated and Monounsaturated Fatty Acids on β -Cell Turnover and Function. *Diabetes*. 2001 January 01;50(1):69-76.
25. Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene

- Transcription. *Curr Genomics*. 2006 10/30;7(8):497-508.
26. Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Endocr Rev*. 2013 06/01; 2016/02;34(3):309-38.
27. Nadal A, Díaz M, Valverde MA. The Estrogen Trinity: Membrane, Cytosolic, and Nuclear Effects. *Physiology*. 2001 American Physiological Society;16(6):251-5.
28. Nadal A, Rovira JM, Laribi O, Leon-quinto T, Andreu E, Ripoll C, et al. Rapid insulinotropic effect of 17 β -estradiol via a plasma membrane receptor. *The FASEB Journal*. 1998 October 01;12(13):1341-8.
29. Newsholme P, Keane D, Welters H, Morgan N. Life and death decisions of the pancreatic β -cell: the role of fatty acids. *Clin Sci*. 2007 01/01;112(1):27-42.
30. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP//GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 2003 12/19;11(4):381-9.
31. Raciti M, Lotti LV, Valia S, Pulcinelli FM, Di Renzo L. JNK2 is activated during ER stress and promotes cell survival. *Cell Death & Disease*. 2012 10/08;3(11):e429.
32. Riggs BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest*. 2000 11/15;106(10):1203-4.
33. Ripoll C, Martin F, Rovira JM, Pintor J, Miras-Portugal MT, Soria B. Diadenosine Polyphosphates: A Novel Class of Glucose-Induced Intracellular Messengers in the Pancreatic β -Cell. *Diabetes*. 1996 October 01;45(10):1431-4.
34. Ropero Lara AB. Caracterización del receptor y de los mecanismos de señalización implicados en el efecto no genómico del 17beta-estradiol en el islote de Langerhans de ratón [dissertation]. San Juan: Universidad Miguel Hernández de Elche; 2001.
35. Ropero AB, Pang Y, Alonso-Magdalena P, Thomas P, Nadal Á. Role of ER β and GPR30 in the endocrine pancreas: A matter of estrogen dose. *Steroids*. 2012 8;77(10):951-8.
36. Sargsyan E, Bergsten P. Lipotoxicity is glucose-dependent in INS-1E cells but not in human islets and MIN6 cells. *Lipids in Health and Disease*. 2011;10(1):1-7.
37. Schomberg DW, Couse JF, Mukherjee A, Lubahn DB, Sar M, Mayo KE, et al. Targeted Disruption of the Estrogen Receptor- α Gene in Female Mice: Characterization of Ovarian Responses and Phenotype in the Adult. *Endocrinology*. 1999 06/01; 2016/02;140(6):2733-44.
38. Stevenson JC, Crook D, Godsland IF, Collins P, Whitehead MI. Hormone Replacement Therapy and the Cardiovascular System. *Drugs*. 2012;47(2):35-41.
39. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*. 2006 07/06;7(9):880-5.

40. Tresguerres JAF, Castillo C. Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. In: Tresguerres JAF, editor. Fisiología Humana. 3era Edición ed. México: McGraw-Hill; 2005. p. 1007-15.
41. Unglaub Silverthorn D. Introducción al sistema endocrino. In: Fisiología Humana: Un enfoque integrado. 4ª Edición ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008. p. 217-21.
42. Unglaub Silverthorn D. Compartimentación: células y tejidos. In: Fisiología Humana: Un enfoque integrado. 4ª Edición ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008. p. 65-6.
43. W. O'Malley B, A. Strott C. Hormonas Esteroides: Metabolismo y Mecanismo de Acción. In: S. C. Yen S, B. Jaffe R, L. Barbieri R, editors. Endocrinología de la Reproducción: Fisiología, Fisiopatología y Manejo Clínico. 4ª edición ed. Ed. Médica Panamericana; 2001. p. 118.
44. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol.* 2012 05/24;197(7):857-67.
45. Wu J, Sun P, Zhang X, Liu H, Jiang H, Zhu W, et al. Inhibition of GPR40 protects MIN6 β cells from palmitate-induced ER stress and apoptosis. *J Cell Biochem.* 2012;113(4):1152-8.
46. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest.* 2005 10/01;115(10):2656-64.
47. Yang H, Li X. The role of fatty acid metabolism and lipotoxicity in pancreatic β -cell injury: Identification of potential therapeutic targets. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2012 8;2(4):396-402.