



Universidad de Valladolid



Memoria del Trabajo de Fin de Máster:

**Efecto del ácido 7-hexadecenoico (16:1n-9)
sobre la composición de ácidos grasos en células
INS-1E, modelo de célula beta-pancreática**

Presentado por:

Alba León González

Dirigido por:

Dr. Jesús Balsinde Rodríguez

Dra. Irene Cózar Castellano

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Diabetes Mellitus.....	4
Páncreas endocrino	4
Modelos de célula beta-pancreática: INS-1E.....	5
Diabetes e inflamación.....	6
Ácidos grasos, inflamación y células beta-pancreáticas	6
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
Hipótesis	8
Objetivos	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Materiales	9
Línea celular y condiciones de cultivo.....	10
Tratamiento con el ácido graso 16:1n-9.....	11
Viabilidad celular por MTT.....	11
Secreción de insulina estimulada por glucosa en la línea celular INS-1E.	12
Tratamiento con el ácido graso 16:1n-9 y glucosa para el estudio del contenido celular de ácidos grasos en la línea celular INS-1E.	13
Extracción de lípidos	13
Separación de las especies lipídicas mediante TLC	14
Derivatización de los ácidos grasos a ésteres metílicos.....	15
Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos	16
Estudio estadístico	16
RESULTADOS.....	17
Viabilidad celular por MTT.....	17
Efecto del ácido graso 16:1n-9 sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa en la línea celular INS-1E.....	18
Estudio del contenido celular de ácidos grasos en la línea celular INS-1E	19
Tratamiento con el ácido graso 16:1n-9 y glucosa para el estudio del contenido celular de ácidos grasos en la línea celular INS-1E.	19
DISCUSION.....	26
CONCLUSIONES.....	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29

ABREVIATURAS

16:0: Ácido hexadecanoico.

16:1n-7: Ácido cis-9-hexadecenoico.

16:1n-9: Ácido cis-7-hexadecenoico.

18:1n-7: Ácido cis-11-octadecenoico.

18:1n-9: Ácido cis-9-octadecenoico.

BSA: Albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumin).

CE(22:1n-9): Colesterol erucato.

CE: Éster de colesterol (Cholesteryl Ester).

DAG(17:0/17:0): 1,2-diheptadecanoil-sn-glicerol.

DAG: Diacilglicerol.

DMSO: dimetil sulfóxido.

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

FBS: Suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum).

GC-MS: Cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas. (Gas Chromatography-Mass Spectrometry).

HBSS: HEPES balanced salt solution.

MTT: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide.

PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline).

PC(17:0/17:0): 1,2-diheptadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina.

PC: Fosfatidilcolina.

PL: fosfolípidos.

SEM: error estándar de la media (standard error of mean)

TAG(17:0/17:0/17:0): 1,2,3-triheptadecanoil-sn-glicerol.

TAG: Triacilglicerol.

TLC: Cromatografía en capa fina (Thin-Layer Chromatography).

INTRODUCCIÓN

Diabetes Mellitus

Según la definición de la OMS, “la diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce”.¹

Los principales tipos de diabetes son: diabetes tipo 1, caracterizada por la ausencia de síntesis de insulina; diabetes tipo 2, cuyo origen es la incapacidad del cuerpo para utilizar eficazmente la insulina de la que dispone (resistencia periférica a la insulina) y diabetes gestacional, la cual conlleva una hiperglucemia asociada al embarazo.

La prevalencia de esta enfermedad es del 8,8 % a nivel mundial según datos del año 2017², y del 13,8 % en España según datos del año 2012.³ Se calcula que cerca de 500 millones de personas viven con diabetes en la actualidad.

La diabetes produce el 10,7% de la mortalidad mundial en adultos de 20 a 79 años, esta cifra supera a la suma de fallecimientos por las principales enfermedades infecciosas. Esta enfermedad supone un gran impacto a nivel sanitario y económico: se producen en torno a 4 millones de muertes anuales y un gasto sanitario de 727 mil millones de dólares a nivel mundial.²

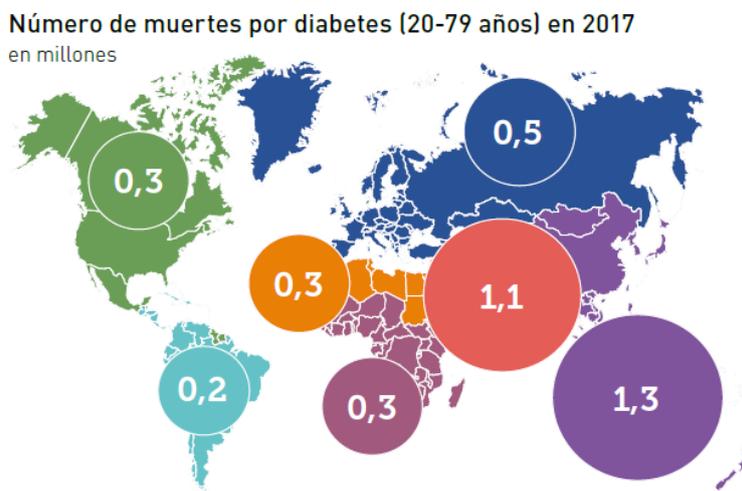


Figura 1. Número de muertes producidas por diabetes en 2017, población de 20 a 79 años. Datos en millones. Comité de la 8ª edición de Diabetes Atlas 2017 (Federación Internacional de Diabetes).²

Páncreas endocrino

La insulina es una hormona producida por el páncreas, la cual permite la entrada de glucosa en los tejidos para su uso como fuente de energía.

El páncreas tiene una función exocrina, 98%, y endocrina, 2%. Las células responsables de la función endocrina del páncreas se distribuyen en islotes ordenados llamados islotes de Langerhans (Figura 2).

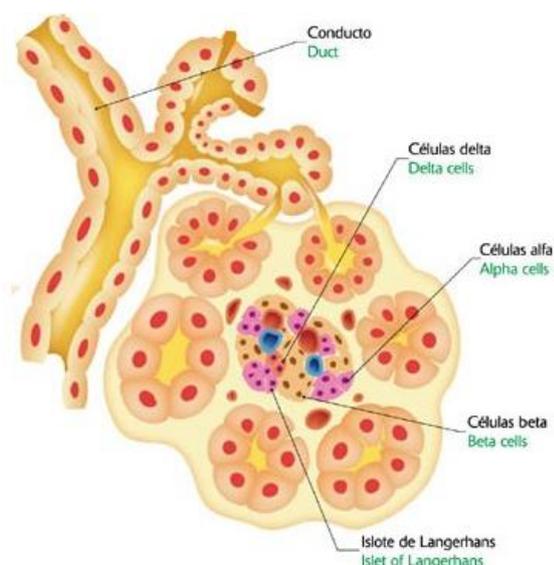


Figura 2. Islote pancreático con sus distintos tipos celulares (<http://elbibliote.com/resources/Temas/html/638.php>).

Los islotes se conforman por distintos tipos celulares, entre ellos la célula beta, tipo celular más abundante en el islote (50-80% en humanos) y responsable de la secreción de insulina.

Las células beta-pancreáticas secretan insulina al torrente sanguíneo mediante exocitosis de esta hormona. La insulina permite regular los niveles de glucosa en sangre.

Una insuficiencia en la producción de insulina o una señalización ineficiente (resistencia a la insulina en los tejidos periféricos) rompe la homeostasis de la glucosa, provocando hiperglucemia,

niveles elevados de glucosa en sangre.⁴ Con el tiempo, la hiperglucemia provoca daños a nivel celular y afecta al funcionamiento de múltiples órganos.

La célula beta-pancreática responde a la hiperglucemia liberando insulina con el fin de disminuir los niveles de glucosa. La hiperglucemia sostenida en el tiempo provoca que fallo progresivo y, finalmente, muerte celular de la célula beta-pancreática; esto se debe, entre otros factores, a la toxicidad de la glucosa, el estrés de retículo, lipotoxicidad y a las citoquinas pro-inflamatorias.^{5,6}

Modelos de célula beta-pancreática: INS-1E

Para el estudio de la diabetes se precisa de modelos adecuados, *in vitro* se pueden utilizar islotes pancreáticos aislados, usualmente de origen murino y humano, aunque estos últimos son complicados de obtener; y líneas celulares. Existen diversos modelos de célula beta-pancreática, los más estables y reproducibles son de roedor, como BTC3, BRIN-BD11, MIN6, INS-1E, etc.

La línea celular INS-1E⁷ es un modelo *in vitro* de célula beta-pancreática obtenida a partir de una selección clonal de otra línea, células INS-1,⁸ obtenidas a partir de un insulinoma de rata. Esta línea celular es estable, altamente diferenciada y es capaz de responder ante estímulos de alta glucosa, sintetizando y secretando insulina.

Diabetes e inflamación

En el desarrollo de la diabetes están involucrados procesos inflamatorios. La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune que ataca a la célula beta-pancreática y destruye su masa, se produce una inflamación aguda inherente al proceso autoinmune, a medida que se pierden las células beta-pancreáticas, la producción de insulina disminuye hasta la pérdida de toda la masa de células beta.⁹

La diabetes tipo 2 se desarrolla frecuentemente junto con una inflamación sistémica de bajo grado relacionada con la obesidad y el propio estrés al que están sometidas las células ante la demanda de insulina.¹⁰ Se incrementan los niveles de citoquinas en circulación producidas por diferentes tipos celulares, como adipocitos o macrófagos.¹¹ Estas citoquinas están también asociadas con la disminución de la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos.¹²

En conclusión, la diabetes es una enfermedad crónica que cursa con inflamación,¹³ y que provoca la disfunción y muerte de la célula beta, por lo que es necesario estudiar cómo prevenir su fallo y muerte celular, desde un enfoque antiinflamatorio.

Ácidos grasos, inflamación y células beta-pancreáticas

Se sabe que ácidos grasos como EPA (20:5n-3) o DHA (22:6n-3), ambos ácidos grasos omega-3 con efectos antiinflamatorios, mantienen la función de modelos de célula beta-pancreática en condiciones de lipotoxicidad.¹⁴

También se sabe que ciertos ácidos grasos monoinsaturados, como el ácido oleico (18:1n-9), al que se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, previene los efectos deletéreos en las células beta-pancreáticas de altos niveles de glucosa y palmitato, además, restauran su función y promueven la proliferación de la célula beta.¹⁵

En los últimos años se ha estudiado el ácido palmitoleico (16:1n-7) (Figura 4), otro ácido graso monoinsaturado, el cual tiene un papel controvertido en sus efectos en el metabolismo a nivel sistémico como hormona o "*lipoquina*". Muchos artículos hablan de sus grandes efectos beneficiosos para el síndrome metabólico, como mejorar la resistencia a la insulina en tejido muscular, disminuir la esteatosis hepática¹⁶, efectos protectores de la célula beta-pancreática,¹⁵ y propiedades antiinflamatorias,^{17,18} entre otros; pero otras publicaciones sostienen un efecto totalmente contrario: que el ácido palmitoleico induce la esteatosis hepática¹⁹ y tiene efectos deletéreos en el páncreas.²⁰ Estas discrepancias se deben fundamentalmente a efectos distintos según la especie estudiada, humano o modelos murinos.

Recientemente, se ha identificado y caracterizado un isómero posicional del palmitoleico, el ácido graso 7-hexadecenoico (16:1n-9) (Figura 3). Este ácido graso posee un doble enlace en posición "*cis*" en el carbono 7, a diferencia del ácido palmitoleico que lo tiene en el carbono 9 (Figura 4).

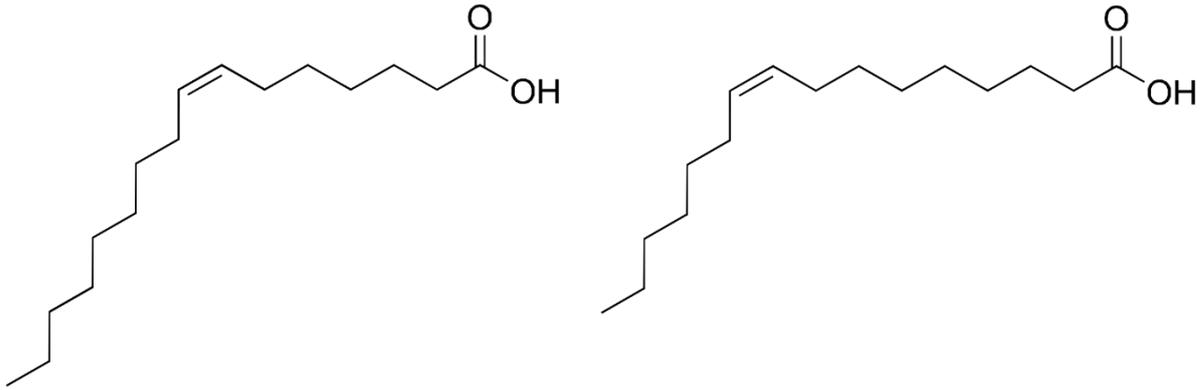


Figura 3. Ácido graso 7-hexadecenoico, 16:1n-9. Figura 4. Ácido palmitoleico. Ácido graso 9-hexadecenoico, 16:1n-7.

Este ácido graso, a diferencia de sus isómeros posicionales palmitoleico (16:1n-7) o sapiénico (16:1-10), que tienen su origen en la desaturación directa del ácido palmítico mediante las desaturasas Δ^9 (estearoil-CoA desaturasa-1, SCD-1) y Δ^6 (ácido graso desaturasa-2, FADS2), proviene de la β -oxidación del ácido oleico (18:1n-9).²¹

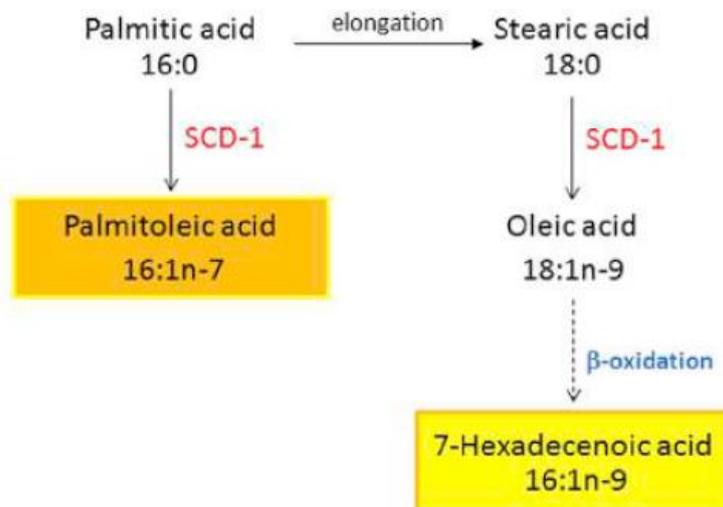


Figura 5. Síntesis del ácido graso 7-hexadecenoico a partir del ácido oleico mediante β -oxidación.²¹

El ácido graso 7-hexadecenoico (16:1n-9) es prometedor como biomarcador de enfermedades cardiovasculares gracias a su acumulación en las gotas lipídicas de los monocitos con fenotipo “foamy cell” y posee potentes efectos antiinflamatorios comparables a ácidos grasos omega-3 como el DHA (22:6n-3).^{21,22}

Por todo lo descrito anteriormente, en este estudio se pretende profundizar en el papel del ácido graso 16:1n-9 en la función de las células beta-pancreáticas y su efecto sobre el contenido de ácidos grasos en condiciones de normoglucemia o bajo un estímulo de alta concentración de glucosa.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El ácido graso 16:1n-9 se incorpora a la célula beta-pancreática y tiene efectos beneficiosos sobre su función celular.

Objetivos

- ❖ Estudiar la viabilidad de las células beta-pancreáticas en presencia del ácido graso 16:1n-9.
- ❖ Estudiar la función de la célula beta-pancreática en presencia del ácido graso 16:1n-9.
- ❖ Identificar y cuantificar los ácidos grasos presentes en la célula beta-pancreática bajo tratamiento con el ácido graso 16:1n-9 y glucosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Medio completo línea celular INS-1E

El medio completo utilizado para el mantenimiento de las células INS-1E ha sido RPMI 1640 + GlutaMAX™ (Ref:61870-010) suplementado con: suero fetal bovino descomplementado (FBS) 5,6% (v/v), piruvato sódico 1,1% (v/v), HEPES 1,1% (v/v), estreptomicina/penicilina 1,1% (v/v) (*Gibco, EE.UU.*) y β -mercaptoetanol 0,0004% (v/v) (*Sigma-Aldrich, EE.UU.*).

Medio sin glucosa línea celular INS-1E

El medio utilizado para mantener las células en condiciones de baja glucosa fue RPMI 1640 sin glucosa suplementado con: suero fetal bovino descomplementado (FBS) 5,6% (v/v), piruvato sódico 1,1% (v/v), HEPES 1,1% (v/v), estreptomicina/penicilina 1,1% (v/v) (*Gibco*) y β -mercaptoetanol 0,0004% (v/v) (*Sigma-Aldrich*).

Buffer HBSS sin glucosa

En agua 400 ml de desionizada se disolvieron las siguientes sales:

- NaCl 114 mM.
- KCl 4,7 mM.
- KH₂PO₄ 1,2 mM.
- MgSO₄ 1,16 mM.
- Hepes 20 mM.
- CaCl₂ 2,5 mM.
- NaHCO₃ 25,5 mM.

Todas las sales obtenidas de *Merck, Alemania*, excepto Hepes, *Sigma-Aldrich*. Se comprobó un pH comprendido entre 6,9 y 7. Se disolvió BSA libre de ácidos grasos (*Sigma-Aldrich*) al 0,2%. Por último, se enrasa el volumen final a 500 ml.

Soluciones de glucosa 2 y 16 mM en buffer HBSS

- Buffer HBSS sin glucosa.
- Glucosa (*Sigma-Aldrich*).

Compuestos utilizados en la extracción, separación y análisis de lípidos

- Agua milli-Q ultrapura (*Millipore*).
- Cloroformo, calidad HPLC (*Thermo Fisher, EE.UU.*).
- Metanol, calidad HPLC (*Thermo Fisher*).
- Hexano, calidad HPLC (*Sigma-Aldrich*).
- Dietil éter (*Scharlab, España*).
- Ácido acético glacial (*Scharlab*).
- Ácido clorhídrico 35 % (p/p) (*Scharlab*).

- Reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate) (*Bio-Rad, EE.UU.*).
- Albúmina de suero bovino (BSA), libre de ácidos grasos y endotoxinas (*Sigma-Aldrich*).
- KOH 0,5 M en Metanol:
 - Hidróxido de potasio (KOH) (*Scharlab*).
 - Metanol, anhidro 99.8 % (*Sigma-Aldrich*).

Gases utilizados por el cromatógrafo de Gases-Masas

- Helio, extrapuro (*Air Liquide, Francia*).

Patrones internos para la transmetilación total de lípidos

- PC(17:0/17:0), 5 nmol.
- TAG(17:0/17:0/17:0), 4 nmol.

Patrones internos para la separación de especies lipídicas mediante TLC

- PC(17:0/17:0), 5 nmol.
- TAG(17:0/17:0/17:0), 4 nmol.
- DAG(17:0/17:0), 5 nmol.
- CE(22:1n-9), 10 nmol.

Estándares de calibración del espectrómetro de masas

- Mezcla de 37 ésteres metílicos de ácidos grasos (*Sigma-Aldrich*)
- Ácido cis-7-hexadecenoico éster metílico (*Larodan, Sweden*)
- Ácido cis-6-hexadecenoico éster metílico (*Larodan*)
- Ácido cis-11-hexadecenoico éster metílico (*Larodan*)
- Ácido trans-9-hexadecenoico éster metílico (*Larodan*)
- Ácido cis-11-octadecenoico éster metílico (*Sigma-Aldrich*)
- Ácido cis-7,10,13,16-docosatetraenoico éster metílico (*Sigma-Aldrich*)

Línea celular y condiciones de cultivo

La línea celular utilizada fue INS-1E,⁷ modelo de célula beta-pancreática aislada monoclonalmente de la línea celular parental INS-1,⁸ derivada de un insulinoma de rata. Esta línea celular se corresponde con un fenotipo estable de célula beta secretora de insulina ante estímulo de glucosa entre los pases 40 y 100.

Las células se incubaron en condiciones de atmósfera húmeda, a 37°C y 5% de CO₂. Las células tripsinizaron (Tripsina-EDTA al 0,05%, *Gibco*) cuando alcanzaron una confluencia celular en torno al 80%.

Tratamiento con el ácido graso 16:1n-9

El tratamiento con 16:1n-9 (250 mM, en etanol) se realizó mediante dilución de este ácido graso en medio completo para las células INS-1E, descrito anteriormente. Las concentraciones utilizadas fueron 150, 100, 50, 25 y 10 μ M para el estudio de viabilidad celular y 50 μ M para el estudio de secreción de insulina y contenido en ácidos grasos. Se utilizaron cantidades equivalentes de etanol en el control de vehículo del tratamiento con 16:1n-9.

Viabilidad celular por MTT

El compuesto 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, o MTT (amarillo) es un compuesto que produce una reacción colorimétrica al reducirse a (E, Z)-5-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-1, 3-diphenylformazan o formazan (morado). La responsable de la reducción es la oxidorreductasa dependiente de NADPH, por lo que la reducción está condicionada por la actividad metabólica de las células viables, proporcionando una medida indirecta de la viabilidad celular.

Se sembraron 90.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Cada condición se sembró por triplicado, incluyendo los controles.

Al día siguiente, se retiró el medio y se añadió el tratamiento correspondiente con 16:1n-9, etanol o medio completo, en el caso de los controles positivo y negativo (150 μ l a cada pocillo). Se incubaron las células durante 24h.

Antes de añadir el reactivo MTT, se añadió metanol (*Panreac, España*) al 70% en medio a los pocillos de control positivo para provocar la muerte celular. Se incubó otros 45 minutos y se procedió a añadir el MTT.

El MTT (*Sigma*) se diluyó a una concentración de 0,0625 mg/ml en medio completo para las células INS-1E (concentración stock 10 mg/ml en PBS). Se retiró el medio de los pocillos y se añadió 150 μ l de la disolución de MTT en cada pocillo. Se incubó durante 1 hora y, tras comprobar la presencia de cristales morados en el interior celular, se procedió a retirar el sobrenadante cuidadosamente. Se añadió 150 μ l de DMSO (*Sigma-Aldrich*) por pocillo y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos en ausencia de luz.

La lectura de los resultados se realizó en un espectrofotómetro Heales, MB-580 (*Heales Medical, Reino Unido*), a la longitud de onda 562 nm.

Secreción de insulina estimulada por glucosa en la línea celular INS-1E.

Para realizar la secreción de insulina,²³ se sembraron 200.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos. Cuatro condiciones por triplicado (Figura 6): células tratadas con 16:1n-9 estimuladas con alta glucosa (16 mM), células tratadas con 16:1n-9 estimuladas con baja glucosa (2 mM), y sus respectivos controles con alta y baja glucosa.

Una vez sembradas las células, se incubaron durante dos días, se trató las células durante 24 horas con el ácido graso 16:1n-9 o con etanol, en el caso de los controles.

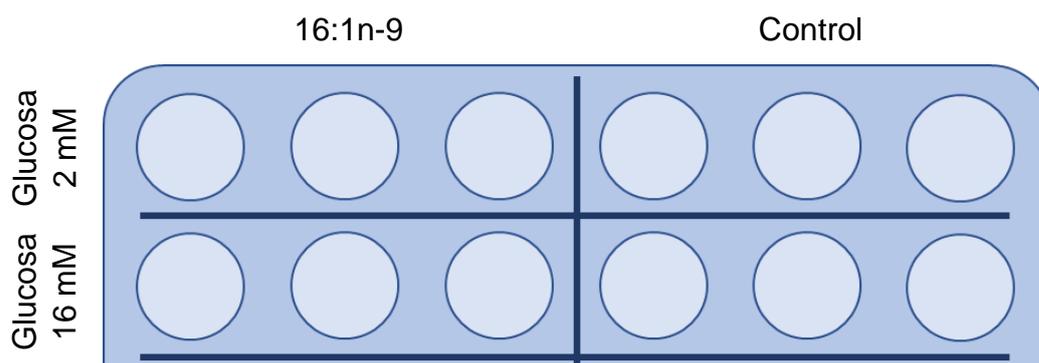


Figura 6. Diseño del experimento de secreción de insulina estimulada por glucosa. Condiciones: tratamiento de 24h con el ácido graso 16:1n-9 50 μ M y posterior estímulo con glucosa 2 y 16 mM.

Pasado el tiempo de tratamiento se comprobó que las células tenían una confluencia aproximadamente del 80% de la superficie del pocillo y se procedió a realizar la secreción de insulina.

Se cambió el medio de las células por medio sin glucosa durante 2 horas. Pasado ese tiempo se retiró el medio y se hicieron 3 lavados de 1 ml con buffer HBSS sin glucosa en condiciones óptimas de temperatura y concentración de CO₂ (37°C y con constante burbujeo de carbógeno: 95% O₂ – 5%CO₂).

Tras los lavados, se dejó con 1 ml de buffer HBSS sin glucosa incubando 30 minutos y se repitió un último lavado con el mismo buffer. Se añadieron las soluciones de glucosa 2 mM y 16 mM en buffer HBSS y se incubó durante 30 minutos.

Una vez pasado ese tiempo, con la placa sobre hielo, se recogieron los sobrenadantes en eppendorfs. Se centrifugaron los eppendorfs a 4°C, 2.000 rpm durante 5 minutos y se recogieron los sobrenadantes.

La insulina se cuantifica mediante un ELISA, *Rat Insulin ELISA (Merckodia, Sweden)*, con dilución 1:10.

Tratamiento con el ácido graso 16:1n-9 y glucosa para el estudio del contenido celular de ácidos grasos en la línea celular INS-1E.

Se sembraron 1.000.000 células por pocillo en dos placas de 6 pocillos. Se sembraron 4 condiciones por triplicado (Figura 7):

Una vez sembradas las células, se incubaron durante dos días, se trató las células durante 24 horas con el ácido graso 16:1n-9 o con etanol, en el caso de los controles.

Al finalizar las 24 horas, se retiró el tratamiento y se añadió medio sin glucosa durante 2 horas. Pasado ese tiempo se retiró el medio y se hicieron 3 lavados de 4 ml con buffer HBSS sin glucosa en condiciones óptimas de temperatura y concentración de CO₂ (37°C y con constante burbujeo de carbógeno: 95% O₂ – 5%CO₂).

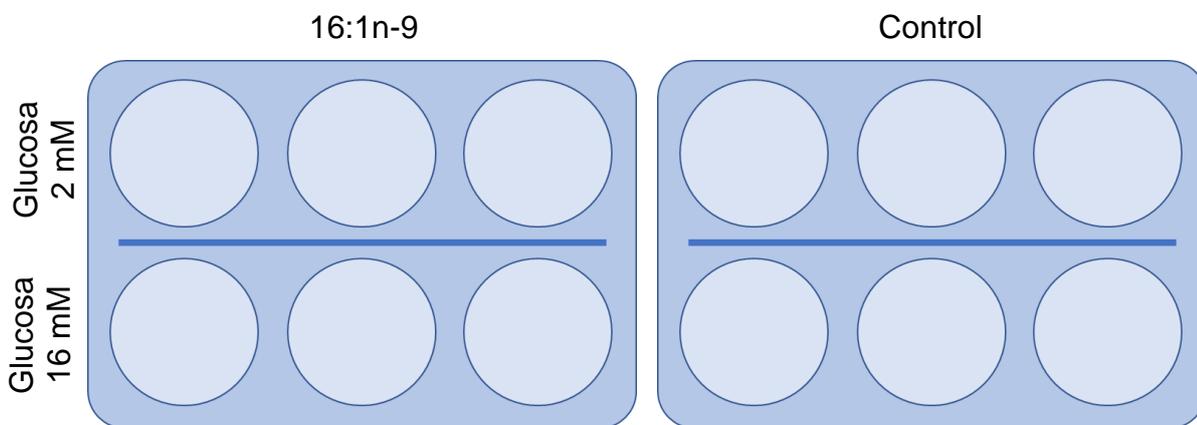


Figura 7. Diseño del experimento del estudio del contenido celular de ácidos grasos tras el tratamiento con el ácido graso 16:1n-9 (50 μ M) y posterior estímulo con glucosa 2 y 16 mM.

Tras los lavados, se dejó con 4 ml de buffer HBSS sin glucosa incubando 30 minutos y se repitió un último lavado con el mismo buffer. Se añadieron las soluciones de glucosa (Gibco) 2 mM y 16 mM en buffer HBSS y se incubó durante 30 minutos.

Una vez pasado ese tiempo, con la placa sobre hielo, se retiraron los sobrenadantes y se lavaron los pocillos dos veces con 2 ml de PBS frío.

Tras los lavados se añadieron 135 μ l de Agua-Metanol (1:1) por pocillo y se almacenó la placa a -80°C hasta su procesamiento (Agua desionizada y Metanol de alta pureza, calidad analítica, Thermo Fisher).

Extracción de lípidos

El contenido lipídico se extrajo de las células mediante el procedimiento de Bligh & Dyer²⁴: este método consiste en una extracción por diferente coeficiente de reparto del contenido lipídico entre distintos disolventes: agua desionizada, cloroformo y metanol. (1:0,9:1, en volumen).

Se recogió el contenido de los pocillos por condición. Antes de realizar la extracción se midió el contenido proteico utilizando el reactivo de Bradford y se normalizaron todas las muestras con el mismo contenido en proteína. Tras ello, se añadieron los patrones internos en función del tipo de procedimiento posterior (transmetilación total o separación por especies lipídicas). Se realizó la extracción: se añadieron 3,75 volúmenes de cloroformo/metanol (1:2), se agitó con fuerza con ayuda de un *vortex* durante 90 segundos, se añadieron 1,25 volúmenes de agua desionizada y 1,25 volúmenes de cloroformo, se agitó durante otros 60 segundos y se centrifugó a 5900 x g durante 5 minutos a 16 °C. Se recogió la fase orgánica y se realizó una segunda extracción con 2 volúmenes de cloroformo, con igual agitación y centrifugación. Una vez recolectadas ambas fases, se evaporó el disolvente a vacío.

Separación de las especies lipídicas mediante TLC

El contenido lipídico, una vez extraído, se separó por TLC. La fase estacionaria utilizada fue una lámina de sílice y la fase móvil fue una mezcla hexano/dietil éter/ácido acético en proporción 70:30:1 en volumen.²⁵

Se metió la lámina de sílice en la estufa 15 minutos antes de ser utilizada para activar la fase estacionaria por calor. Pevio a realizar la separación, se equilibró la cubeta de separación para lograr un intercambio gas-líquido en equilibrio: se dejó la proporción de disolventes de la fase móvil, junto con un papel de filtro en posición vertical, dentro de la cubeta 2 horas antes de la separación.

Cada muestra se disolvió en 20 µl de cloroformo/metanol (2:1) para llevarlo a la placa de sílice. Se pincharon los patrones de las diferentes especies lipídicas en los extremos y la/s muestras a separar en la zona central de la placa (Figura 8).

La separación se paró cuando el frente del disolvente estaba cerca del final de la lámina de sílice, aproximadamente una hora. Debido a la relación de polaridades de la fase móvil y fase estacionaria, las especies lipídicas migraron más por la lámina según su menor polaridad: CE, TAG, DAG, PL (Figura 8).

Se cortaron las zonas donde estaban los patrones y se reveló la posición de estos con vapores de yodo. Con los patrones como guía, se dividió la lámina en cuadrantes y se colectó la sílice correspondiente a cada grupo de lípidos en tubos eppendorf y se extrajo.

La extracción se hizo con 1 ml de cloroformo/metanol (1:2) y, posteriormente, con 1 ml de cloroformo/metanol (2:1). Se agitó durante 90 segundos en cada caso y se extrajeron las fases orgánicas tras centrifugarse 5 minutos, 16100 x g y 16 °C, cada una. Las fases orgánicas se juntaron y se evaporó el disolvente a vacío para su posterior procesado.

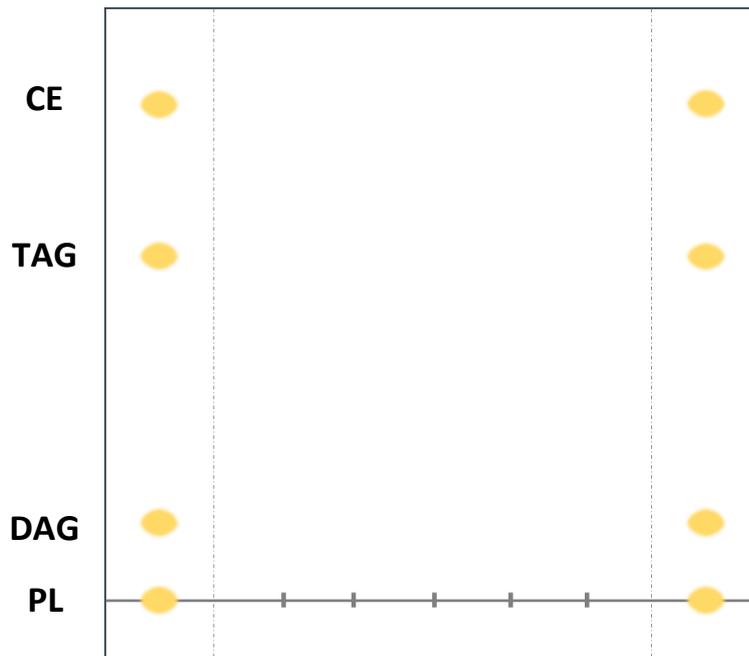


Figura 8. Separación de especies lipídicas mediante TLC, utilizando como fase móvil hexano/dietil éter/ácido acético en proporción 70:30:1 en volumen. En el centro las muestras y en los extremos los patrones de las distintas especies lipídicas, teñidos con yodo.

Derivatización de los ácidos grasos a ésteres metílicos.

Se derivaron los ácidos grasos contenidos en las diferentes especies lipídicas a ésteres metílicos para que fueran volátiles y se pudieran analizar en el equipo GC-MS.

Este protocolo se utilizó tras la extracción de lípidos para analizar el contenido total de ácidos grasos (transmetilación total) y se utilizó tras la separación mediante TLC para analizar el contenido en ácidos grasos de cada una de las especies lipídicas separadas: PL, DAG, TAG y CE.

La muestra se disolvió en 50 μ l de cloroformo/metanol (2:1) y se añadió 500 μ l de KOH 0,5 M en metanol anhidro durante 60 minutos a 37°C en constante agitación. Una vez se ha producido la transmetilación, la reacción se neutraliza con 500 μ l de HCl 0,5 M.

Se añadieron 2 ml de hexano para extraer los ésteres metílicos de los ácidos grasos, se agitó durante 30 segundos y se centrifugó a 800 x g durante 5 minutos a 16 °C. Se colectó la fase orgánica y se evaporó el disolvente a vacío.

Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos

Tras su transesterificación, los ésteres se analizaron mediante un cromatógrafo de gases (Agilent 7890A) acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo (Agilent 5975C). La columna de separación del cromatógrafo era Agilent DB23 (60 m longitud x 250 mm diámetro interno, 0.15 mm de espesor de película). Casa comercial *Agilent, EE.UU.* El software utilizado para el control del equipo fue Agilent G1701EA MSD Productivity Chemstation (*Agilent*).

La muestra se disolvió en 100 µl de hexano y se trasvasó a un vial para su inyección en el equipo. La cuantificación de los ésteres metílicos derivados de los ácidos grasos se realizó mediante la integración del área bajo la curva de los picos del cromatograma. Estos valores se extrapolaron a pmol mediante rectas de calibrado para cada uno de los ésteres de ácidos grasos. Dichas rectas de calibrado se obtuvieron mediante patrones externos comerciales de los ésteres metílicos de ácidos grasos.

Se tuvo en cuenta el rendimiento del proceso mediante los patrones internos añadidos previos a la extracción del contenido lipídico.

Estudio estadístico

Se utilizó el valor promedio \pm error estándar (SEM) para representar los datos. El análisis estadístico se hizo usando el test de Student para comparar entre dos grupos y mediante ANOVA de dos vías, para contemplar la interacción de dos variables. El programa utilizado fue *GraphPad Prism4* (GraphPad software, EE.UU.). Se consideran diferencias significativas a valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Viabilidad celular por MTT

Se comenzó el estudio por evaluar si el tratamiento con el ácido graso 16:1n-9 tiene efectos deletéreos y qué concentración de ácido graso se puede administrar a las células INS-1E. Se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante el compuesto MTT para evaluar los efectos en varias concentraciones. Se estableció un intervalo de concentraciones de 16:1n-9 en el rango μmolar y sus correspondientes controles de vehículo. Se trató las células durante 24 horas.

Se realizaron tres experimentos por triplicado y se normalizó cada experimento por el valor de absorbancia del control negativo. Todas las absorbancias se expresaron en variación en tanto por ciento respecto al control negativo.

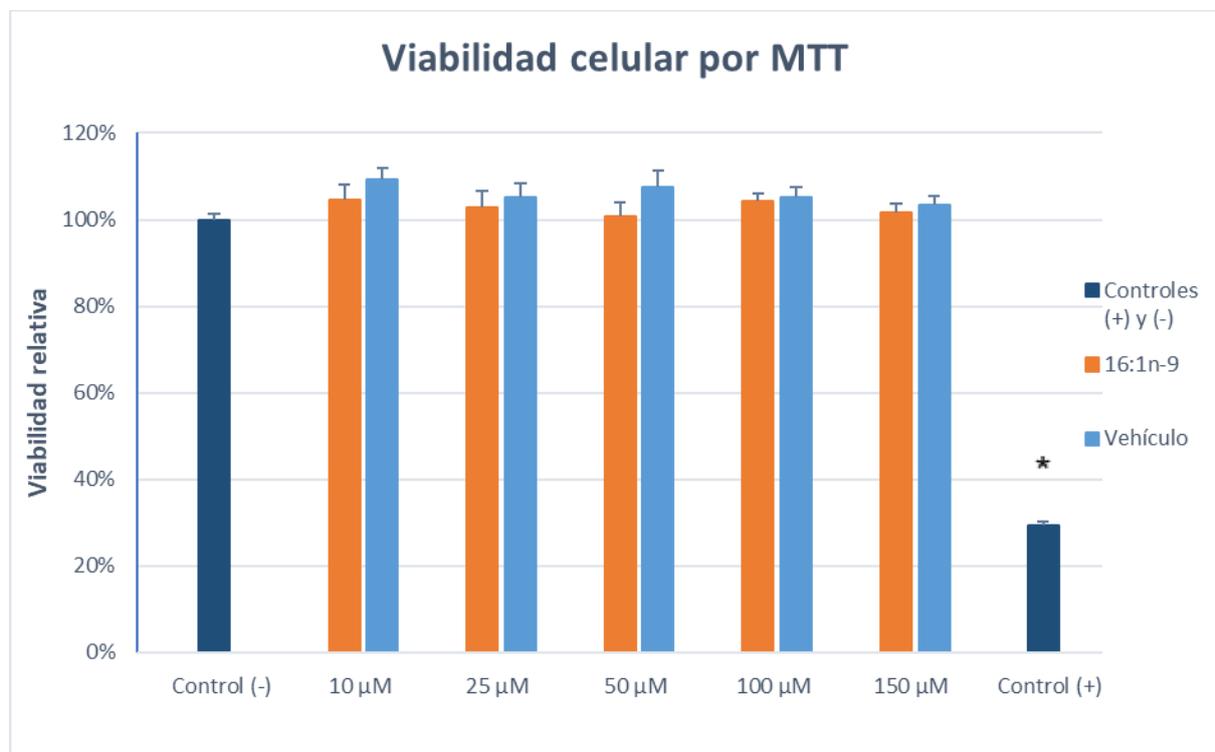


Figura 9. Viabilidad celular por MTT de las células INS-1E. Tratamiento con el ácido graso 16:1n-9 (10-150 μM) durante 24h. $n=3$, por triplicado. Se consideran diferencias significativas * $p<0,05$.

La viabilidad celular de las células tratadas con el ácido graso 16:1n-9 respecto a la viabilidad de los controles no presenta diferencias significativas en las concentraciones estudiadas.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante un ANOVA de dos vías. El tratamiento con el ácido graso y la variación en la concentración del mismo no afectan a la viabilidad celular. El control positivo presenta diferencias significativas respecto al control negativo, confirmando la validez de la técnica.

Efecto del ácido graso 16:1n-9 sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa en la línea celular INS-1E.

Para caracterizar la función de las células INS-1E, modelo de célula beta-pancreática de rata, y ver los efectos del ácido graso 16:1n-9 sobre dicha función celular, se llevó a cabo un experimento de secreción de insulina estimulada por glucosa en células con y sin tratamiento.

Se establecieron como condiciones del experimento una concentración de 16:1n-9 de 50 μ M y concentraciones de glucosa 2 y 16 mM. Se realizó un experimento por triplicado.

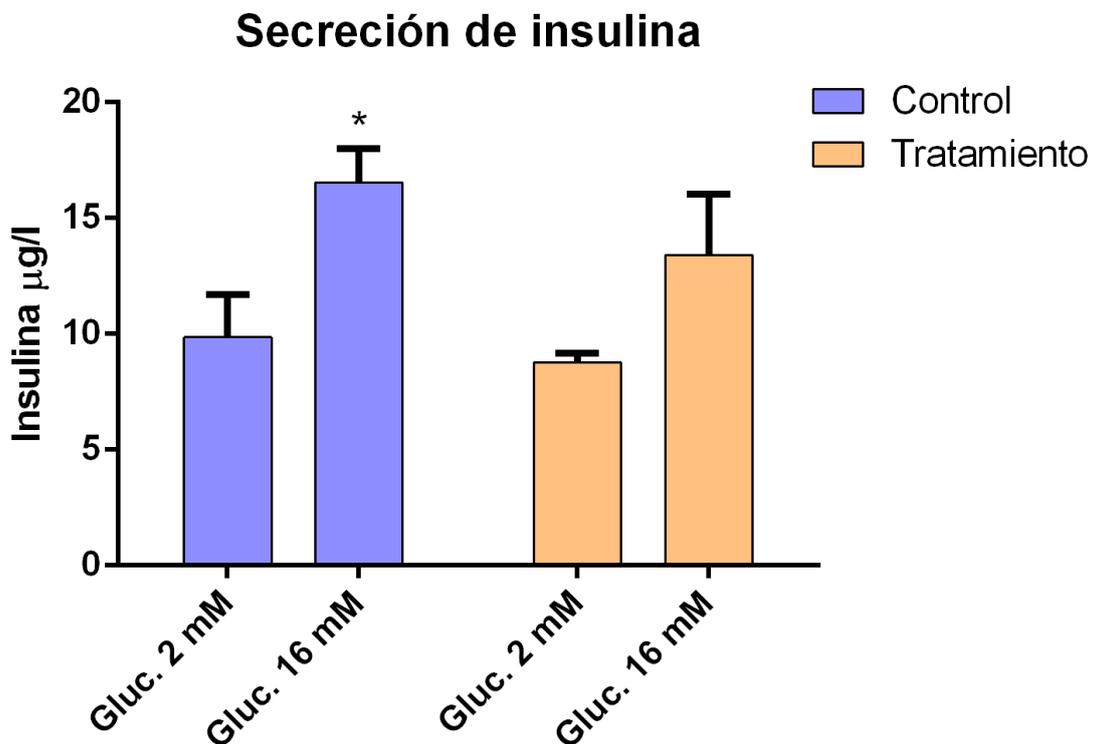


Figura 10. Secreción de insulina estimulada por glucosa en células INS-1E. Tratamiento durante 24h con 16:1n-9 (50 μ M). n=1 por triplicado. * $p < 0,05$ respecto al control, glucosa 2 mM.

Las células INS-1E responden en función de la concentración de glucosa, secretan un 60% más de insulina cuando son estimuladas por la alta concentración de glucosa, 16 mM, respecto a la concentración de 2 mM en la condición control (Figura 10).

No se observan cambios en la secreción de insulina debido al tratamiento con el ácido graso 16:1n-9, obteniendo concentraciones de insulina similares a la condición control a 2 mM y a 16 mM.

Estudio del contenido celular de ácidos grasos en la línea celular INS-1E

Se caracterizó el contenido de ácidos grasos de las células INS-1E, Figura 11. Los ácidos grasos mayoritarios en esta célula son el ácido palmítico (16:0) y ácido oleico (18:1n-9), la cantidad de ácido cis-7-hexadecenoico (16:1n-9) en la célula es aproximadamente 20 nmol por cada miligramo de proteína.

El contenido lipídico de las células fue extraído y, posteriormente, analizado siguiendo los protocolos descritos en materiales y métodos.

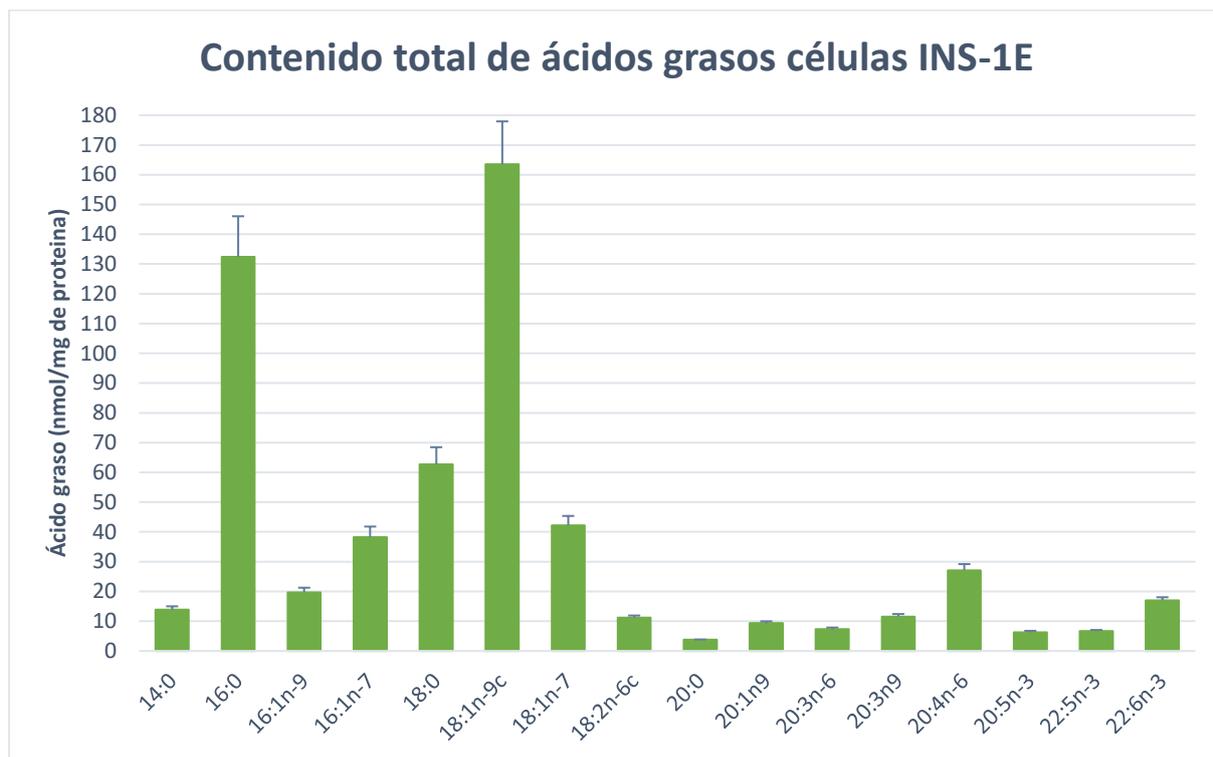


Figura 11. Contenido en ácidos grasos de las células INS-1E. Se cultivaron las células con medio completo y se extrajo su contenido lipídico. $n=2$.

Tratamiento con el ácido graso 16:1n-9 y glucosa para el estudio del contenido celular de ácidos grasos en la línea celular INS-1E.

La variación del contenido de ácidos grasos de las células se estudió tras someterlas a un tratamiento con el ácido graso 16:1n-9 50 μM durante 24h y un tratamiento con glucosa.

	Control	Tratadas 16:1n-9	Glucosa 2 mM	Glucosa 16 mM
■	+	-	+	-
■	+	-	-	+
■	-	+	+	-
■	-	+	-	+

Ácidos grasos totales

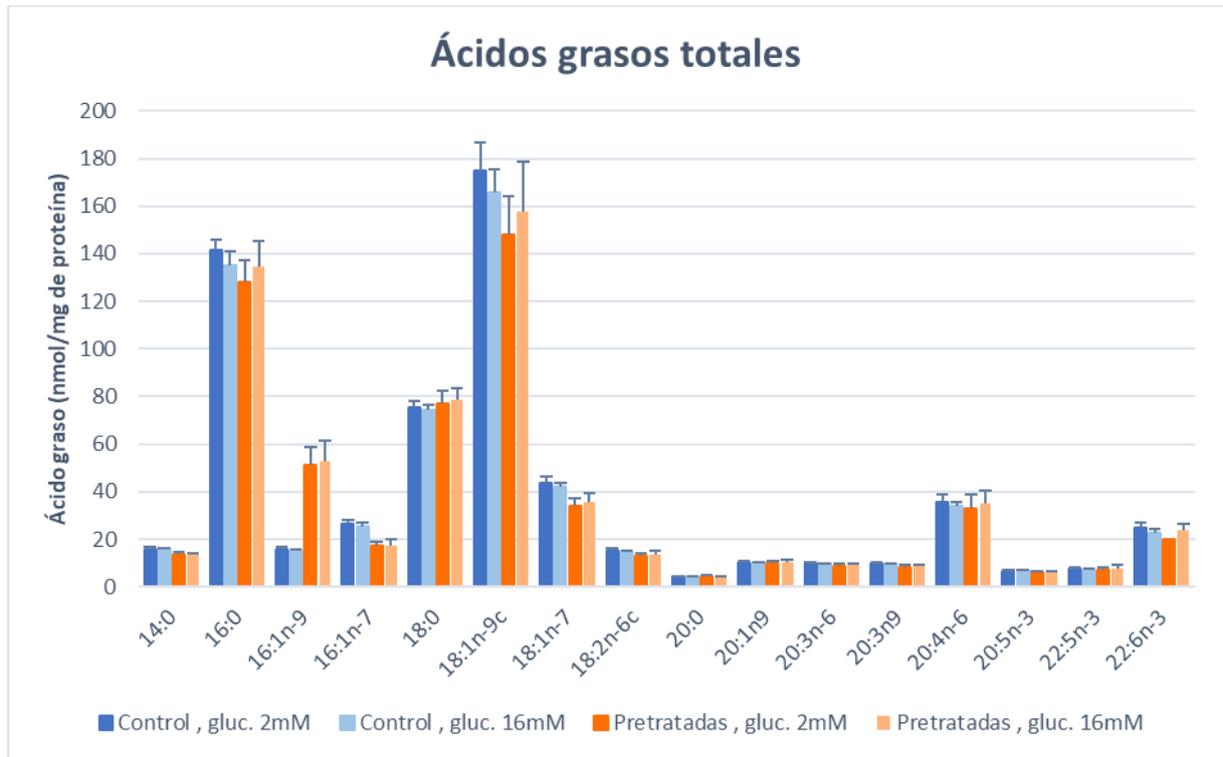


Figura 12. Contenido en ácidos grasos de las células INS-1E tratadas con 16:1n-9 50 μ M durante 24 horas y tratadas con glucosa 2 y 16 mM. n=3.

Las células tratadas con una concentración de glucosa u otra no presentan diferente concentración de ácidos grasos (Figura 12). No se encontraron evidencias de que la diferente estimulación con glucosa produzca cambios en sus ácidos grasos.

Los únicos cambios encontrados son un aumento del ácido graso con las que han sido tratadas, 16:1n-9, y una disminución de los ácidos grasos 16:1n-7 y 18:1n-7 en las células tratadas respecto a sus controles.

Los niveles de 16:1n-9 aumentan significativamente (Figura 13) en las células tratadas con dicho ácido graso, confirmando que la célula incorpora este ácido graso y pasa a formar parte de las especies lipídicas que la componen. El análisis estadístico determinó que el diferente tratamiento de glucosa no afecta la cantidad de ácido graso de la célula y el tratamiento con 16:1n-9 produce diferencias significativas ($p = 0,0003$).

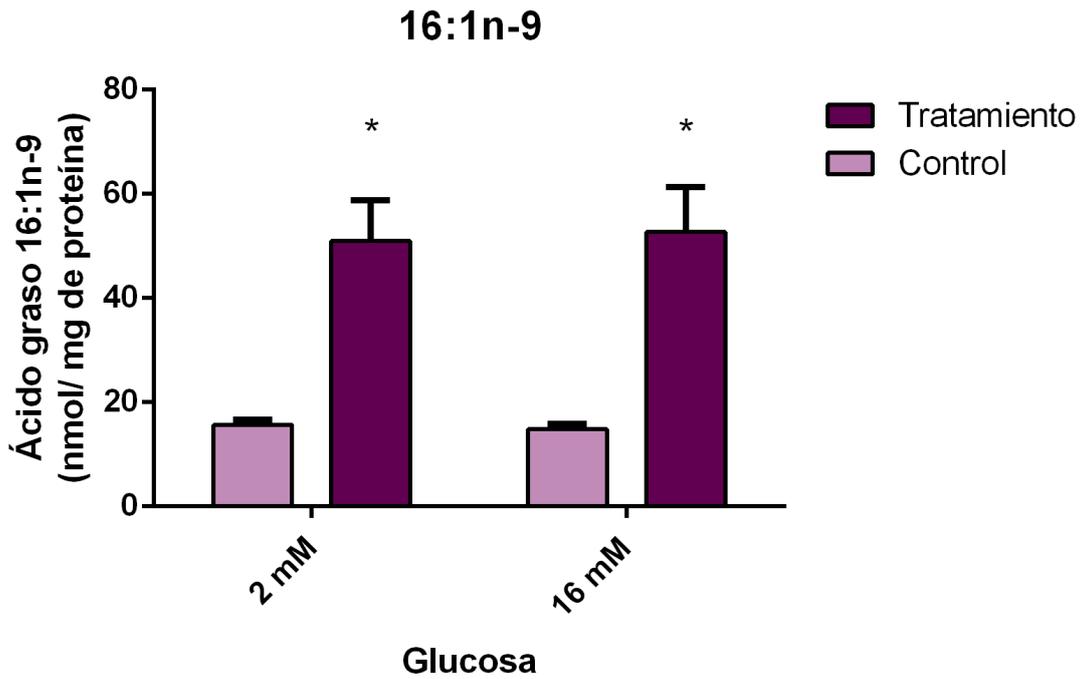


Figura 13. Contenido total de ácido graso 16:1n-9 en células INS-1E pretratadas con 16:1n-9 50 μ M durante 24h y tratadas con glucosa 2 y 16 mM. Se consideran significativos valores * $p < 0,05$.

Los niveles de 16:1n-7 y 18:1n-7 disminuyen significativamente en las células tratadas con el ácido graso 16:1n-9. El diferente tratamiento de glucosa no afecta la cantidad de ácido graso de la célula. En ambos se observan diferencias significativas entre las células tratadas y los controles, 16:1n-7 ($p = 0,0028$) y 18:1n-7 ($p = 0,0228$)

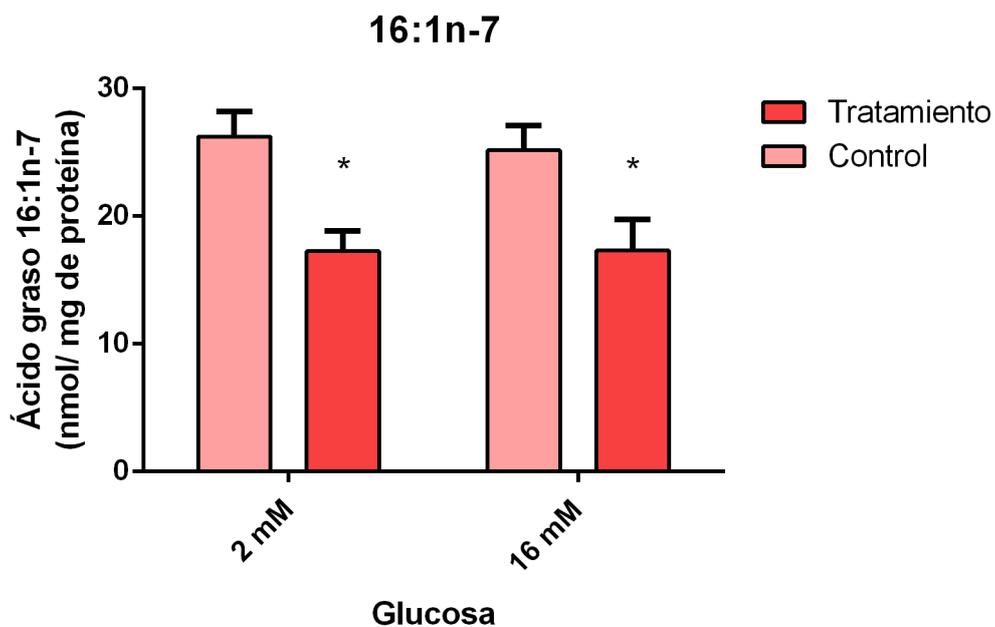


Figura 14. Contenido total de ácido graso 16:1n-7 en células INS-1E pretratadas con 16:1n-9 50 μ M durante 24h y tratadas con glucosa 2 y 16 mM. Se consideran significativos valores * $p < 0,05$.

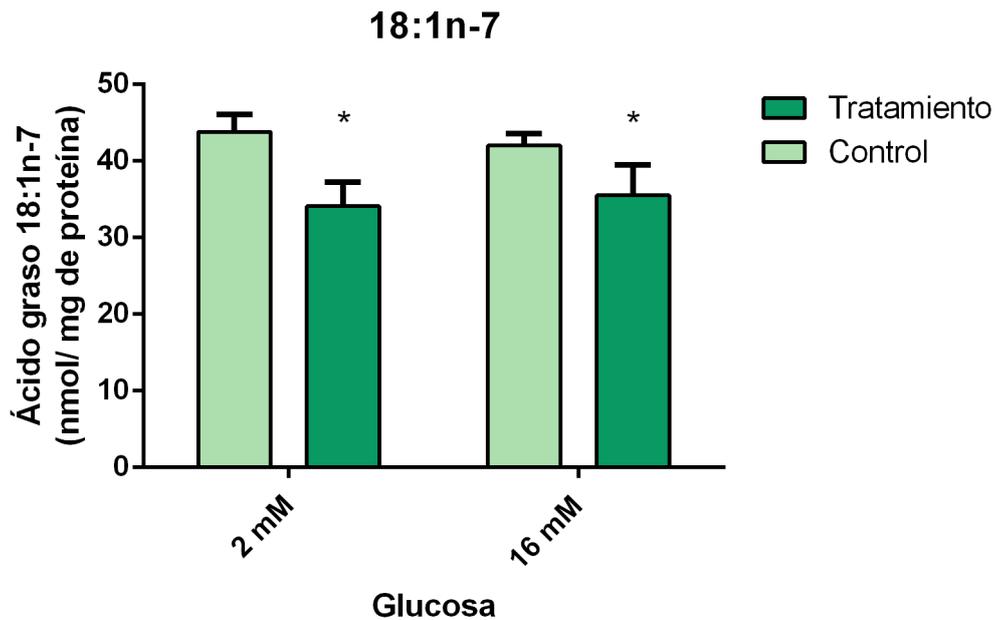


Figura 15. Contenido total de ácido graso 18:1n-7 en células INS-1E pretratadas con 16:1n-9 50 μ M durante 24h y tratadas con glucosa 2 y 16 mM. Se consideran significativos valores * $p < 0,05$.

Ácidos grasos contenidos en las diferentes especies lipídicas

Con el fin de esclarecer en que especie o especies lipídicas se incorporaba el ácido graso 16:1n-9 y en qué proporción, se analizó los ácidos grasos contenidos en fosfolípidos, triacilglicerol, diacilglicerol y ésteres de colesterol.

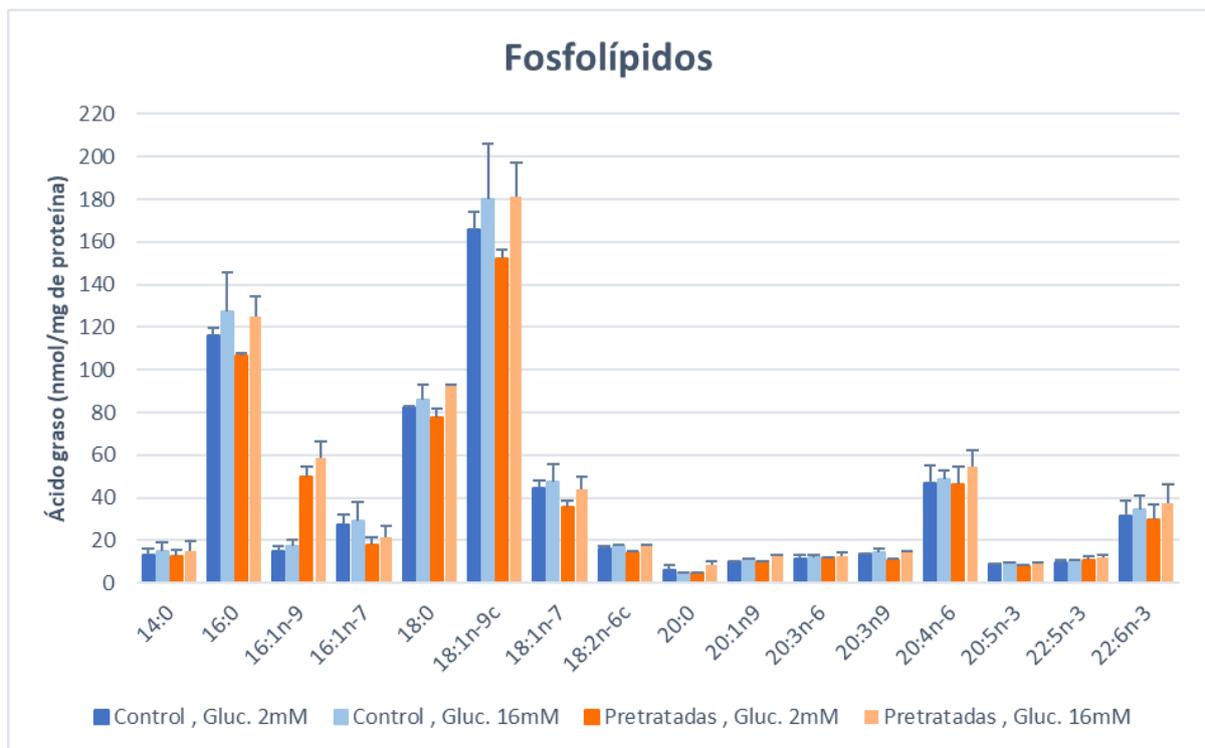


Figura 16. Ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de las células INS-1E tratadas con 16:1n-9 50 μ M durante 24 horas y tratadas con glucosa 2 y 16 mM. n=2.

Los fosfolípidos son la especie más abundante, tienen un perfil similar al total en cuanto a la proporción de ácidos grasos (Figura 16). No hay cambios significativos en ningún ácido graso debido al tratamiento de glucosa. Existen diferencias significativas en la cantidad de 16:1n-9 en células tratadas con dicho ácido graso, $p=0,0017$ (Figura 17).

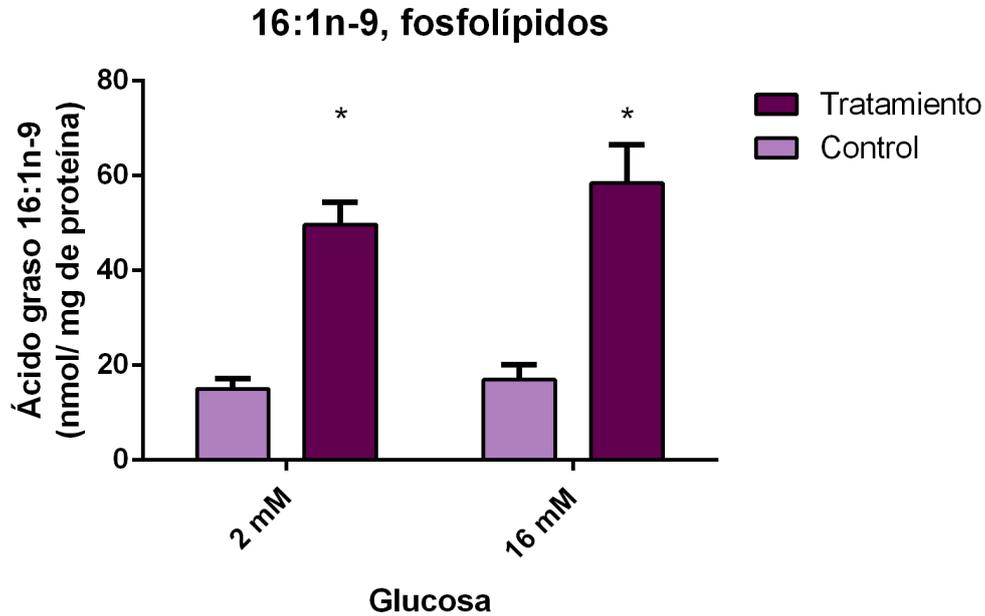


Figura 17. Contenido del ácido graso 16:1n-9 en fosfolípidos. Células INS-1E tratadas con 16:1n-9 50 μ M durante 24h y tratadas con glucosa 2 y 16 mM. *Se consideran significativos valores $*p<0,05$.

Las especies de triacilglicerol, diacilglicerol y ésteres de colesterol son mucho menos abundantes, y muchos de los ácidos grasos no se encuentran presentes en estas especies lipídicas.

No se encontraron diferencias significativas en ningún ácido graso perteneciente a dichas especies, tampoco en el caso del ácido graso 16:1n-9, aunque se puede observar que tiende a incorporarse en las células tratadas, incrementando su concentración (Figura 18, Figura 19, Figura 20).

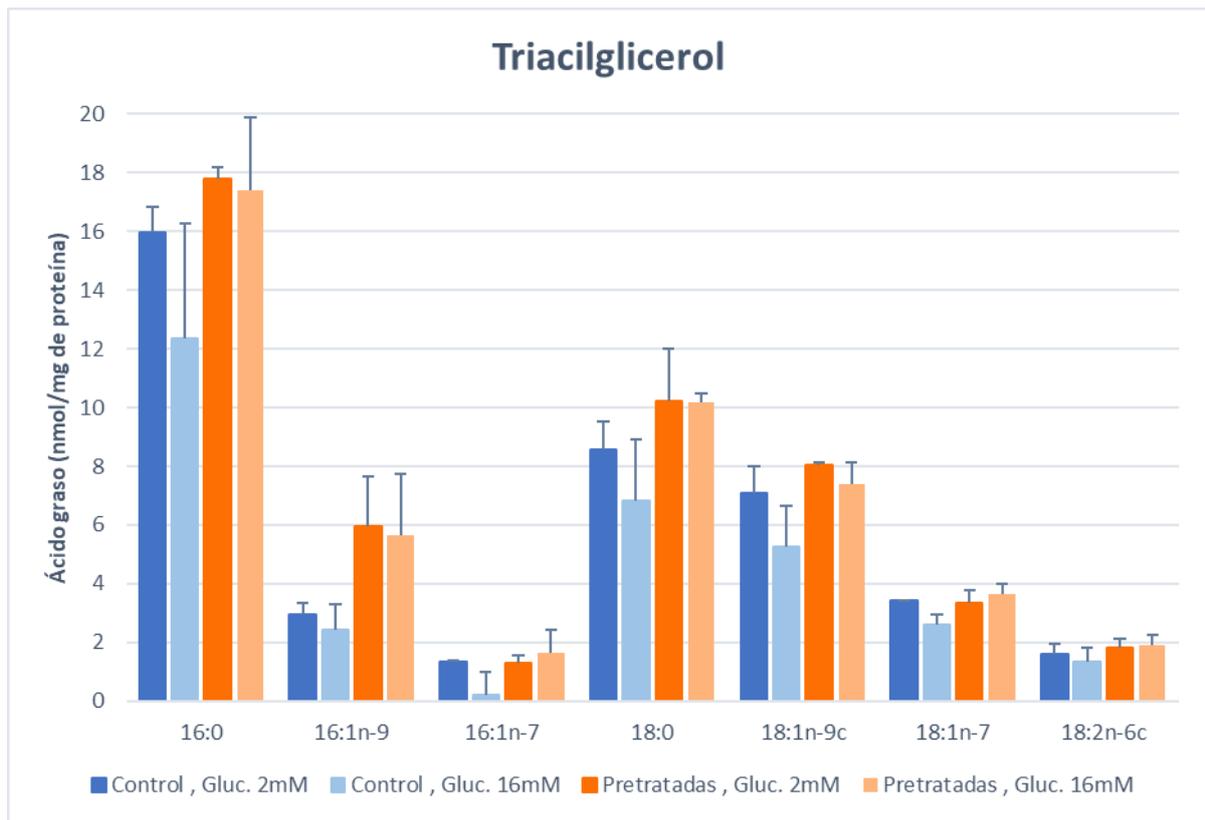


Figura 18. Ácidos grasos presentes en el triacilglicerol de las células INS-1E tratadas con 16:1n-9 50 μ M durante 24 horas y tratadas con glucosa 2 y 16 mM. n=2.

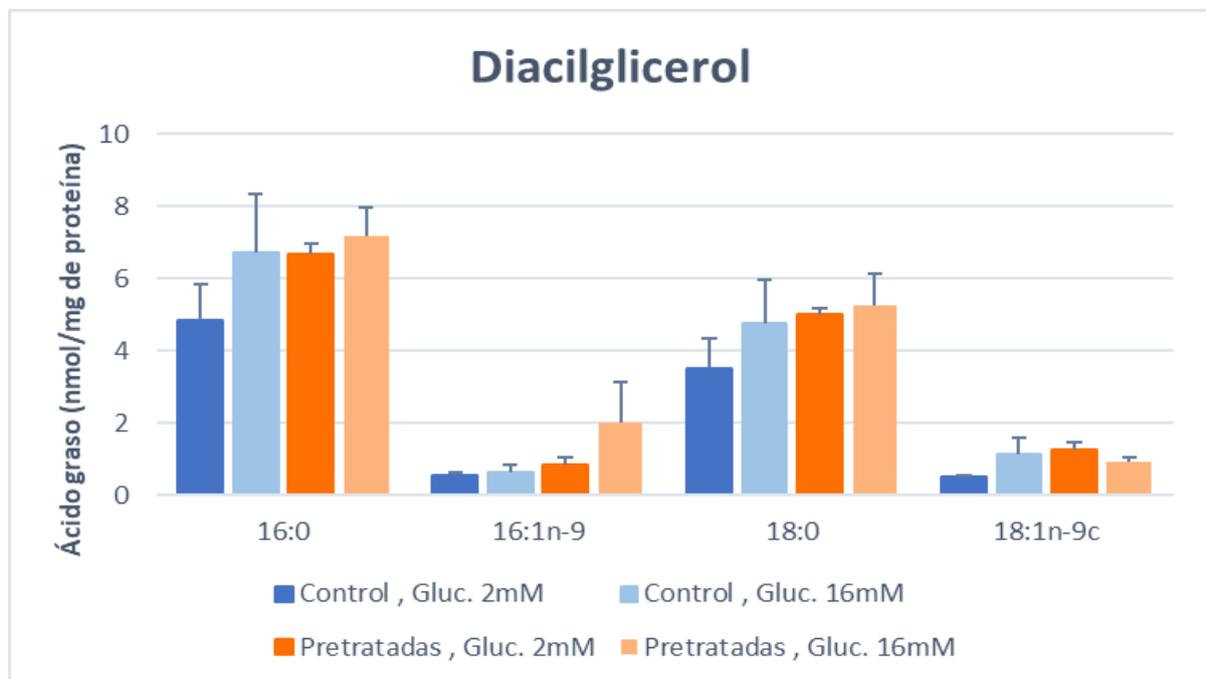


Figura 19. Ácidos grasos presentes el diacilglicerol de las células INS-1E tratadas con 16:1n-9 50 μ M durante 24 horas y tratadas con glucosa 2 y 16 mM. n=2.

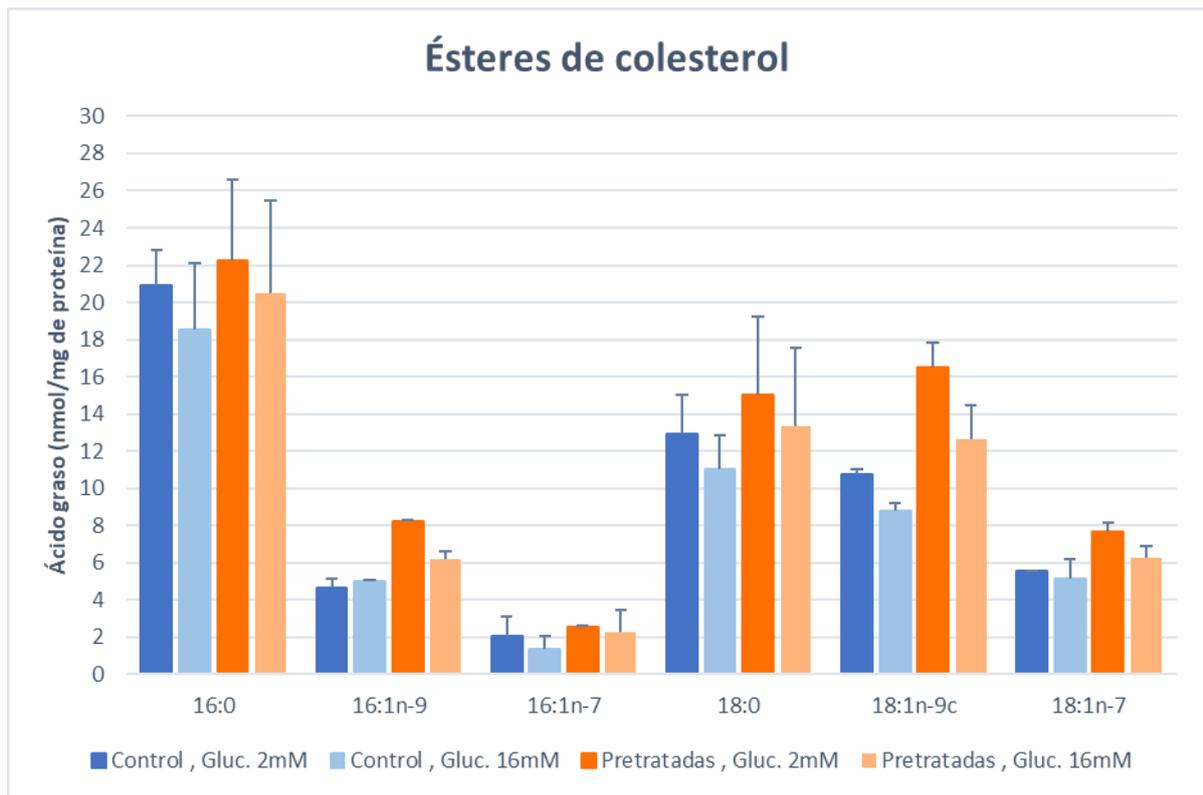


Figura 20. Ácidos grasos presentes en los ésteres de colesterol de las células INS-1E tratadas con 16:1n-9 50 μ M durante 24 horas y tratadas con glucosa 2 y 16 mM. n=2.

DISCUSION

En este trabajo se ha realizado una primera aproximación al estudio del ácido graso 16:1n-9 en la célula beta-pancreática en el modelo INS-1E, a nivel de viabilidad, función e impacto en su contenido lipídico. Las concentraciones utilizadas para el estudio son de orden μ molar, cantidad a la que un ácido graso libre es capaz de ser bioactivo para la célula.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el ácido graso 7-hexadecenoico (16:1n-9) no tiene efectos en la viabilidad de la célula beta-pancreática en las concentraciones comprendidas entre 10 μ M y 150 μ M. Estas concentraciones de ácido graso 16:1n-9 no tienen efectos deletéreos en las células.

La secreción de insulina nos indica que el modelo de célula beta-pancreática INS-1E responde a los estímulos de glucosa, las células secretan un 60% más de insulina cuando son estimuladas por una alta concentración de glucosa, 16 mM, respecto a la concentración baja de glucosa, 2 mM. Esto nos indica que las células son funcionales. Las mismas células, tras haber sido tratadas durante 24h con el ácido graso presentan el mismo perfil que los controles y los mismos valores de secreción de insulina tras los estímulos de glucosa a 2 mM y 16 mM, por lo que la función de la célula beta-pancreática INS-1E no se ve alterada por el ácido graso 16:1n-9 a la concentración de 50 μ M.

La caracterización de los ácidos grasos de las células INS-1E mostró su alto contenido en ácidos palmítico, el 23% respecto al total, y oleico, 28% respecto al total. El ácido graso 16:1n-9 está presente en las células INS-1E de manera endógena, en una cantidad de 20 nmol/mg de proteína, lo que supone un 3% de su contenido total en ácidos grasos.

Las células no presentan variaciones en la concentración de sus ácidos grasos tras el tratamiento con glucosa, por lo que los diferentes estímulos de glucosa y su correspondiente secreción de insulina no producen cambios en el contenido lipídico de las células a cómputo total. Tampoco se han encontrado variaciones en las distintas especies lipídicas de la célula debido al estímulo de glucosa. Los resultados obtenidos no sugieren que la célula libere ácidos grasos junto con la secreción de insulina ni un reordenamiento de los mismos entre las diferentes especies que la componen.

Las células incorporan el ácido graso 16:1n-9 en su interior tras ser tratadas, triplicando la cantidad de este. Al ser incorporado por la célula, cabría esperar que desplazara otros ácidos grasos, ocupando su lugar, como ocurre en otros estudios. La disminución es notable para los ácidos palmítico (16:1n-7) y vaccénico (18:1n-7), cuya disminución es significativa respecto a los controles. El ácido graso 18:1n-7 proviene de una elongación de dos carbonos del ácido graso 16:1n-7, por lo que la caída en la concentración en ambos ácidos grasos puede estar originada por una disminución inicial de la cantidad del ácido graso 16:1n-7, y en consecuencia de la cantidad de 18:1n-7 que genera.

El incremento medio de 16:1n-9 es de 36 nmol por miligramo de proteína celular, en cambio, el decremento medio de los ácidos 16:1n-7 y de 18:1n-7 es de 8 nmol por

miligramo de proteína cada uno. La disminución en el contenido en estos ácidos grasos no compensa el aumento del ácido 16:1n-9, por tanto, los 20 nmol restantes podrían estar repartidos y haber desplazado el resto de ácidos grasos en menor medida, tal que los decrementos no resultan tan notables en la cantidad total de ácidos grasos de la célula.

Se podría esperar un decremento más notorio si este ácido graso se incorporase en una clase de lípido concreto, desplazando sus ácidos grasos. Por ello se analizaron los ácidos grasos según la especie lipídica que los contenga.

Se encontró una proporción parecida de 16:1n-9, 16:1n-7 y 18:1n-7 en fosfolípidos, la especie más abundante. La mayor parte del ácido graso 16:1n-9 se ha incorporado en forma de fosfolípido. Analizando los ácidos grasos de triacilglicerol, se vio que el tratamiento se incorporaba también en esta especie lipídica, duplicando su contenido. Al ser una especie menos abundante, no supone una gran diferencia en nmol de ácido graso por miligramo de proteína. En el caso de los ácidos grasos de las especies de diacilglicerol y ésteres de colesterol, se aprecia una ligera incorporación, pero no tan destacable, siendo de muy pocos nmol por miligramo de proteína.

Considerando los resultados obtenidos, el ácido graso 16:1n-9 desplaza a los ácidos 16:1n-7 y 18:1n-7, mayormente en fosfolípidos, pero no desplaza la cantidad suficiente de dichos ácidos grasos en comparación a la cantidad de ácido graso 16:1n-9 que alojan las células en sus fosfolípidos. Es plausible que la célula sintetice nuevos fosfolípidos para dar cabida al ácido graso 16:1n-9, esto supondría generar un 2% más de fosfolípidos, suponiendo fosfolípidos con dos ácidos grasos 16:1n-9 en su estructura, PL(16:1n-9, 16:1n-9). Las células tratadas poseen un 3% más de fosfolípidos respecto a las células sin tratar, lo que apoya este supuesto. El resto de especies lipídicas también aumentan en las células tratadas, reafirmando esta posibilidad, puesto que su síntesis parten de los fosfolípidos. Todo parece indicar que las células generan estructuras lipídicas *de novo* para incorporar el ácido graso 16:1n-9. Este gasto energético que asumen las células puede estar promovido por un potencial bioactivo de este ácido graso. Como indican recientes estudios, ácidos grasos 16:1 podrían formar estructuras determinadas con otras especies, preferentemente de fosfatidilcolina.²²

A la vista de los resultados, el ácido graso 7-hexadecenoico (16:1n-9) entra en las células beta-pancreáticas INS-1E y podría tener un papel bioactivo en las mismas. Esto sugiere que puede tener efectos en las células, ya sea en la secreción de insulina o como posible agente protector. Entre las posibles futuras direcciones de este trabajo, se podría continuar estudiando cómo influye el ácido graso 16:1n-9 durante la secreción de insulina, tratando de forma aguda a las células, junto con la estimulación de glucosa para comprobar si influye en la capacidad de la célula de secretar esta hormona. También sería interesante comprobar si afecta a la producción de insulina de la célula, estudiando la insulina intracelular en condiciones de alta y baja concentración de glucosa, como ocurre en otros estudios con ácidos grasos antiinflamatorios en esta misma línea celular.¹⁴

Se podría estudiar posibles efectos protectores del ácido graso 16:1n-9 ante condiciones de toxicidad celular propias del desarrollo de la diabetes, tratando las células con este ácido graso en condiciones de hiperglucemia sostenida o en condiciones de lipotoxicidad, por ejemplo, junto con ácido palmítico (16:0), ácido graso implicado en la generación de especies reactivas de oxígeno y en el daño a la célula beta-pancreática.²⁶⁻²⁸

Otra posible línea de investigación sería estudiar la síntesis de fosfolípidos llevada a cabo por las células. Podría evaluarse el incremento de fosfolípidos mediante determinación de fósforo en las células, esto supondría una medida indirecta de la cantidad de fosfolípidos de las células y del incremento en la misma tras el tratamiento con 16:1n-9, siempre y cuando las células posean la misma cantidad de plasmalógenos en sus fosfolípidos. Otro estudio de gran interés sería averiguar qué estructura concreta de fosfolípidos que se generan tras la incorporación del ácido graso 16:1n-9 mediante espectrometría de masas.²² Tras esa serie de experimentos, sería posible evaluar como la célula utiliza el ácido graso 16:1n-9.

CONCLUSIONES

1. El ácido graso 7-hexadecenoico, 16:1n-9, no afecta a la viabilidad de las células beta-pancreáticas INS-1E.
2. Las células beta-pancreáticas INS-1E mantienen su función secretora de insulina estimulada por glucosa en condiciones de tratamiento con el ácido 16:1n-9.
3. El ácido graso 16:1n-9 es adquirido por las células y pasa a formando parte de sus especies lipídicas, en su gran mayoría forma fosfolípidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chan, M. Informe mundial sobre la diabetes. *Resum. orientación* 1–84 (2016). doi:10.18004/rvspmi/2312-3893/2016.03(02)71-076
2. Comité de la 8va edición de Diabetes Atlas. *Diabetes Atlas. Federación Internacional de Diabetes* **8**, (2017).
3. Soriguer, F. *et al.* Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: The Di@bet.es Study. *Diabetologia* **55**, 88–93 (2012).
4. Eberhard, D. & Lammert, E. The pancreatic β -cell in the islet and organ community. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 469–475 (2009).
5. Donath, M. Y. & Halban, P. A. Decreased beta-cell mass in diabetes: Significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* **47**, 581–589 (2004).
6. Weir, G. C., Laybutt, D. R., Kaneto, H., Bonner-weir, S. & Sharma, A. the Progression of Diabetes. **50**, (2001).
7. Merglen, A. *et al.* Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. *Endocrinology* **145**, 667–678 (2004).
8. Asfari, M. *et al.* Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* **130**, 167–178 (1992).
9. Morgan, N. G., Leete, P., Foulis, A. K. & Richardson, S. J. Islet inflammation in human type 1 diabetes mellitus. *IUBMB Life* **66**, 723–734 (2014).
10. Calle, M. C. & Fernandez, M. L. Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* **38**, 183–191 (2012).
11. Eguchi, K. & Manabe, I. Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes, Obes. Metab.* **15**, 152–158 (2013).
12. Donath, M. Y. & Shoelson, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 98–107 (2011).
13. Donath, M. Y., Størling, J., Maedler, K. & Mandrup-Poulsen, T. Inflammatory mediators and islet β -cell failure: A link between type 1 and type 2 diabetes. *J. Mol. Med.* **81**, 455–470 (2003).
14. Graciano, M. F., Leonelli, M., Curi, R. & R.Carpinelli, A. Omega-3 fatty acids control productions of superoxide and nitrogen oxide and insulin content in INS-1E cells. *J. Physiol. Biochem.* **72**, 699–710 (2016).
15. Maedler, K., Bucher, P., Spinass, G. A. & Donath, M. Y. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. - PubMed - NCBI. **52**, 1–8 (2003).
16. Cao, H. *et al.* Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism. *Cell* **134**, 933–944 (2008).

17. Chan, K. L. *et al.* Palmitoleate reverses high fat-induced proinflammatory macrophage polarization via AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Biol. Chem.* **290**, 16979–16988 (2015).
18. Talbot, N. A., Wheeler-Jones, C. P. & Cleasby, M. E. Palmitoleic acid prevents palmitic acid-induced macrophage activation and consequent p38 MAPK-mediated skeletal muscle insulin resistance. *Mol. Cell. Endocrinol.* **393**, 129–142 (2014).
19. Guo, X. *et al.* Palmitoleate induces hepatic steatosis but suppresses liver inflammatory response in mice. *PLoS One* **7**, 1–9 (2012).
20. Samad, A. *et al.* Insulin protects pancreatic acinar cells from palmitoleic acid-induced cellular injury. *J. Biol. Chem.* **289**, 23582–23595 (2014).
21. Guijas, C., Meana, C., Astudillo, A. M., Balboa, M. A. & Balsinde, J. Foamy Monocytes Are Enriched in cis -7- Hexadecenoic Fatty Acid (16 : 1n-9), a Possible Biomarker for Early Detection of Cardiovascular Article Foamy Monocytes Are Enriched in cis -7-Hexadecenoic Fatty Acid (16 : 1n-9), a Possible Biomarker for Early. 689–699 (2016).
22. Astudillo, A. M. *et al.* Occurrence and biological activity of palmitoleic acid isomers in phagocytic cells. *J. Lipid Res.* **59**, 237–249 (2018).
23. Fernández-Díaz, C. M. *et al.* Insulin degrading enzyme is up-regulated in pancreatic β cells by insulin treatment. *Histol. Histopathol.* 11997 (2018). doi:10.14670/HH-11-997
24. Bligh, E. . & Dyer, W. . Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
25. Balsinde, J. Mechanism of arachidonic acid liberation in ethanol-treated mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **1169**, 54–58 (1993).
26. Graciano, M. F. R., Santos, L. R. B., Curi, R. & Carpinelli, A. R. NAD(P)H oxidase participates in the palmitate-induced superoxide production and insulin secretion by rat pancreatic islets. *J. Cell. Physiol.* **226**, 1110–1117 (2011).
27. Graciano, M. F., Valle, M. M., Curi, R. & Carpinelli, A. R. Evidence for the involvement of GPR40 and NADPH oxidase in palmitic acid-induced superoxide production and insulin secretion. *Islets* **5**, 139–148 (2013).
28. Carlsson, C. & Borg, L. A. H. Uncoupling and Reactive Oxygen Species in Rat Pancreatic Islets in Vitro *. *Endocrinology* **140**, 3422–3428 (1999).