

# ARTÍCULOS DE REVISIÓN REVIEW ARTICLES

---

## Diabetes tipo 2: gluco-lipo-toxicidad y disfunción de la célula $\beta$ pancreática

*Type 2 diabetes: gluco-lipo-toxicity and pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction*

ROCHE E

División de Nutrición, Departamento de Biología Aplicada. Universidad Miguel Hernández  
03550-Sant Joan (Alicante). e-mail: eroche@umh.es

### RESUMEN

La célula  $\beta$  pancreática secreta insulina en función de la concentración extracelular de glucosa y de otros nutrientes circulantes, como son los ácidos grasos. Esta podría definirse como una adaptación fisiológica normal de la secreción de la hormona en función de la demanda. Sin embargo este patrón secretor se pierde en condiciones de hiperglucemia e hiperlipidemia crónicas típicas de la patología diabética. La evidencia experimental correlaciona la presencia en exceso de dichos nutrientes con el desarrollo de la enfermedad. Este fenómeno, denominado glucotoxicidad para la glucosa o lipotoxicidad para los ácidos grasos, contempla la propiedad por parte de dichos nutrientes de controlar diversos programas génicos que desembocarían en profundas alteraciones fenotípicas en la célula  $\beta$ . En primera instancia, la célula  $\beta$  tiene mecanismos de adaptación y detoxificación para esta situación desfavorable y mantener una correcta respuesta secretora. Sin embargo, cuando la situación de hiperglucemia e hiperlipidemia crónica se da sobre todo de forma conjunta, se activan programas de suicidio celular que culminan en la desaparición de estas células productoras de insulina y la aparición de la diabetes.

Palabras clave: Célula  $\beta$ . Diabetes. Glucotoxicidad. Lipotoxicidad.

### ABSTRACT

*The pancreatic  $\beta$ -cell secretes insulin according to extracellular glucose concentration. Other nutrients, such as fatty acids, are also implicated in the secretory process. This could be defined as a normal physiological adaptation of hormone secretion to extracellular demand. However, this secretory pattern is abolished in chronic hyperglycemic and hyperlipidemic conditions, typical of diabetic pathology. Experimental evidence directly correlates the sustained concentrations of these nutrients with the development of the disease. In this phenomenon, known as glucotoxicity, when glucose alters  $\beta$  cell function, and lipotoxicity for fatty acids, the nutrients affect various gene programs, leading to key phenotypic changes in the  $\beta$ -cell. In order to maintain a correct secretory response,  $\beta$ -cells possess mechanisms to adapt and detoxify the excess of nutrients. However, programmed cell death occurs when sustained hyperglycemia and hyperlipidemia appear simultaneously. This situation culminates in  $\beta$ -cell loss, lack of insulin and overt diabetes.*

Keywords:  $\beta$ -cell. Diabetes. Glucotoxicity. Lipotoxicity.

### HIPERINSULINEMIA Y RESISTENCIA A LA INSULINA

La diabetes tipo 2 es considerada como una enfermedad multifactorial donde los factores genéticos y los ambientales se dan la mano<sup>1, 2</sup>. Hiperinsulinemia y resistencia a la insulina son 2 entidades que aparecen durante el desarrollo de esta patología<sup>3</sup>. Ciertos estudios apuntan que

### HYPERINSULINEMIA AND INSULIN RESISTANCE

Type 2 diabetes can be considered a multifactorial disease, in which environmental and genetic factors affect in equal manner<sup>1, 2</sup>. Hyperinsulinemia and insulin resistance are 2 entities which are present during the development of this pathology<sup>3</sup>. Some studies indicate that hyperin-

la hiperinsulinemia ocurre como una consecuencia de la resistencia a la insulina<sup>4,5</sup>, mientras que otros estudios defienden que la hiperinsulinemia es la que causa resistencia a la insulina<sup>6,7</sup>. Por el momento, ninguno ha logrado clarificar qué fenómeno precede al otro en el desarrollo de esta enfermedad.

Esto quizás sea debido a que ambas situaciones suceden muy rápidamente y que la hiperinsulinemia es una respuesta compensatoria contra la resistencia a la insulina, con la idea de mantener una correcta homeostasis glucídica para activar la función cerebral. Por lo tanto, estos 2 fenómenos podrían ser catalogados más como una respuesta adaptativa que como meros defectos, y ambos van asociados en mayor o menor medida con la progresión definitiva hacia la diabetes tipo 2. En este sentido, diferentes trabajos experimentales sugieren que la resistencia o “ceguera” de los tejidos diana a la insulina no es capaz de causar diabetes si no va acompañada de un fallo en el funcionamiento de la célula  $\beta$  pancreática<sup>8</sup>. Así por ejemplo, la ablación del receptor muscular a la insulina causó, como era de esperar, una falta de efecto de la hormona en dicho tejido en animales transgénicos, que curiosamente desarrollaron una diabetes muy débil<sup>9</sup>.

Por lo tanto, la clave de la historia parece ser el mantenimiento de la normoglucemia a toda costa por parte del organismo. Sin embargo, si el aporte energético a través de la dieta es excesivo, el organismo opera a través de varios mecanismos compensatorios como la hiperinsulinemia, la hiperlipidemia, la resistencia a la insulina y la propia obesidad<sup>10</sup>. En un modelo muy simplificado, el exceso en la ingesta energética (lípidos e hidratos de carbono) en individuos genéticamente susceptibles causaría hiperinsulinemia en asociación con un incremento en la secreción de lipoproteínas hepáticas, crecimiento del tejido adiposo y elevación de los ácidos grasos circulantes. Éstos, junto a episodios de hiperglucemia postprandial, podrían causar resistencia a la insulina en hígado y músculo, y como consecuencia gluconeogénesis hepática<sup>11</sup>.

Por otro lado, el exceso en nutrientes circulantes también afectaría al funcionamiento de la misma célula  $\beta$  pancreática alterando sus rutas de transducción y su patrón de expresión génica. Todo ello desembocaría a largo plazo en la disfunción de este tipo celular manifestada en una

sulinemia occurs as a consequence of insulin resistance<sup>4,5</sup>, whereas others consider that hyperinsulinemia is the cause of insulin resistance<sup>6,7</sup>. At present, no study has established which phenomenon occurs first during the development of the disease.

This should be due to the fact that both situations occur quickly and hyperinsulinemia is a compensatory response against insulin resistance, in order to maintain a correct glucose homeostasis to activate brain function. Therefore, these 2 phenomena could be described as an adaptation response instead of a dysfunction, and both are associated in variable extension to the final progression of type 2 diabetes. In this context, several experimental reports suggest that insulin resistance, or “blindness” of target tissues for the hormone, is not capable of causing diabetes without failure in  $\beta$ -cell<sup>8</sup>. For instance, the disruption of muscle insulin receptor in transgenic mice produced absence of hormone effect in this tissue, although the animals developed a mild diabetes<sup>9</sup>.

Therefore, the key event seems to be the tight maintenance of normoglycemia in the organism. However, if the diet energy intake is in excess, the organism switch up different compensatory mechanisms such as hyperinsulinemia, hyperlipidemia, insulin resistance and even obesity<sup>10</sup>. In a simplified model, the excess in energy intake (lipids and carbohydrates) in genetically predisposed individuals could cause hyperinsulinemia in association to an increase in hepatic lipoprotein secretion, adipose tissue hyperplasia and rising levels of circulating fatty acids. Altogether, and in association with postprandial hyperglycemia, this situation could favour hepatic and muscular insulin resistance and subsequent hepatic glyconeogenesis<sup>11</sup>.

On the other hand, the excess of circulating nutrients would also affect pancreatic  $\beta$ -cell function, affecting transduction pathways and the pattern of gene expression. Altogether, this would lead to longterm effects characterised by impaired insulin secretion and loss of endocrine pancreatic tissue mediated by apoptotic mechanisms<sup>11-23</sup>. It is in these circumstances, where insulin resistance in target tissues and  $\beta$ -cell failure appear, when diabetes occurs. In other words,  $\beta$ -cell fails to adapt to the new situation that represents obesity and this poor adaptation could be due to a certain genetic susceptibility<sup>2,8,24</sup>.

secreción defectuosa de insulina y una descompensación del tejido endocrino pancreático mediada por mecanismos apoptóticos<sup>11-23</sup>. En estas circunstancias, en la que aparecen conjuntamente la resistencia a la insulina en los tejidos diana y el fallo en el funcionamiento de la célula  $\beta$  pancreática, es cuando se declara la diabetes. En otras palabras, la célula  $\beta$  pierde su capacidad para adaptarse a la nueva situación que representa la obesidad y esta mala adaptación podría tener un cierto origen genético<sup>2, 8, 24</sup>.

La idea de esta revisión es mostrar las evidencias experimentales recogidas por diversos grupos de investigación que muestran cómo el exceso de nutrientes calorinérgicos (glucosa y ácidos grasos) producen la citada disfunción a nivel de la célula  $\beta$  pancreática. La revisión se aglutina en torno a una idea central conocida como “hipótesis de la toxicidad a los nutrientes” de la que derivan la “glucotoxicidad”, para el caso de la glucosa, y la “lipotoxicidad”, para los ácidos grasos<sup>24</sup>. El desarrollo de ambas líneas de pensamiento ha implicado el descubrimiento de una nueva función en los nutrientes estudiados: vehículo de información y por tanto su capacidad para modular determinados programas genéticos. Por lo tanto, tal y como se verá más adelante, la hipótesis de la toxicidad a los nutrientes cobra sentido en la medida en que la glucosa y los ácidos grasos son capaces, además de regular el metabolismo de la célula  $\beta$ , de modificar la expresión de determinados genes. Finalmente, otro aspecto clave es que muy posiblemente ambas entidades, gluco- y lipo-toxicidad, sean una misma cosa o al menos estén íntimamente relacionadas, lo que sugiere una redefinición de la terminología, acuñando así un nuevo concepto integrador: “glucolipotoxicidad”<sup>25</sup>.

### ¿CÓMO SE ADAPTA LA CÉLULA $\beta$ PANCREÁTICA A LA HIPERGLUCEMIA?

La célula  $\beta$  no sólo funciona como una bomba de insulina, sino que posee un sofisticado sistema sensor que adapta la cantidad de hormona secretada a la demanda glucídica de una forma dependiente de la dosis del azúcar (Figura 1). Aunque la glucosa es el nutriente esencial desencadenante de dicha respuesta, otros nutrientes, como los ácidos grasos y ciertos aminoácidos

The main goal of this review is to present the experimental evidences from different research laboratories that have noticed how the excess of calorinergic nutrients (glucose and fatty acids) produced  $\beta$ -cell dysfunction. This review is focused in a central idea known as “nutrient toxicity hypothesis” from which the terms “glucotoxicity” in the case of glucose, and “lipotoxicity” for fatty acids derive<sup>24</sup>. The development of this research has implicated the discovery of a new function for nutrients: vehicle of information and therefore the capacity to modulate specific gene programs. Therefore, in addition to the regulation of  $\beta$ -cell metabolism by nutrients, the gluco- lipo-toxicity hypothesis takes sense in the way that both glucose and fatty acids are also capable of modifying the expression of certain genes. Finally, a key aspect to note is that both gluco- and lipo-toxicity could be common entities or they are strongly related, suggesting a redefinition of this terminology, and considering a new integrating concept known as “glucolipotoxicity”<sup>25</sup>.

### HOW $\beta$ -CELL ADAPTS TO HYPERGLYCEMIA?

$\beta$ -Cell is not an insulin pump, but possesses a sophisticated sensor system that is capable to adapt the amount of secreted hormone to glycemia demand in a dose-dependent manner (Figure 1). Although glucose is the main nutrient in eliciting this secretory response, other nutrients, such as fatty acids and certain amino acids, are also capable of modulating glucose-induced secretion pattern<sup>26</sup>. In this context, glucose has a double face eliciting “good or evil” effects in  $\beta$ -cells. The specific effect depends on the exposure time of the  $\beta$ -cell to the elevated sugar concentrations. In other words, the situation can be considered as acute hyperglycemia (physiological situation) or chronic hyperglycemia (pathological situation). This last situation is typical of type 2 diabetes and obesity-associated pathologies.

#### a) *Glucose induced insulin secretion*

In normal conditions (acute glucose exposure), the postprandial sugar elevation is the key event in the induction of insulin secretion (Figura

también son capaces de regular respuestas secretoras dependientes de glucosa (26). La glucosa puede tener, en este sentido, una doble cara ejerciendo un efecto beneficioso o deletéreo sobre la célula  $\beta$ . Todo depende del tiempo en el que la célula  $\beta$  está expuesta a las altas concentraciones del azúcar, en otras palabras, si la célula está sometida a una hiperglucemia aguda (situación fisiológica) o crónica (situación patológica). Esta última situación es típica de la diabetes tipo-2 y de patologías relacionadas con la obesidad.

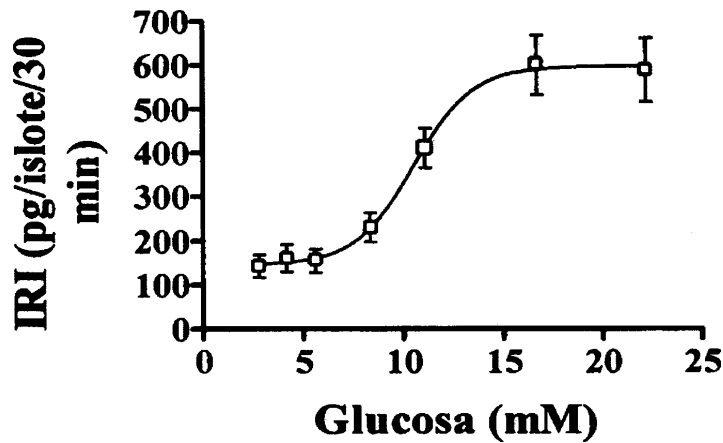
*a) La secreción de insulina inducida por glucosa*

En situaciones normales (exposición aguda a la glucosa), la subida postprandial del azúcar es el elemento esencial inductor de la secreción de insulina (Figura 2). Para ello, la glucosa entra en la célula  $\beta$  a través del transportador de glucosa GLUT1 (humanos) o GLUT2 (roedores) equilibrando la concentración de glucosa extracelular con la del interior de la célula<sup>27</sup>. Rápidamente la glucosa es metabolizada por la enzima glucocinasa (GK), entrando en la ruta glucolítica<sup>28</sup>. Este aumento de la actividad glucolítica desemboca en un incremento en el flujo metabólico a nivel del ciclo de Krebs con la elevación consiguiente en los niveles de ATP, equivalentes reducidos (NAD(P)H) e hiperpolarización de la membrana mitocondrial<sup>29</sup>. El incremento del ATP citosólico produciría el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ), despolarización por consiguiente de la membrana plasmática y la apertura de los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje<sup>30</sup>. La entrada y, por consiguiente, la elevación del calcio en el interior de la célula, activaría proteínas de la maquinaria de secreción desencadenando la liberación de insulina<sup>31</sup>. Esto correspondería a la fase de secreción dependiente de calcio y que coincidiría con el primer pico de liberación de insulina que se observa en experimentos de perfusión (Figura 3). Parece ser que la insulina que se secretaría en esta fase calcio-dependiente estaría completamente procesada y empaquetada en vesículas listas para fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido hormonal. En este sentido el calcio interactuaría con proteínas diana del aparato exocitótico que contendrían dominios de interacción con este ion<sup>32, 33</sup>.

re 2). To this end, glucose has to enter in the  $\beta$ -cell through the glucose transporter GLUT1 (humans) or GLUT2 (rodents), equilibrating extracellular glucose concentration with the intracellular milieu. Glucose is quickly metabolized by glucokinase (GK), entering in the glycolytic pathway<sup>28</sup>. This augmented glycolytic activity leads to an increase in the metabolic flux of the Krebs cycle, elevating ATP levels and reducing equivalents (NAD(P)H), as well as mitochondrial membrane hyperpolarization<sup>29</sup>. The rise in cytosolic ATP should produce the closure of the ATP-dependent potassium channels ( $K_{ATP}$ ), subsequent plasma membrane depolarization and the opening of voltage-dependent L-type calcium channels. The entry and increase of intracellular calcium would activate proteins involved in the secretory machinery inducing insulin release<sup>31</sup>. These events would correspond to the Ca-dependent secretory phase, which would be coincident with the first peak of insulin release observed in perfusion assays (Figure 3). It seems that the insulin secreted in this first phase would correspond to the hormone packaged in "ready-to-fuse" vesicles with the plasma membrane quickly releasing insulin outside the cell. In this context, calcium should interact with target proteins from the exocytotic complex containing binding motifs to this ion<sup>32, 33</sup>.

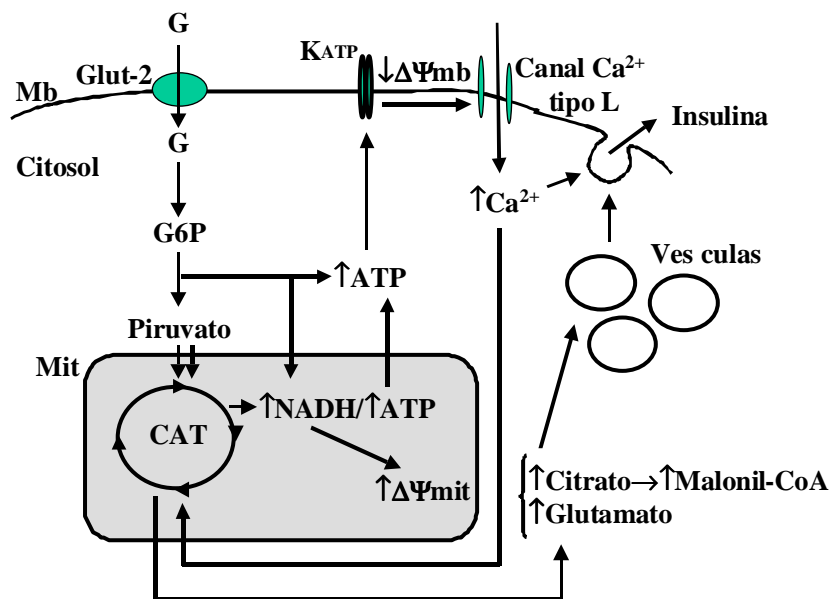
**FIGURA 1.- Curva de secreción de insulina en función de la concentración de glucosa.** La secreción de insulina en islotes aislados de ratón sigue un patrón dosis dependiente de la concentración de glucosa (6-16 mM) en incubaciones de 30 min. Abreviaturas utilizadas: IRI, Insulina Radio-Immunoensayo.

**FIGURE 1.- Glucose-dependent insulin secretion curve.** Insulin secretion in mouse isolated islets displays a dose-dependent pattern of glucose concentration (6-16 mM) in a 30 min incubation time. Abbreviations: IRI, Insulin Radio-Immunoassay.



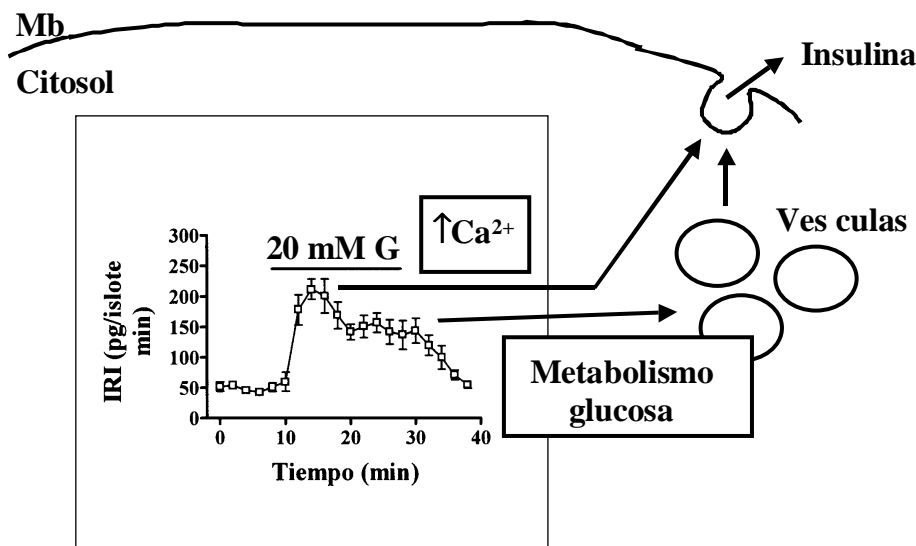
**FIGURA 2.- Proceso de inducción de la secreción de insulina por glucosa en la célula  $\beta$ .** La glucosa (G) entra en la célula a través del transportador de membrana Glut-2. El piruvato producido se incorpora al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Tricarboxylic acid cycle) en la mitocondria (Mit), produciendo incrementos en los equivalentes reducidos (NADH), ATP y el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_{mit}$ ). El aumento en ATP produce el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ), despolarización de la membrana plasmática ( $\Delta\Psi_{mb}$ ), provocando la apertura de los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje. El aumento de calcio intracelular favorece la exocitosis, activa a las deshidrogenasas del CAT induciendo la salida por cataplerosis de diversos factores de acoplamiento: glutamato y citrato (precursor de malonil-CoA) Abreviaturas utilizadas: G6P, Glucosa-6-Fosfato; Mb, Membrana plasmática.

**FIGURE 2.- Process of induction of insulin secretion by glucose in the  $\beta$ -cell.** Glucose (G) enters in the cell through the membrane glucose transporter Glut-2. Pyruvate produced enters in mitochondria (Mit) through the tricarboxylic acid cycle (TAC), producing increases in reduced equivalents (NADH), ATP and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_{mit}$ ). ATP increase produces the closure of the ATP-dependent potassium channels ( $K_{ATP}$ ), plasma membrane depolarization ( $\Delta\Psi_{mb}$ ), leading to the opening of the voltage-dependent L-type calcium channels. Intracellular calcium increase favours the exocytosis, activates mitochondrial dehydrogenases from tricarboxylic acid cycle, inducing the cataplerosis of different coupling factors: glutamate and citrate (precursor of malonyl-CoA). Abbreviations: G6P, Glucose-6-Phosphate; Mb, plasma membrane.



**FIGURA 3.- Cinética bifásica de secreción de insulina por parte de la célula  $\beta$ .** La elevación de la concentración de glucosa a 20 mM (20 mM G) genera un primer pico de liberación de insulina dependiente de calcio y correspondiente a la insulina empaquetada en vesículas a punto de fusionarse con la membrana plasmática (Mb). Posteriormente aparece una fase meseta que persiste mientras esté presente la glucosa y que depende del metabolismo, correspondiendo a la secreción de vesículas en fase de migración. Abreviaturas utilizadas: IRI, Insulina Radio-Immunoensayo.

**FIGURE 3.- Insulin secretion biphasic kinetics displayed by the  $\beta$ -cell.** The rise of glucose concentration to 20 mM (20 mM G) produces a first peak of insulin release, which is calcium-dependent and corresponding to packaged insulin in "ready-to-fuse" vesicles with the plasma membrane (Mb). A plateau phase appears subsequently, persisting while glucose is present, which depends on metabolism and corresponds to the secretion due to migrating vesicles. Abbreviations: IRI, Insulin Radio-Immunoassay.



Sin embargo, el secuestro del calcio extracelular mediante agentes quelantes no inhibe el proceso secretor en su totalidad como cabría esperar. Desaparece el primer pico de exocitosis, pero se mantiene la fase meseta que aparece a continuación. Dicha fase correspondería a la secreción dependiente de glucosa (Figura 3). Aunque es difícil disociar ambos eventos, ya que van íntimamente relacionados, lo que revelan los resultados experimentales es que esta segunda fase es menos dependiente de calcio y más de glucosa (Figura 2). Aun con todo el calcio sigue siendo importante en este periodo, ya que su entrada en la mitocondria activaría determinadas deshidrogenasas del ciclo de los ácidos tricarbónicos. Sin embargo, del punto clave en esta fase dependiente de glucosa es la salida de determinados metabolitos del ciclo de Krebs (cataplerosis) tales como citrato o glutamato. La liberación de citrato de la mitocondria provocaría su incorporación en la ruta lipogénica que daría como resultado malonil-CoA, el metabolito precursor de la síntesis de ácidos grasos<sup>34, 35</sup>. En este sentido, la célula  $\beta$  posee altos niveles de acetil-

However, the addition of extracellular calcium-chelating agents does not completely abolish the secretion process. The first peak of exocytosis disappears, but the subsequent plateau phase is still present. This phase corresponds to the glucose-dependent insulin secretion (Figure 3). Although both events are difficult to dissociate, because they are tightly linked, these experimental observations strongly suggest that the second phase is less calcium dependent and more glucose dependent (Figure 2). In any case, calcium is also instrumental during this second round, because its entry in the mitochondria would activate certain dehydrogenases of the Krebs cycle. However, the key event in this glucose-dependent phase is the exit by cataplerosis of specific metabolites, such as citrate or glutamate, from this metabolic cycle. The release of citrate from mitochondria would allow its incorporation to the lipogenic pathway producing malonyl-CoA, the precursor metabolite for fatty acid synthesis<sup>34, 35</sup>. In this respect,  $\beta$ -cells possess high levels of acetyl-CoA carboxylase (ACC), the enzyme responsible for malonyl-CoA biosynthesis. On the other

CoA carboxilasa (ACC), la enzima que sintetiza el malonil-CoA. Por el contrario, los niveles de la ácido graso sintetasa (FAS), la siguiente enzima de la ruta lipogénica, son muy bajos. Este balance enzimático tiene importantes implicaciones metabólicas. La primera es que la célula ? no es una célula lipogénica, es decir, su misión no es acumular grasa, para ello ya está el adipocito. En segundo lugar el malonil-CoA sintetizado tendrá más bien un papel señalizador, que de precursor sintético, inhibiendo la carnitín-palmitoil transferasa I (CPT-I) mitocondrial, la enzima clave en el proceso lipolítico de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Parte del malonil-CoA podría derivar hacia la síntesis de determinados lípidos complejos, que no serían degradados debido a la inactivación de la CPT-I por parte del malonil-CoA. Estos ácidos grasos y lípidos complejos sintetizados a partir de la glucosa podrían tener a su vez un efecto modulador en la secreción de insulina a través de diversos mecanismos que se analizarán a continuación. También se ha observado que la salida del glutamato del ciclo de Krebs podría jugar un papel en el proceso secretor a través de un mecanismo posiblemente análogo al que aparece durante la neurotransmisión<sup>36</sup>. De todas formas, esta es una función hipotética que queda pendiente por explorar<sup>37</sup>.

#### b) Glucotoxicidad

Lo anteriormente expuesto podría ser catalogado como el “lado bueno” de la glucosa, pero este nutriente tiene también su “cara mala” en el desarrollo de la enfermedad diabética. En este sentido, en los casos de hiperglucemia crónica, la historia se complica y la glucosa es capaz de modificar directa e indirectamente diversos programas génicos que desembocarían en la producción de profundos cambios fenotípicos. Así se ha observado en diversos modelos experimentales animales y de células cultivadas, que la alta concentración de glucosa modifica los niveles de expresión del gen codificador del transportador de glucosa GLUT2, activa la primera enzima de la vía glucolítica, la ya mencionada GK, y causa una inducción coordinada de genes que codifican enzimas de la glucólisis, anaplerosis y lipogénesis<sup>12-14, 16, 38</sup>. Todos estos efectos vienen acompañados con una activación temprana de genes implicados en la regulación del ci-

hand, the levels of the following enzyme in the lipogenic pathway, fatty acid synthase (FAS), are very low. This enzymatic unbalance has important metabolic implications. First of all,  $\beta$ -cell is not a lipogenic tissue, its mission is not to store fat, typical of adipose tissue. Secondly, produced malonyl-CoA should act as a signalling molecule instead of a biosynthetic precursor, inhibiting mitochondrial carnitín-palmitoyl transferase I (CPT-I), the key enzyme in lipolytic fatty acid  $\beta$ -oxidation. Part of malonyl-CoA could derive to the synthesis of some complex lipids, which are not degraded due to the inhibition of CPT-I by malonyl-CoA. These fatty acids and complex lipids synthesised from glucose could modulate insulin secretion through different mechanisms that will be analysed later. Glutamate exit from the Krebs cycle could play an important role in the secretory process through a similar mechanism observed during neurosecretion<sup>36</sup>. Nevertheless, this mechanism needs to be further investigated<sup>37</sup>.

#### b) Glucotoxicity

Aside from the “good face” of glucose, the sugar has also an “evil” face contributing to the development of diabetes. Under conditions of chronic hyperglycemia, glucose is capable of modulating direct and indirectly different gene programs, producing key phenotypic changes. In this respect, it has been observed that persistent high glucose concentrations modify the expression levels of the gene that encodes the glucose transporter GLUT2, as well as activating the first enzyme of the glycolytic pathway (GK) and causing a coordinated induction of genes coding for glycolytic, anaplerotic and lipogenic enzymes<sup>12-14, 16, 38</sup>. All these effects are accompanied by an early activation of some genes involved in cell cycle regulation such as *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *zif-268* and *nur-77* (Figure 4)<sup>15</sup>. Dedifferentiation programs can be activated under these conditions in  $\beta$ -cells, expressing proteins typical from early stages of development, such as hexokinase I and lactate dehydrogenase A, enzymes which are barely detected in mature  $\beta$ -cells. (Figure 5)<sup>39</sup>.

All these changes occur with additional metabolic and functional changes, such as impaired insulin secretion response, glycogen deposition (Figure 6), augmented glycolytic, anaplerotic and

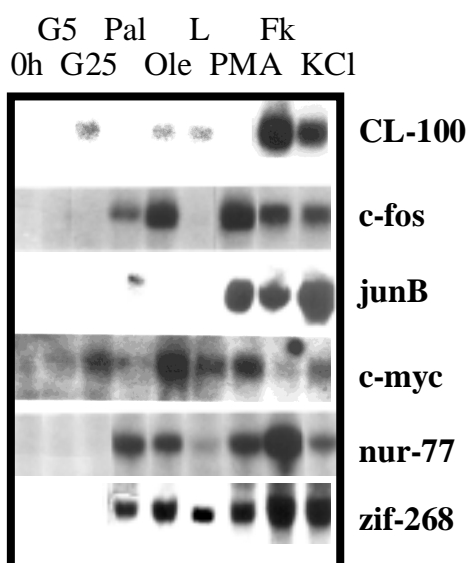
clo celular como *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *zif-268* o *nur-77* (Figura 4)<sup>15</sup>. En estos casos se observa una desdiferenciación de la propia célula  $\beta$ , que comienza a expresar proteínas típicas de estadios primitivos en el desarrollo, como son la hexokinasa I o la lactato deshidrogenasa-A, enzimas que raramente aparecen en la célula  $\beta$  madura (Figura 5)<sup>39</sup>.

Todos estos cambios vienen acompañados de otros cambios metabólicos y funcionales, como es una curva de secreción de insulina alterada, deposición de glucógeno (Figura 6), flujo glucolítico aumentado, al igual que los procesos anapleróticos y lipogénicos, con una marcada producción de triglicéridos (Figura 6) y lípidos complejos (Figura 5). En su conjunto, estas profundas alteraciones han dado pie a la hipótesis de la glucotoxicidad, postulando efectos nocivos a nivel de la célula  $\beta$  pancreática a altas concentraciones de glucosa.

lipogenic fluxes, with a marked deposition of triglycerides (Figure 6) and complex lipids (Figure 5). These key changes have established the base for the development of the glucotoxicity hypothesis, postulating  $\beta$ -cell dysfunction at high extracellular glucose concentrations.

**FIGURA 4.- Niveles de expresión de diversos genes tempranos en células  $\beta$ (INS) incubadas en presencia de diferentes estímulos.** Células INS-1 fueron cultivadas durante 1h en presencia o ausencia (0h) de diferentes estímulos: 5 mM glucosa (G5), 25 mM glucosa (G25), 0.5 mM palmitato (Pal), 0.5 mM oleato (Ole), 0.5 mM linoleato (L), 2  $\mu$ M del éster de forbol activador de determinadas isoformas de la proteína quinasa C (PMA), 4  $\mu$ M del alcaloide forskolina activador de la ruta del cAMP (Fk) y 30 mM KCl utilizado como despolarizador, favoreciendo la entrada de calcio a la célula. Tras la incubación el ARN fue extraído y analizado por hibridación (Northern blot) con sondas específicas para diferentes genes tempranos: CL-100, codifica una tirosina-fosfatasa inducible en situaciones de estrés, y *c-fos*, *junB*, *c-myc*, *nur-77* y *zif-268*, codifican diversos factores de transcripción claves en la progresión del ciclo celular.

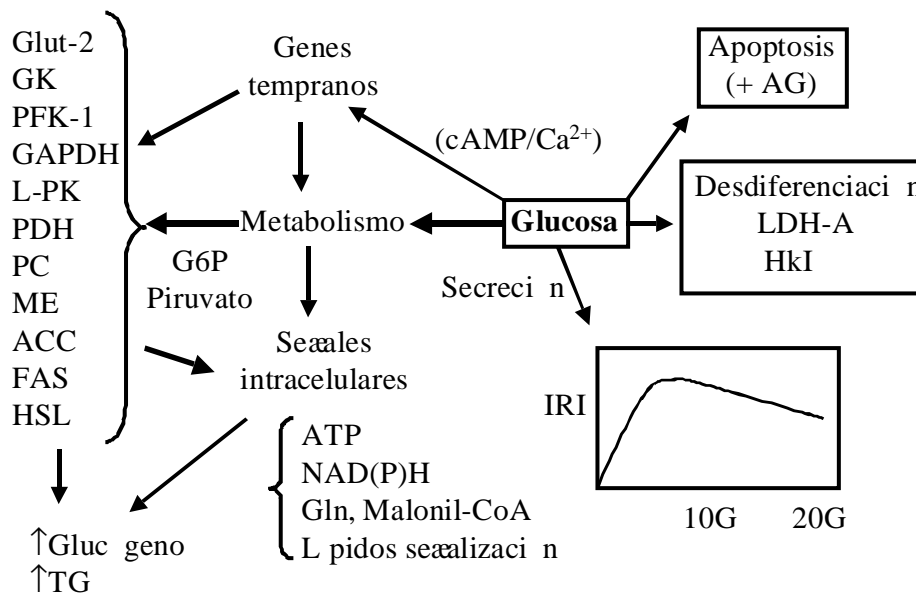
**FIGURE 4.- Expression levels of different early genes in  $\beta$ (INS-1)-cells incubated in the presence of different stimuli.** INS-1 cells were incubated during 1h in the presence or in the absence (0h) of different stimuli: 5 mM glucose (G5), 25 mM glucose (G25), 0.5 mM palmitate (Pal), 0.5 mM oleate (Ole), 0.5 mM linoleate (L), 2  $\mu$ M of the phorbol ester that induces the activity of certain isoforms of protein kinase C (PMA), 4  $\mu$ M of the alkaloid forskolin that activates the cAMP pathway (Fk) and 30 mM KCl used to depolarize the plasma membrane, allowing the entry of extracellular calcium in the cell. ARN was isolated and analysed by hybridization (Northern blot) with different probes specific for the corresponding immediate early genes: CL-100, codifies a tyrosine phosphatase induced in stress situations, and *c-fos*, *jun-B*, *c-myc*, *nur-77* and *zif-268* codify different transcription factors that play a key role in cell-cycle progression.





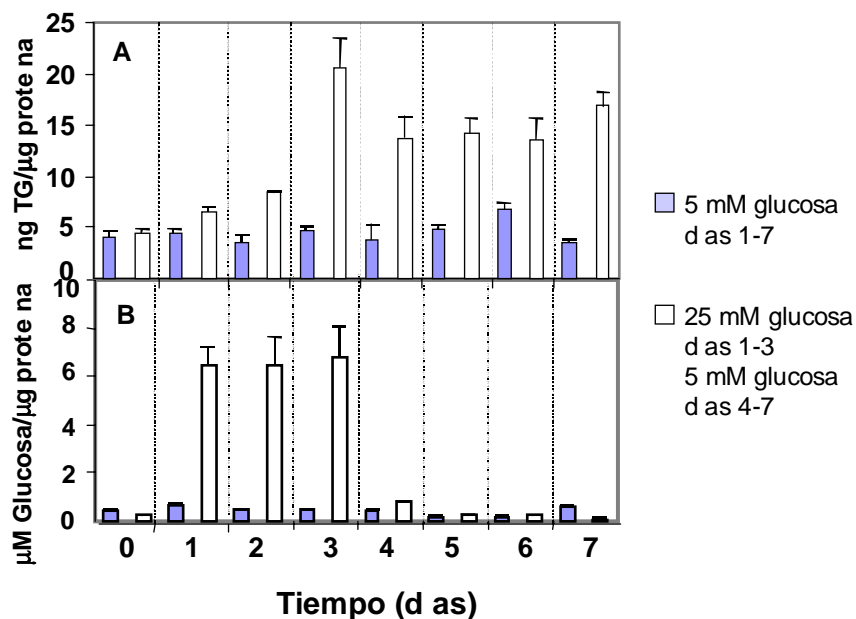
**FIGURA 5.- Esquema representativo de la glucotoxicidad en la célula  $\beta$  pancreática.** En una primera instancia podría observarse una respuesta adaptativa a través de la inducción de determinados genes tempranos o del propio metabolismo, participando el cAMP o el  $Ca^{2+}$ . Tanto los genes tempranos, como algunos factores metabólicos (Glucosa-6-Fosfato (G6P), piruvato, etc) modularían la expresión y la actividad de diversos genes y enzimas, como: el transportador de glucosa Glut-2, glucokinasa (GK), fosfofructokinasa-1 (PFK-1), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), L-piruvato kinasa (L-PK), piruvato deshidrogenasa (PDH), piruvato carboxilasa (PC), enzima málico (ME), acetil-CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintetasa (FAS), lipasa sensible a hormonas (HSL). Esta activación metabólica va a producir por un lado un incremento en los depósitos de energéticos de la célula, como son glucógeno y triglicéridos (TG), y por otro lado, un aumento en intermediarios metabólicos como ATP, equivalentes reducidos (NAD(P)H), glutamina (Gln), malonil-CoA y lípidos de señalización. El patrón de secreción detectado por radioinmunoensayo (IRI) presenta una alta secreción de insulina por debajo de 10 mM glucosa (10G) y una falta de inducción de la secreción entre 10 y 20 mM (20G), resultando en una pérdida de la sensibilidad a la glucosa. Si la hiperglucemia persiste, pueden aparecer procesos de dediferenciación con la aparición de nuevas proteínas metabólicas: lactato deshidrogenasa-A (LDH-A) y hexokinasa-I (Hk-I). También pueden darse procesos apoptóticos, incrementados si hay ácidos grasos (AG).

**FIGURE 5.- Model illustrating the process of glucotoxicity in pancreatic  $\beta$ -cell.** First of all, an adaptative response is observed in the induction of immediate early genes and changes in metabolism with participation of cAMP and  $Ca^{2+}$ . Immediate early genes as well as metabolic intermediates (Glucose-6-Phosphate (G6P), pyruvate, etc) could modulate expression and activity of different genes and enzymes, such as glucose transporter Glut-2, glucokinase (GK), phosphofructokinase-1 (PFK-1), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), L-pyruvate kinase (L-PK), pyruvate dehydrogenase (PDH), pyruvate carboxylase (PC), malic enzyme (ME), acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), hormone sensitive lipase (HSL). This metabolic activation produces an increase in intracellular energy storage compounds such as glycogen and triglycerides (TG). On the other hand, an increase in certain metabolic intermediates is observed, such as ATP, reduced equivalents (NAD(P)H), glutamine (Gln), malonyl-CoA and signaling lipids. The insulin secretion process monitored by radioimmunoassay (IRI) displays elevated insulin release below 10 mM glucose (10G), and loss of induction of insulin secretion between 10 and 20 mM (20G), resulting in a loss of glucose sensitivity. Dedifferentiation processes could appear if hyperglycemia persists, accompanied by the presence of new metabolic proteins: lactate dehydrogenase-A (LDH-A) and hexokinase-I (Hk-I). Apoptosis would appear, mainly in the presence of extracellular fatty acids (FA).



**FIGURA 6.- Proceso de síntesis y degradación de triglicéridos (A) y glucógeno (B) en células  $\beta$ (INS-1) expuestas a diferentes concentraciones de nutrientes.** Células  $\beta$ (INS-1) fueron incubadas durante 7 días en las siguientes condiciones: 5 mM glucosa durante 7 días (barras grises) o a 25 mM glucosa durante 3 días y a 5 mM glucosa durante 4 días (barras blancas). Distintas muestras fueron extraídas cada día para determinar la concentración intracelular de triglicéridos (TG) o de glucógeno (expresado en  $\mu$ M glucosa). Se observa que cuando las células son expuestas a una condición de hiperglucemia crónica (3 días a 25 mM glucosa) se produce una acumulación de glucógeno y triglicéridos. La vuelta a condiciones normoglucémicas (5 mM glucosa) supuso la pérdida inmediata de los depósitos de glucógeno, pero no así de los triglicéridos.

**FIGURE 6.- Synthesis and degradation of triglycerides (A) and glycogen (B) in  $\beta$ (INS-1)-cells exposed to different concentrations of nutrients.**  $\beta$ (INS-1)-cells were incubated for 7 days in the following conditions: 5 mM glucose for 7 days (grey bars) or 25 mM glucose for 3 days and 5 mM glucose for 4 days (white bars). Different samples were obtained each day to determine intracellular triglyceride (TG) and glycogen (expressed in  $\mu$ M glucose) concentrations. Triglyceride and glycogen deposition are observed in cells exposed to sustained hyperglycemia (25 mM glucose for 3 days). The restoration of normoglycemia (5 mM glucose) was accompanied by the quick disparition of glycogen storage, but not for triglycerides.



### ¿CÓMO SE ADAPTA LA CÉLULA $\beta$ A LAS CONCENTRACIONES ELEVADAS DE LÍPIDOS?

Los lípidos son el otro componente nutricional determinante en la regulación de la función de la célula  $\beta$  pancreática. Al igual que la glucosa presentan 2 caras, una buena y otra mala, en función del tipo de exposición al que la célula se vea sometida. La exposición aguda de la célula  $\beta$  a altas concentraciones de ácidos grasos potencia el proceso de secreción inducido por glucosa, sugiriendo que estos nutrientes tendrían un efecto como factores de acoplamiento transduccional. Este efecto podría ser posiblemente vía activación de determinadas isoformas de la proteína kinasa C (PKC)<sup>40, 41</sup>, mediante la regulación de canales de calcio necesarios para inducir el proceso secretor<sup>42</sup>, o mediante la acilación

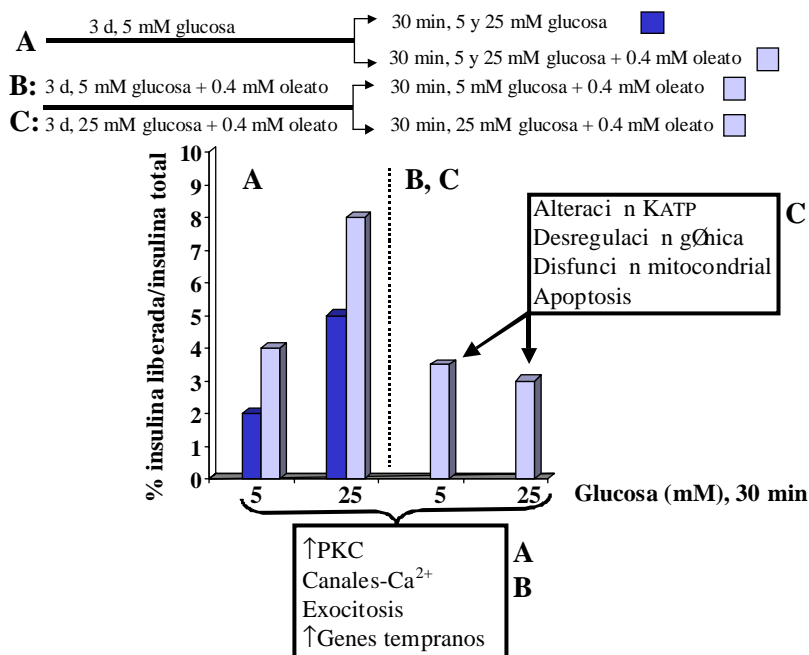
### HOW DO $\beta$ -CELLS ADAPT TO HIGH LIPID CONCENTRATIONS?

Lipids represent the other nutritional component instrumental in the regulation of pancreatic  $\beta$ -cell function. As in the case of glucose, they also present two faces, "evil or good", depending also of the exposure time to the cell. Acute exposure of  $\beta$ -cells to high concentrations of fatty acids potentiates the secretion process induced by glucose, suggesting a key role of these nutrients as coupling factors. This effect could be through the activation of specific isoforms of protein-kinase C (PKC)<sup>40, 41</sup>, regulating calcium channels instrumental in the induction of the exocytotic process, or producing the acylation of proteins that participate in the secretory machinery<sup>43</sup> (Figure 7).

de determinadas proteínas que participan en el proceso exocitótico<sup>43</sup> (Figura 7).

**FIGURA 7.- Papel ejercido por los ácidos grasos en el proceso secretor y en la lipotoxicidad de la célula  $\beta$  pancreática.** Una exposición aguda (A) de la célula  $\beta$  a altas concentraciones de ácidos grasos produce una potenciación de la liberación de insulina. Esta potenciación puede ser debida a un efecto modulador de los ácidos grasos sobre determinadas isoformas de la proteína quinasa C (PKC), la regulación de la entrada de calcio a través de diversos canales, interacciones con proteínas de la maquinaria exocitótica o la activación de genes tempranos. La exposición crónica (B) a altas concentraciones de ácidos grasos produce un aumento en la secreción basal a bajas concentraciones de glucosa (5 mM) y una disminución de la secreción inducida por glucosa. En estas condiciones (B) actuarían mecanismos similares a los descritos en (A). Una exposición crónica simultánea a altas concentraciones de glucosa (25 mM) y de ácidos grasos (0.4 mM oleato) (C) produciría un patrón de secreción muy similar al descrito en (B). Los mecanismos que podrían actuar podrían estar relacionados con alteraciones a nivel de los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ), alteración en la función mitocondrial, desregulación génica y aparición de apoptosis.

**FIGURE 7.- Role of fatty acids in the secretory process and lipotoxicity in pancreatic  $\beta$ -cell.** Acute exposure (A) of pancreatic  $\beta$ -cells to elevated concentrations of fatty acids produces a potentiation of insulin release. This process could be explained by a modulating effect of fatty acids in certain isoforms of protein kinase C (PKC), regulation of calcium entry through different channels, interaction with proteins of the exocytotic machinery or the activation of immediate early genes. Chronic exposure (B) of pancreatic  $\beta$ -cells to elevated concentrations of fatty acids produces an increase in basal secretion at non-stimulatory glucose concentrations (5 mM) and a decrease in glucose-stimulated insulin secretion. Similar mechanisms described in A may operate in B conditions. Chronic exposure simultaneously to both elevated concentrations of glucose (25 mM) and fatty acids (0.4 mM oleate) (C) may produce a secretion kinetics similar to the pattern described in (B). The operating intracellular mechanisms could be related to alterations at the level of ATP-dependent potassium channels ( $K_{ATP}$ ), mitochondrial dysfunction and impaired gene expression, leading to apoptosis.



Por el contrario, la exposición crónica de células  $\beta$  a altas concentraciones extracelulares de ácidos grasos produce también profundos cambios fenotípicos. Así, la célula pierde la sensibilidad a la glucosa mostrando un patrón de hipersecreción de insulina a bajas concentraciones del azúcar y una incapacidad de adaptar la respuesta secretora a incrementos en la glucemia<sup>44</sup>. La síntesis de insulina se ve severamente disminuida y se observa además una deposición exagerada de lípidos, cuya degradación se ve enlentecida incluso tras varios días en condiciones normogluicémicas (Figuras 6 y 7).

En este sentido, y al igual que ocurría con la glucosa, determinados ácidos grasos son importantes moduladores de la expresión génica en este tipo celular. Curiosamente, los ácidos grasos inducen la expresión de genes implicados en diversas rutas lipolíticas, como los que codifican la CPT-I (45), la acil-CoA oxidasa (ACO) peroxisomal<sup>46</sup> o la proteína desacopladora 2 (UCP-2) mitocondrial<sup>47</sup>. Al mismo tiempo, los ácidos grasos disminuyen la expresión del gen de la ACC, la enzima clave de la ruta lipogénica y que sintetiza malonil-CoA, el inhibidor fisiológico de la CPT-I<sup>22</sup>. Esta compleja remodelación metabólica podría jugar un papel clave en procesos de detoxificación a través de las rutas lipolíticas celulares. Al menos la inducción del gen de la CPT-I por ácidos grasos es una respuesta rápida, pudiéndose considerar a este gen como un gen temprano, entre otros (Figura 4), regulado por estos nutrientes<sup>45</sup>. Esta inducción rápida de la CPT-I puede permitir una rápida detoxificación, eliminando el exceso de ácidos grasos. Sin embargo, si el insulto persiste se producen cambios fenotípicos y metabólicos adicionales, que podrían degenerar en procesos de muerte celular programada o apoptosis.

¿Cómo puede explicarse esta secreción defectuosa de insulina por parte de la célula  $\beta$  en situaciones de exposición crónica a los ácidos grasos? La respuesta es por ahora una incógnita, ya que hay estudios realizados en líneas celulares que señalan que los ácidos grasos tienen una influencia mínima sobre el metabolismo de la glucosa. En otras palabras, un incremento en los procesos de oxidación de los ácidos grasos, junto con la modulación de los genes que codifican las enzimas de dichas rutas metabólicas, no viene acompañado de un reducido metabolismo de la glucosa. A nivel metabólico esto quiere decir

On the other hand, sustained exposure of  $\beta$ -cells to extracellular elevated concentrations of fatty acids also produces deep phenotypic changes. Under these conditions,  $\beta$ -cell loses glucose sensitivity showing a hypersecretion pattern of insulin at low sugar concentrations and reduced capacity to adapt the secretion response to increased glycemia<sup>44</sup>. Insulin biosynthesis decreases dramatically accompanied by exaggerated lipid deposition, which the degradation is delayed several days even after reaching normoglycemic conditions (Figures 6 and 7).

In this context, certain fatty acids as well as glucose, are key modulators of gene expression in this particular cell type. Interestingly, palmitate and oleate can induce the expression of genes coding for several enzymes involved in certain lipolytic pathways, such as CPT-I<sup>45</sup>, peroxisomal acyl-CoA oxidase (ACO)<sup>46</sup>, or mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP-2)<sup>47</sup>. At the same time, fatty acids decrease the expression of the ACC gene, the key enzyme in the lipogenic pathway responsible for malonyl-coA biosynthesis, the physiological inhibitor of CPT-I<sup>22</sup>. This complex metabolic remodeling could play a key role in detoxification processes through the activation of intracellular lipolytic pathways. Therefore, CPT-I gene induction by fatty acids displays a quick response, considering thus this gene as an early-response gene modulated by nutrients (Figure 4)<sup>45</sup>. This rapid induction of CPT-I can allow a rapid detoxification, eliminating the excess of fatty acids. However, additional phenotypic and metabolic changes appear if the insult persists, culminating in programmed cell death or apoptosis.

How does this impaired secretion of insulin in the presence of persistent exposure of fatty acids occurs in the  $\beta$ -cell? The response is still unknown, because certain studies in cell lines support the idea that fatty acids have a minor influence in glucose metabolism. In other words, an increase in fatty acid oxidation together with gene modulation of enzymes involved in these particular pathways, is not accompanied by a decreased glucose metabolism. At the metabolic level, this means that under these conditions (sustained exposure to fatty acids),  $\beta$ -cells do not display a typical Randle cycle, presenting similar intracellular contents of glucose-6-phosphate and citrate, compared to the control situation, and therefore no changes in glucose oxidation

que en estas circunstancias (exposición crónica a ácidos grasos) la célula  $\beta$  no exhibe un ciclo de Randle, presentando muy similares contenidos intracelulares de glucosa-6-fosfato y de citrato, comparados con la situación control y nulos cambios tanto en la oxidación del azúcar como en su utilización<sup>44</sup>. Sin embargo, otros trabajos apuntan alteraciones en diversas rutas metabólicas, postulando un incremento en el flujo glucolítico, a través de una activación de la fosfofructo-quinasa-1 (PFK-1) y un aumento en la utilización de glucosa en células  $\beta$  aisladas<sup>48</sup>. Todo ello indica que los mecanismos necesitan ser clarificados.

En cualquier caso, la falta de un criterio unificado al respecto, quizás sea debida a que el efecto de los ácidos grasos sea múltiple y variado, dependiendo del tipo de ácido graso, de la dosis, del tiempo de exposición, de la forma de preparar los ácidos grasos a nivel experimental, de la fase del ciclo celular, de la presencia de otros nutrientes (glucosa principalmente), etc. En este sentido, los modos de actuación difieren en función del tipo de secreción estudiada: secreción basal y secreción estimulada por glucosa. Así, todos los estudios confirman que la exposición crónica de células  $\beta$  a concentraciones elevadas de ácidos grasos produce una secreción basal aumentada, pero una disminución en la liberación estimulada por glucosa (Figura 7). En el caso de la secreción basal aumentada, los ácidos grasos podrían actuar de diversas formas, similares en su mayoría al modo de activación de la secreción de insulina en casos de exposiciones agudas: incremento en las concentraciones intracelulares de diferentes factores de acoplamiento metabólico como resultado de un incremento en la  $\beta$ -oxidación<sup>44</sup>, activación de ciertas isoformas de la PKC<sup>40, 41</sup> y acilación de proteínas clave de la maquinaria exocitótica<sup>43</sup> o mayor recambio lipídico en vesículas secretoras. Este último punto ha sido verificado en estudios realizados en presencia de cerulenina, inhibidor del mecanismo de acilación. Este compuesto inhibió el proceso secretor, tanto en líneas cultivadas como en células  $\beta$  aisladas<sup>43</sup>.

Con respecto a la inhibición de la secreción estimulada por glucosa, caben varias explicaciones. Una de ellas podría ser un funcionamiento alterado de los canales  $K_{ATP}$ , resultando en una disminución en los niveles intracelulares de ATP y la apertura permanente del canal sin posibilidad de entrada de calcio al interior celular. Así,

and utilization<sup>44</sup>. However, other reports indicate alterations in certain metabolic pathways, suggesting an increase in the glycolytic flux, involving phosphofructo-kinase-1 (PFK-1) activation and augmented glucose utilisation in isolated  $\beta$ -cells<sup>48</sup>. Altogether, these results indicate that the mechanism underlying this process needs additional clarification.

In any case, these apparently contradictory results could be due most likely to the variable and multiple effects of fatty acids in the  $\beta$ -cell, including the chemical nature of the fatty acid, dose and time of exposure, cell-cycle phase, presence of other nutrients (particularly glucose), etc. In addition, the action of fatty acids differs according to the phase of secretion studied: basal or glucose-stimulated. In this context, all studies confirm that sustained exposure of pancreatic  $\beta$ -cells to elevated concentrations of fatty acids induces an augmented basal secretion and decreases glucose-stimulated insulin release (Figure 7). In the increased basal secretion, fatty acids could act through different suggested mechanisms, similar to those operating in acute potentiation of glucose-induced insulin secretion: increased intracellular concentration levels of metabolic coupling factors as a result of  $\beta$ -oxidation<sup>44</sup>, activation of certain PKC isoforms<sup>40,41</sup>, acylation of key proteins of exocytotic machinery<sup>43</sup> or high lipid turnover in secretory vesicles. The last points have been verified in recent studies by incubating the cells in the presence of cerulenin, an inhibitor of protein acylation. This compound inhibited the secretion process in cultured lines as well as in isolated  $\beta$ -cells<sup>43</sup>.

With respect to inhibition of glucose-induced insulin secretion by fatty acids, several explanations could be proposed. One of these concerns to an impaired function of  $K_{ATP}$  channels, resulting in a decrease in ATP intracellular levels and permanently opening of the channel, inhibiting calcium entry in the cell. Indeed, preliminary evidences show that micromolar concentrations of acyl-CoAs produce the sustained opening of  $K_{ATP}$  channels, affecting the secretory process<sup>49, 50</sup>. The presence of low ATP levels could be explained by mitochondrial uncoupling, observed in  $\beta$ -cells as well as in INS cells chronically incubated with elevated concentrations of fatty acids. Alterations at the level of the mitochondrial membrane potential have been described

estudios preliminares muestran que los acil-CoA a nivel micromolar producen la apertura permanente de dichos canales  $K_{ATP}$ , alterando por consiguiente el proceso secretor<sup>49, 50</sup>. La presencia de niveles bajos de ATP podría ser explicada muy posiblemente por el desacoplamiento mitocondrial, que ha sido constatado en células  $\beta$  y en células INS incubadas crónicamente con altas concentraciones de ácidos grasos. En estas condiciones se han observado alteraciones a nivel del potencial de membrana mitocondrial, inducción de UCP-2, aumento en el consumo de oxígeno y, como ya se ha mencionado, supresión del incremento en ATP inducido por glucosa<sup>47</sup>. En este sentido UCP-2 podría formar junto a CPT-I y ACO una primera línea lipodetoxicadora. En este sistema defensivo, CPT-I y ACO se encargarían de degradar el exceso de lípidos a través de su metabolismo, con la intención de evitar su esterificación y la formación de depósitos tóxicos de triglicéridos. UCP-2 tendría una misión de disipar la fuerza protón motriz para disminuir la producción de ATP por parte de la mitocondria con la idea de adaptar la respuesta secretora a la glucemia circulante, manteniendo en la medida de lo posible la sensibilidad de la célula  $\beta$  al azúcar. Otra misión atribuida a UCP-2 en éste, y otros tipos celulares, sería disminuir la producción de radicales libres del oxígeno a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial para preservar lo máximo posible la integridad de este orgánulo.

Obviamente, si estas condiciones de hiperlipidemia crónica persisten, la célula no puede afrontarlas con una total garantía, ya que tanto CPT-I, como ACO y UCP-2 posiblemente no sean sistemas detoxificadores “profesionales” o los más adecuados para esta función. En estas condiciones de incapacidad detoxificadora se puede favorecer la activación de programas de muerte celular programada o apoptosis. Los resultados generados al respecto indican que la vía mitocondrial es predominante frente a la producción de NO (por la óxido nítrico sintetasa inducible) y posiblemente frente a la ruta de síntesis de ceramida, que sólo sería relevante en presencia de palmitato, no en el caso de oleato, otro ácido graso que produce también efectos apoptóticos en determinadas circunstancias. La participación de la vía mitocondrial se evidencia por liberación desde este orgánulo de citocromo c y del factor inductor de apoptosis y aumento de señal

under these conditons, together with UCP-2 induction, increased consumption of oxygen and no glucose-induced increase in ATP<sup>47</sup>. In this context, UCP-2, as well as CPT-I and ACO, could form a first lipo-detoxifying defense line. In this system, CPT-I and ACO would be in charge of the degradation of excess lipids through the metabolism, avoiding esterification and toxic deposition of triglycerides. UCP-2 would dissipate the proton-force to decrease mitochondrial ATP production, in an attempt to adapt the secretory response to circulating glycemia, trying to maintain the sensibility of  $\beta$ -cell to the sugar. Another proposed role of UCP-2 documented in other cell types could be to reduce oxygen free radical production in the mitochondrial respiratory chain to preserve as much as possible the integrity of these organella.

Obviously,  $\beta$ -cells are not capable of facing persistent hyperlipidemic conditions, since CPT-I, as well as ACO and UCP-2 were not designed by nature as “professional” detoxifying systems. Under conditions in which lipid detoxification is not possible, cell death programs (apoptosis) could be activated. Experimental results indicate that the mitochondrial pathway is predominant, instead of NO production by inducible nitric oxide synthase, and also most likely the ceramide biosynthetic pathway, which could be relevant only in the presence of palmitate and not with oleate, another fatty acid capable of producing apoptosis under certain incubation conditions. Participation of the mitochondrial arm is evidenced by the release of cytochrome c and apoptosis-inducing factor, and the increase of pro-apoptotic signals such as Bax protein. Altogether, these released proteins induce the activation of cytosolic caspases, poly-ADP-ribose polymerase, leading to DNA laddering and chromating condensation. Finally, cell death and loss of  $\beta$ -cell number occur, resulting in a subsequent defect in insulin production and progressing to overt diabetes<sup>23</sup>.

#### GENERAL MECHANISM OF GLUCOLIPOTOXICITY

The different hypotheses explaining the molecular mechanisms involved in gluco- and lipotoxicity need additional experimental support. First of all, sustained hyperglycemia should not be very toxic for the  $\beta$ -cell, because this cell type

les pro-apoptóticas tipo Bax. Todo ello desemboca en la activación de caspasas citosólicas, de la poli-ADP-ribosa polimerasa, fragmentación de ADN y condensación de la cromatina. Todo el proceso da como resultado un aumento de la muerte celular y pérdida del número de células  $\beta$  con un obvio defecto en la producción de la hormona y aparición de la diabetes<sup>23</sup>.

### MECANISMO GENERAL DE LA GLUCOLIPOTOXICIDAD

Aunque se han apuntado varias hipótesis para explicar el modo de acción de la gluco- y la lipotoxicidad, los acontecimientos moleculares que ocurren durante ambos procesos no han sido caracterizados todavía en su totalidad. En principio, parece ser que la glucemia elevada no sería muy tóxica para la célula  $\beta$ , ya que este tipo celular es capaz de adaptarse mediante cambios en los niveles de expresión de genes clave en el metabolismo intermediario. Esto permitiría una elevada oxidación del azúcar y el flujo de intermediarios a través del ciclo de Krebs mediante reacciones de anaplerosis y cataplerosis. El resultado sería la producción de factores de acoplamiento que favorecerían la detoxificación de la glucosa y el desplazamiento de la curva de secreción hacia la izquierda, consiguiendo un aumento en la sensibilidad a la glucosa y modificando el umbral de secreción.

Por otro lado, elevadas concentraciones de ácidos grasos y en ausencia de hiperglucemia tampoco resultarían muy tóxicas, ya que la baja concentración extracelular de glucosa no permitiría un aumento en los niveles intracelulares de malonil-CoA, permitiendo la  $\beta$ -oxidación y resultando en una lipodetoxificación a través de CPT-I, ACO y UCP-2 posiblemente. Esta situación es la que se da en situación de ayuno prolongado, en la que la glucemia es baja, pero la concentración de lípidos circulantes es alta, lo que además es beneficioso para mantener un nivel basal de secreción de insulina.

Por lo tanto el mayor problema ocurrirá en una situación de pre-diabetes, en la que la resistencia a la insulina va acompañada de hiperglucemia y de elevadas concentraciones circulantes de ácidos grasos. Esta situación favorece los procesos de esterificación y aumento de los depósitos lipídicos en la célula  $\beta$ , una célula cuya

can adapt to changes at the level of key genes coding for metabolic enzymes. This would allow a high rate of sugar oxidation and the flux of metabolites from the Krebs cycle through anaplerotic and cataplerotic reactions. The result should be the production of coupling factors favouring the detoxification of glucose and the left-shift in the glucose-dependent insulin secretion allowing an increase in glucose sensitivity and modifying the secretion pattern.

On the other hand, elevated fatty acid concentrations should not be very toxic, because the low extracellular glucose concentration does not allow an increase in intracellular levels of malonyl-CoA, allowing  $\beta$ -oxidation and thus lipodetoxification, most likely through CPT-I, ACO and UCP-2 activities. This situation can be found in sustained starvation, where glycemia is very low, but circulating lipids are elevated, resulting beneficial to maintain a basal level of insulin secretion.

Therefore, the main problem will occur in a pre-diabetes situation, in which insulin resistance goes together with hyperglycemia and elevated concentrations of circulating fatty acids. This particular situation favours esterification processes and the increase of lipid deposition in the  $\beta$ -cell, a cell that has not been designed to store fat. Glycolytic pathway also participates in this process, providing glycerol-3-phosphate that could be used for triglyceride biosynthesis. In a first phase, hyperinsulinemia is expected due to an increase in hormone secretion from the excess of intracellular coupling lipids (diacylglycerols, phospholipids, etc) that could modulate certain isoforms of PKC<sup>40, 41</sup>. However, this compensatory stage cannot be maintained due to the excess of these coupling lipids (phosphatidic and lysophosphatidic acid, sphingolipids, ceramides, cyclo- and lipo-oxygenases, acyl-CoAs and acylcarnitines), some of them known as toxic agents<sup>51</sup>. Altogether, this situation would lead to an impaired insulin secretion and the activation of cell suicide programs by apoptotic mechanisms<sup>23</sup>.

In this complex process of metabolic dysfunction, malonyl-CoA and PPAR $\alpha$  (Peroxisomal Proliferating Activated Receptor- $\alpha$ ) could play an instrumental role. At elevated glucose concentrations, malonyl-CoA would accumulate in the cytosol inhibiting mitochondrial  $\beta$ -oxidation at the CPT-I level. Therefore, the remaining detoxification pathways should be in theory UCP-

misión no es almacenar grasa. En este proceso participa la ruta glucolítica proporcionando glicerol-3-fosfato que será utilizado para la síntesis de triglicéridos. En una primera instancia, se produciría una hiperinsulinemia causada por un aumento en la secreción de la hormona debido a un exceso de lípidos de señalización intracelular (diacilgliceroles, fosfolípidos, etc) que podrían modular la actividad determinadas formas de la PKC<sup>40, 41</sup>. Sin embargo esta etapa de compensación no puede ser mantenida debido a un exceso intracelular de intermediarios lipídicos (ácido fosfatídico y lisofosfatídico, esfingolípidos, ceramidas, ciclo- y lipo-oxigenasas, acil-CoAs y acil-carnitina), muchos de ellos ya reconocidos como tóxicos<sup>51</sup>. Como resultado de todo ello se produciría una secreción de insulina defectuosa y la activación de los programas de apoptosis o suicidio intracelulares<sup>23</sup>.

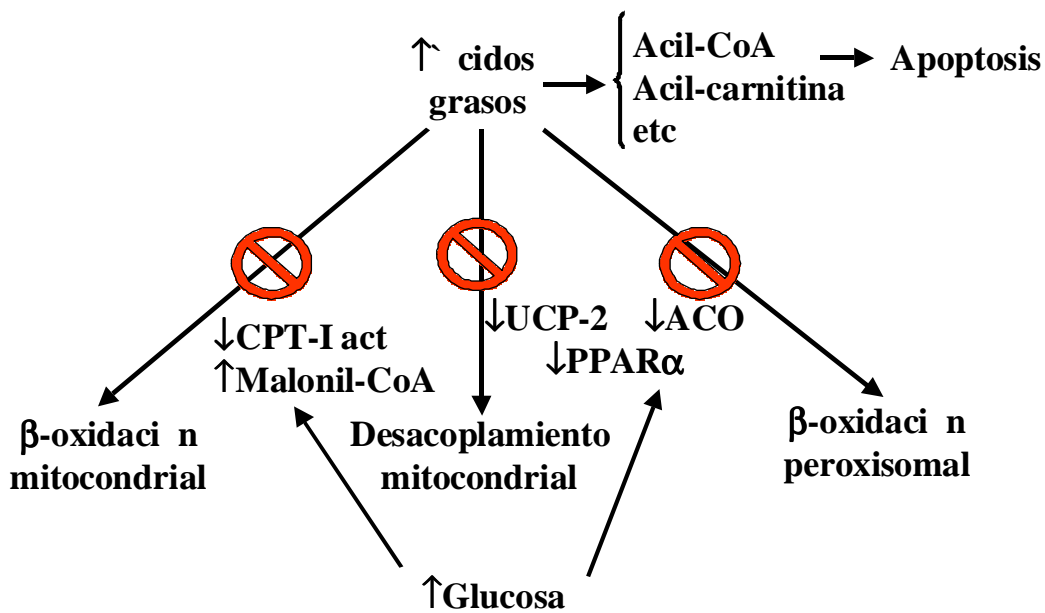
En este complejo proceso de disfunción metabólica, el malonil-CoA y el PPAR $\alpha$  (Receptor a Activadores de Proliferación Peroxisomal  $\alpha$ ) jugarían un papel preponderante. A altas concentraciones de glucosa, malonil-CoA se acumularía en el citosol y cortocircuitaría el proceso mitocondrial de la  $\beta$ -oxidación a nivel de la CPTI. Por lo tanto las únicas rutas de protección y detoxificación lipídica que quedarían en teoría implicarían la UCP-2 y la ruta de  $\beta$ -oxidación peroxisomal a través de la ACO. Sin embargo estas rutas también se verían afectadas en esta situación, ya que los niveles de PPAR $\alpha$  estarían bajos. El PPAR $\alpha$  es un factor de transcripción esencial para la expresión de los genes de la UCP-2 y de la ACO. Dicho factor de transcripción presenta niveles bajos de expresión en islotes expuestos a altas concentraciones de glucosa y los ácidos grasos se muestran incapaces de revertir el efecto del azúcar<sup>14</sup>. En consecuencia, la célula  $\beta$  quedaría atrapada en esta espiral de toxicidad a los nutrientes, dada la incapacidad para detoxificar (Figura 8).

2 and peroxisomal  $\beta$ -oxidation through ACO activity. However, these pathways would not operate as effectively, because of the low intracellular levels of PPAR $\alpha$ . PPAR $\alpha$  is a key transcription factor in the expression of UCP-2 and ACO genes. This protein displays low expression levels in islets and INS-cells exposed to elevated glucose concentrations, and fatty acids are not capable of reverting the sugar effect<sup>14</sup>. Therefore,  $\beta$ -cells would be trapped in a vicious circle of nutrient toxicity, because of the incapacity of detoxification (Figure 8).



**FIGURA 8.- Modelo de los factores que convergen en el desarrollo de la glucolipotoxicidad en la célula  $\beta$  pancreática.** La glucolipotoxicidad se desarrolla cuando ambos nutrientes (glucosa y ácidos grasos) se encuentran elevados. Ante una elevación en la concentración extracelular de ácidos grasos se activan diversos sistemas lipodetoxificadores, como es la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, el desacoplamiento mitocondrial (menor producción de ATP) y la  $\beta$ -oxidación peroxisomal. Sin embargo, este proceso de detoxificación no es efectivo en condiciones de hiperglucemia. En primer lugar la  $\beta$ -oxidación mitocondrial se ve reducida por los elevados niveles de malonil-CoA derivados de la glucosa, inhibiendo la actividad de la carnitín-palmitoil transferasa-I (CPT-I). La  $\beta$ -oxidación peroxisomal y el desacoplamiento mitocondrial también se ven afectados ya que los genes que codifican las proteínas claves (proteína desacopladora-2 (UCP-2) y acil-CoA oxidasa (ACO)) dependen del factor de transcripción PPAR $\alpha$  (Receptor a Activadores de Proliferación Peroxisomal  $\alpha$ ), que se encuentra disminuido en condiciones de hiperglucemia. Por lo tanto la ruta alternativa de los ácidos grasos sería la esterificación y acumulación, resultando en apoptosis.

**FIGURE 8.- Model of converging factors in the development of glucolipotoxicity in the pancreatic  $\beta$ -cell.** Glucolipotoxicity appears in situations in which both nutrients (glucose and fatty acids) are elevated. An increase in extracellular fatty acid concentrations induces the activation of intracellular lipodetoxifying systems in  $\beta$ -cell, such as mitochondrial  $\beta$ -oxidation, mitochondrial uncoupling (lower ATP production) and peroxisomal  $\beta$ -oxidation. However, this detoxification process is not effective in hyperglycemic conditions. First of all, mitochondrial  $\beta$ -oxidation is impaired by the elevated levels of malonyl-CoA derived from glucose, inhibiting the activity of carnitinpalmityl transferase-1 (CPT-1). Peroxisomal  $\beta$ -oxidation and mitochondrial uncoupling are also affected due to the genes codifying the key proteins (uncoupling protein-2 (UCP-2) and acyl-CoA oxidase (ACO)) depend on the transcription factor PPAR $\alpha$  (Peroxisomal Proliferator Activated Receptor  $\alpha$ ), which expression decreases in hyperglycemic conditions. Therefore, the alternate pathway for fatty acids would be esterification and accumulation, leading to apoptosis.



En estas condiciones, la única ruta disponible para los ácidos grasos sería la esterificación, acumulándose en el citosol<sup>13</sup>. La célula  $\beta$  no es una célula especializada en almacenar lípidos, como en el caso de los adipocitos. Esta acumulación progresiva de lípidos desembocaría en una disfunción celular, que se reflejaría en un proceso defectuoso de síntesis y secreción de insulina. Además estos lípidos provendrían de una parte de los elevados ácidos grasos circulantes y de otra de las altas concentraciones extracelulares de glucosa, situación ésta muy típica de los es-

Under these conditions, esterification is the only remaining pathway for fatty acids, accumulating in the cytosol (13). It should be mentioned again that aside from adipocytes,  $\beta$ -cell is not specialized in lipid storage. This progressive lipid deposition will favour cell dysfunction, leading to an impaired synthesis and secretion of insulin. Furthermore, these lipids would originate from the elevated circulating extracellular lipids as well as from elevated extracellular glucose concentrations, typical situation of diabetic states. Normalization of lipid concentration would be bene-

tados diabéticos. Una normalización progresiva de los niveles extracelulares de ácidos grasos podría tener un cierto efecto beneficioso, aunque en este sentido hay que apuntar a que la degradación de los triglicéridos acumulados es lenta (Figura 6). Si esta normalización no se lleva a cabo, el proceso puede degenerar en apoptosis o inducción del suicidio celular, ausencia por tanto de insulina y establecimiento de la diabetes<sup>23</sup>.

En conclusión, los estudios realizados en sistemas celulares apuntan a que la glucotoxicidad y la lipotoxicidad son una misma entidad en la diabetes tipo 2, siendo una de las causas principales de la disfunción a nivel de las células  $\beta$ . Estos estudios sientan las bases moleculares para verificar esta hipótesis en modelos de diabetes en animales e intentar trasladar estos conocimientos a los seres humanos. Esta hipótesis podría explicar además cómo una dieta inadecuada podría afectar a un tipo celular determinado, como es la célula  $\beta$  y contribuir al desarrollo de esta enfermedad. Además, esta hipótesis de la toxicidad a los nutrientes no está reñida con otras hipótesis, como la del "desequilibrio oxidativo", resultando incluso complementarias. Finalmente más investigación es necesaria para poder comprender los mecanismos moleculares que desembocan en esta enfermedad y poder diseñar estrategias terapéuticas más precisas y avanzadas en el tratamiento de la diabetes. En este sentido, los PPARs, tal y como se ha visto para el PPAR $\alpha$ , y posiblemente el PPAR $\gamma$ , se han mostrado recientemente como dianas interesantes para el desarrollo de nuevos fármacos en el tratamiento de esta patología<sup>52, 53</sup>.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el FIS del Instituto de Salud Carlos III, Red de Centros RCMN (C03/08), Madrid.

## BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Zimmet P, Alberti KGMM, Shaw J. Global and societal implications of the diabetic epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-787.
2. Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in  $\beta$ -cell function. *Nature* 2001; 414: 788-791.
3. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799-806.
4. Kahn CR. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 1994; 43: 1066-1084.
5. Poitout V, Robertson RP. An integrated view of  $\beta$ -cell dysfunction in type 2 diabetes. *Annu Rev Med* 1996; 47: 69-83.

ficial, although it should be reminded that triglyceride degradation from intracellular depots occurs very slowly (Figure 6). If this normalization is not achieved, the process can culminate in apoptosis or cell suicide, subsequent insulin absence and establishment of overt diabetes (23).

In conclusion, the different studies in several cell systems indicate that glucotoxicity and lipotoxicity have much in common in type 2 diabetes, being both major causes in  $\beta$ -cell dysfunction. These studies establish the molecular base to verify this hypothesis in animal models and to try to transfer all the knowledge to human beings. This hypothesis could explain also how an unhealthy diet could affect a specific cell type, such as  $\beta$ -cells, and participate in the progression of the disease. Furthermore, this hypothesis fits with others, such as "oxidative stress", resulting complementary. Finally, more research is needed to understand the molecular mechanisms implicated in the development of diabetes, with the idea of delineating precise therapeutic strategies to cure this disease. In this context, the PPARs, such as PPAR $\alpha$  and  $\gamma$ , are actually interesting therapeutic targets for the development of new drugs in the treatment of this pathology<sup>52, 53</sup>.

## ACKNOWLEDGMENTS

Supported by a grant from the FIS of the Instituto de salud Carlos III, Red de Centros RCMN (C03/08), Madrid, Spain.

6. Porte D.  $\beta$ -Cells in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 1991; 40: 166-180.
7. Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B. The hormonal and metabolic basis of experimental obesity. *Clin Endocrinol Metab* 1976; 5: 337-365.
8. Polonsky KS, Sturis J, Bell GI. Non-insulin dependent diabetes mellitus. A genetically programmed failure of the  $\beta$ -cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 1996; 334: 777-783.
9. Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D et al. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 1998; 2: 559-569.
10. Prentki M, Roduit R, Lameloise N, Corkey BE, Assimacopoulos-Jeannet F. Glucotoxicity, lipotoxicity and pancreatic  $\beta$ -cell failure: A role for malonyl-CoA, PPAR $\alpha$  and altered lipid partitioning? *Canadian J Diabetes Care* 2000; 25: 36-46.
11. Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity. Role in  $\beta$ -cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* 2002; 51 (Suppl 3): S405-S413.
12. Roche E, Assimacopoulos-Jeannet F, Witters LA, Perruchoud B, Yaney G, Corkey B et al. Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic  $\beta$ -cell line (INS-1). *J Biol Chem* 1997; 272: 3091-3098.
13. Roche E, Farfari S, Witters LA, Assimacopoulos-Jeannet F, Thumelin S, Brun T et al. Long-term exposure of  $\beta$ -INS cells to high glucose increases anaplerosis, lipogenesis and lipogenic gene expression. *Diabetes* 1998; 47: 1086-1094.
14. Roduit R, Morin J, Massé F, Segall L, Roche E, Newgard CB et al. Glucose down-regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  gene in the pancreatic  $\beta$ -cell. *J Biol Chem* 2000; 275: 35799-35806.
15. Susini S, Roche E, Prentki M, Schlegel W. Glucose and glucocorticoid peptides synergize to induce c-fos, c-jun, junB, zif-268, and nur-77 gene expression in pancreatic  $\beta$ (INS-1) cells. *FASEB J* 1998; 12: 1173-1182.
16. Brun T, Roche E, Kim KH, Prentki M. Glucose regulates acetyl-CoA carboxylase gene expression in a pancreatic  $\beta$ -cell line (INS-1). *J Biol Chem* 1993; 268: 18905-18911.
17. Laybutt DR, Weir GC, Kaneto H, Lebet J, Palmiter RD, Sharma A et al. Overexpression of c-Myc in  $\beta$ -cells of transgenic mice causes proliferation and apoptosis, downregulation of insulin gene expression, and diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 1793-1804.
18. Efanova IB, Zaitsev SV, Zhivotovsky B, Köhler M, Efendia S, Orrenius S et al. Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells. A process dependent on intracellular  $Ca^{2+}$  concentration. *J Biol Chem* 1998; 273: 33501-33507.
19. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 1995; 44: 863-870.
20. Gremlich S, Bonny C, Waeber G, Thorens B. Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J Biol Chem* 1997; 272: 30261-30269.
21. Roche E, Buteau J, Aniento I, Reig JA, Soria B, Prentki M. Palmitate and oleate induce the immediate-early response genes c-fos and nur-77 in the pancreatic  $\beta$ -cell line INS-1. *Diabetes* 1999; 48: 2007-2014.
22. Brun T, Assimacopoulos-Jeannet F, Corkey BE, Prentki M. Long chain fatty acids inhibit acetyl-CoA carboxylase gene expression in the pancreatic  $\beta$ -cell line INS-1. *Diabetes* 1997; 46: 393-400.
23. Maestre I, Jordán J, Calvo S, Reig JA, Ceña V, Soria B et al. Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the  $\beta$ -cell line INS-1. *Endocrinology* 2003; 144: 335-345.
24. Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocrinol Rev* 1998; 19: 491-503.
25. Roche E, Maestre I, Martín F, Fuentes E, Casero J, Reig JA et al. Nutrient toxicity in pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. *J Physiol Biochem* 2000; 56: 119-128.
26. Prentki M, Tornheim K, Corkey BE. Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia* 1997; 40: S32-S41.
27. De Vos A, Heimberg H, Quartier E, Huypens P, Bouwens L, Pipeleers D et al. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest* 1995; 96: 2489-2495.
28. Matschinsky FM. Regulation of pancreatic  $\beta$ -cell glucokinase. From basics to therapeutics. *Diabetes* 2002; 51 (Suppl 3): S394-S404.
29. Maechler P, Wollheim CB. Mitochondrial function in normal and diabetic  $\beta$ -cells. *Nature* 2001; 414: 807-812.
30. Rorsman P. The pancreatic  $\beta$ -cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 1997; 40: 487-495.
31. Takahashi N, Kishimoto T, Nemoto T, Kadowaki T, Kasai H. Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. *Science* 2002; 297: 1349-1352.
32. Yang S-N, Larsson O, Bränström R, Bertorello AM, Leibiger B, Leibiger IB et al. Syntaxin 1 interacts with the  $L_D$  subtype of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels in pancreatic  $\beta$  cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10164-10169.
33. Gerber SH, Südhof T. Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* 2002; 51 (Suppl 1): S3-S11.
34. Brun T, Roche E, Assimacopoulos-Jeannet F, Corkey BE, Kim KH, Prentki M. Evidence for an anaplerotic malonyl-CoA pathway in pancreatic  $\beta$ -cell nutrient signaling. *Diabetes* 1996; 45: 190-198.
35. Farfari S, Schulz V, Corkey B, Prentki M. Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic  $\beta$ -cells. Possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* 2000; 49: 718-726.
36. Maechler P, Wollheim CB. Glutamate acts as a mitochondrially derived messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 1999; 402: 685-689.
37. MacDonald MJ, Fahien LA. Glutamate is not a messenger in insulin secretion. *J Biol Chem* 2000; 275: 34025-34027.

38. Laybutt DR, Sharma A, SgROI DC, Gaudet J, Bonner-Weir S, Weir GC. Genetic regulation of metabolic pathways in  $\beta$ -cells disrupted by hyperglycemia. *J Biol Chem* 2002; 277: 10912-10921.
39. Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patane G, Laybutt R et al. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic  $\beta$ -cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 1999; 274: 14112-14121.
40. Alcazar O, Qiu-yue Z, Gine E, Tamarit-Rodríguez J. Stimulation of islet protein kinase C translocation by palmitate requires metabolism of the fatty acid. *Diabetes* 1997; 46: 1153-1158.
41. Yaney GC, Korchak HM, Corkey BE. Long-chain acyl-CoA regulation of protein kinase C and fatty acid potentiation of glucose-stimulated insulin secretion in clonal  $\beta$ -cells. *Endocrinology* 2000; 141: 1989-1998.
42. Warnotte C, Gilon P, Nenquin M, Henquin JC. Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse  $\beta$ -cells. *Diabetes* 1994; 43: 703-711.
43. Yajima H, Komatsu M, Yamada S, Straub SG, Kanako T, Sato Y et al. Cerulenin, an inhibitor of protein acylation, selectively attenuates nutrient stimulation of insulin release: a study in rat pancreatic islets. *Diabetes* 2000; 49: 712-717.
44. Segall L, Lameloise N, Assimacopoulos-Jeannet F, Roche E, Corkey P, Thumelin S et al. Lipid rather than glucose metabolism is implicated in altered insulin secretion caused by oleate in INS-1 cells. *Am J Physiol* 1999; 277: E521-E528.
45. Assimacopoulos-Jeannet F, Thumelin S, Roche E, Esser V, McGarry JD, Prentki M. Fatty acids rapidly induce the carnitine palmitoyltransferase I gene in the pancreatic  $\beta$ -cell line INS-1. *J Biol Chem* 1997; 272: 1659-1664.
46. Zhou YT, Shimabukuro M, Wang M-Y, Lee Y, Higa M, Milburn JL et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in disease of pancreatic  $\beta$ -cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8898-8903.
47. Lameloise N, Muzzin P, Prentki M, Assimacopoulos-Jeannet F. Uncoupling protein-2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion? *Diabetes* 2001; 50: 803-809.
48. Liu YQ, Tornheim K, Leahy JL. Fatty acid-induced  $\beta$ -cell hypersensitivity to glucose. Increased phosphofructokinase activity and lowered glucose-6-phosphate content. *J Clin Invest* 1998; 101: 1870-1875.
49. Branstrom R, Leibiger IB, Leibiger B, Corkey BE, Berggren P-O, Larsson O. Long chain coenzyme A esters activate the pore forming subunit (Kir6.2) of the ATP-regulated potassium channel. *J Biol Chem* 1998; 273: 31395-31400.
50. Branstrom R, Corkey BE, Berggren P-O, Larsson O. Evidence for a unique long chain acyl-CoA ester binding site on the ATP-regulated potassium channel in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 17390-17394.
51. Mutomba MC, Yuan H, Konyavko M, Adachi S, Yokoyama CB, Esser V et al. Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine. *FEBS Lett* 2000; 478: 19-25.
52. Eto K, Yamashita T, Matsui J, Terauchi Y, Noda M, Kadowaki T. Genetic manipulations of fatty acid metabolism in  $\beta$ -cells are associated with dysregulated insulin secretion. *Diabetes* 2002; 51 (Suppl 3): S414-S420.
53. Patanè G, Anello M, Piro S, Vigneri R, Purrello F, Rabuazzo AM. Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  inhibition. *Diabetes* 2002; 51: 2749-2756.