



# Beneficios de la suplementación con zinc sobre el estado metabólico, redox y de elementos traza en un modelo de diabetes moderada en ratas

[Benefits of zinc supplementation on the metabolic, redox and trace elements status in mild diabetic rats]

Tahiry Gómez<sup>1\*</sup>, Leticia Bequer<sup>1</sup>, Ángel Molinea<sup>2</sup>, José L. Molina<sup>1</sup>, Alain O. Álvarez<sup>1</sup>, Mayrelis Lavastida<sup>1</sup>, Geidy Cruz<sup>1</sup>, Cindy Freire<sup>1</sup>, Sonia Clapés<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Giron". Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, La Habana, Cuba.

\*E-mail: [tahirygh@infomed.sld.cu](mailto:tahirygh@infomed.sld.cu)

## Abstract

**Context:** The function of zinc in the diabetes prevention, its management and complications are not clear.

**Aim:** To determine the effect of zinc supplementation on the metabolic, redox and trace element status in mild diabetic Wistar rats.

**Methods:** Thirty-two female Wistar rats equally distributed in four groups were studied: C: Control, CZn: Control-Zn-supplemented, D: Diabetic, DZn: Diabetic-Zn-supplemented. Diabetes was induced by streptozotocin (STZ-100 mg/kg-sc, second postnatal day). In adulthood the corresponding groups were supplemented with zinc sulfate ( $ZnSO_4 \times 7H_2O$ -100 mg/kg) for 14 days.

**Results:** Zn supplementation in diabetic rats: -alleviated diabetes markers such as HbA1C, HOMA cell- $\beta$  index, tolerance to glucose and insulin, polydipsia and polyuria; -decreased the Cu/Zn ratio levels in serum and tissues; -in liver and kidney improved excessive accumulation of Cu and increased the Zn concentrations, without causing toxicity; -increased the reduced glutathione (GSH) levels in liver and kidney and decreased the malonyldialdehyde (MDA) levels in liver, without changes in advanced oxidation protein products (AOPP); -evidenced negative correlation between tissue levels of Zn Vs MDA and AOPP.

**Conclusions:** Zn supplementation favored glycemic control in rats with moderate diabetes, contributing to recovery of the metabolic, redox and trace elements status. Regulation of diabetes complications was associated with the antioxidant action of Zn. Nutritional supplementation with zinc may be suggested to prevent complications of diabetes in conditions of deficiency of this micronutrient.

**Keywords:** diabetes mellitus; oxidative stress; rats; zinc.

## Resumen

**Contexto:** La función del zinc en la prevención de la diabetes, su manejo y complicaciones no está esclarecida.

**Objetivo:** Determinar el efecto de la suplementación con zinc sobre el estado metabólico, redox y de elementos traza en ratas con diabetes moderada.

**Métodos:** Se estudiaron 32 ratas Wistar hembras distribuidas equitativamente en cuatro grupos: C: Control, CZn: Control-Zn-suplementado, D: Diabético, DZn: Diabético-Zn-suplementado. La diabetes se indujo con estreptozotocina (STZ-100 mg/kg-sc, segundo día-postnatal). En la adultez los grupos correspondientes se suplementaron con sulfato de zinc ( $ZnSO_4 \times 7H_2O$ -100 mg/kg) durante 14 días.

**Resultados:** La suplementación con Zn a ratas diabéticas: -moderó marcadores de diabetes como HbA1C, índice HOMA célula- $\beta$ , tolerancia a la glucosa y la insulina, polidipsia y poliuria; -disminuyó los niveles de la relación Cu/Zn en suero y tejidos; -mejoró en hígado y riñón la excesiva acumulación de Cu e incrementó las concentraciones de Zn, sin provocar toxicidad; -aumentó los niveles de glutatión reducido (GSH) en hígado y riñón y disminuyó los de malonildialdehído (MDA) en hígado, sin cambios en los productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP); -evidenció correlación negativa entre los niveles tisulares de Zn Vs MDA y PAOP.

**Conclusiones:** La suplementación con Zn favoreció el control glucémico en ratas con diabetes moderada, contribuyendo a la recuperación del estado metabólico, redox y de elementos traza. La regulación de las complicaciones de la diabetes se asoció a la acción antioxidante del Zn. La suplementación nutricional con Zn puede sugerirse para prevenir las complicaciones de la diabetes en condiciones de deficiencia de este micronutriente.

**Palabras Clave:** diabetes mellitus; estrés oxidativo; ratas; zinc.

## ARTICLE INFO

Received: December 5, 2018.

Received in revised form: March 7, 2019.

Accepted: March 7, 2019.

Available Online: March 23, 2019.

Declaration of interests: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The authors confirm that the project has not funding or grants.



---

## INTRODUCCIÓN

---

Ante el incremento de la diabetes mellitus (DM) a niveles alarmantes se desarrollan estrategias para conocer mejor su prevalencia y llevar a cabo políticas de prevención. De manera general esta enfermedad se define como un proceso de etiologías variadas que comparten manifestaciones clínicas comunes; se caracteriza por altos niveles de glucosa en la sangre y es el resultado de defectos en la producción de insulina, en la acción de la insulina, o en ambos. La diabetes es asociada con numerosas complicaciones macro y microvasculares que afectan la salud y amenazan la vida de quienes la padecen (ADA, 2017).

El Zn y la DM han sido vinculados desde que en 1934 se descubrió al Zn como componente de los cristales de insulina (Scott, 1934). En la actualidad este elemento traza es seriamente considerado con un valor terapéutico potencial en la diabetes a partir del descubrimiento del transportador 8 de Zn (ZnT8); casi exclusivamente localizado en las células  $\beta$  del páncreas donde juega un rol crucial en el transporte de Zn dentro de las vesículas secretoras de insulina, y, por tanto, en la función del Zn en la síntesis, almacenamiento y secreción de la hormona (Miao et al., 2013). Los posibles efectos beneficiosos de la suplementación con Zn en la diabetes también se justifican por la capacidad de este elemento traza per se de intervenir en varias vías de señalización de la insulina, así como por su participación en la actividad de más de 300 enzimas y en procesos celulares como división y apoptosis, además de su rol como antioxidante y antiinflamatorio (Jayawardena et al., 2012).

Aunque se han obtenido importantes progresos en este ámbito, los resultados tanto en estudios clínicos como experimentales en ocasiones son contradictorios (Jayawardena et al., 2012; Miao et al., 2013). Se ha reportado el aumento en los niveles hepáticos y renales de Cu y de la relación Cu/Zn, unido al mal control metabólico en ratas Wistar con diabetes moderada inducida neonatalmente con estreptozotocina (STZ por sus siglas en

Ingles: *streptozotocin*) (Gómez et al., 2017). Considerando la relación Cu/Zn como indicador de deficiencia moderada de Zn (Ekin et al., 2003; Yanagisawaa et al., 2016), la suplementación con sales de Zn podría beneficiar el control de la glucemia contribuyendo a la recuperación de indicadores metabólicos alterados por la diabetes en ratas. En consecuencia, el presente trabajo persigue como objetivo determinar el efecto de la suplementación con Zn sobre el estado metabólico, redox y de elementos traza en un modelo experimental de diabetes moderada en ratas Wistar.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Fármacos y reactivos

Sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ), solución oral (Laboratorios ACRILEST, Cuba). STZ (Applichem, Alemania). Insulina rápida (100 U/mL NovoRapid FlexPen, Dinamarca). Tiopental sódico (Farmahealth - Laboratories Rotifarma, SA, India). Suero fetal bovino inactivo (HyClone Laboratories, Inc, EUA). Juegos de reactivos para la determinación de insulina (Insulina IRMA kit RK-400CT, Hungría) y HbA1C (CPM Scientifica Technologie Biomediche, Italia). Soluciones estándar de Zn y Cu (Merck, Alemania). Reactivos para la determinación de Indicadores redox (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA). El resto de los reactivos presentaron alto grado analítico.

### Diseño experimental

Los experimentos se desarrollaron respetando los principios éticos establecidos para la investigación con animales de laboratorio (Directive 2010/63/EU) y los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Institución (Dictamen 27-2016/UNIB-UCM.VC).

Durante el experimento los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (19 - 25°C), humedad relativa (45 - 65%) y luz (ciclos 12 h - luz/oscuridad); y se alimentaron con libre acceso a dieta estándar y agua.

## Inducción de la diabetes y conformación de los grupos experimentales

Se obtuvieron ratas Wistar de ambos sexos aptas para la reproducción del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Cuba. Después del periodo de adaptación las ratas se aparearon para obtener animales recién nacidos. La diabetes se indujo en las crías hembras al segundo día postnatal a través de inyección subcutánea de STZ 100 mg/kg-pc, disuelta en buffer citrato sódico 0,1 M (pH 4,5) [modificado de Portha et al. (1974)]. Las ratas neonatas que conformaron los grupos controles recibieron buffer citrato en iguales condiciones. Las crías se colocaron con sus madres durante el periodo de lactancia (21 días).

En la adultez (120 días), las ratas diabéticas y controles se distribuyeron en cuatro grupos experimentales de ocho animales cada uno: D: diabético sin suplemento; DZn: diabético suplementado; C: control sin suplemento; CZn: control suplementado.

## Periodo de suplementación

Las ratas se pesaron y colocaron en cajas independientes. La suplementación con  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  se administró diariamente en el agua de beber (100 mg/kg-pc). Para evitar desviaciones en la dosis suministrada se determinó la cantidad de agua consumida para cada rata de los grupos tratados. El tiempo de suplementación se extendió durante 14 días consecutivos. La dosis 100 mg/kg de sulfato de zinc  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  equivale a 22.74 mg/kg de Zn elemental. Esta dosis se reporta en un modelo murino de diabetes severa (Bolkent et al., 2006).

El día 11 de suplementación se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) y el día 12 la prueba de tolerancia a la insulina (PTI) [modificado de Kiss et al. (2012)]. Las determinaciones de glucemia en ambas pruebas se realizaron a partir de una gota de sangre de la punta de la cola de la rata.

El día previo a la eutanasia se determinó la ingesta de agua (mL) y alimento (g), y la excreción

de orina (mL) en un periodo de 24 h. Para ello los animales se pesaron y ubicaron en cajas metabólicas (Tecniplast, Metabolic-Biological Monitoring, Italia) con previa adaptación al entorno.

## Eutanasia y recogida de muestras

Las ratas se anestesiaron con tiopental sódico (50-60 mg/kg) y se practicó eutanasia por desangrado a través de punción intracardiaca. Se colectó sangre en tubos secos y con anticoagulante para las determinaciones metabólicas. Se extrajeron los riñones y el hígado de cada rata para la cuantificación de elementos traza y de indicadores redox. Todas las muestras se conservaron a  $-40^{\circ}C$  hasta realizar las determinaciones. Para el estudio de genotoxicidad se extrajeron ambos fémures de las ratas de los grupos C y CZn, y se colectó la médula ósea mediante lavado del canal medular utilizando jeringuilla cargada con 1 mL de suero fetal bovino inactivado.

## Procedimiento analítico

### *Indicadores metabólicos*

Se determinaron los niveles de glucosa sanguínea [método glucosa oxidasa con glucómetro y biosensores SUMA (China)]; insulina en suero [ensayo inmunoradiométrico en Radiómetro SRN1C-02 (Cuba)]; hemoglobina glucosilada (HbA1C) en sangre total [método de aglutinación en Analizador de Química Clínica Hitachi 902 (Alemania)]. Se estimó la resistencia insulínica y función de la célula  $\beta$  empleando el modelo de determinación de homeostasis HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) (Cacho et al., 2008).

### *Concentraciones de elementos traza*

Se cuantificaron los elementos traza Zn y Cu en suero y en soluciones ácidas de ceniza de tejidos acorde a experiencias previas (Gómez et al., 2017) mediante la técnica AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometry*) empleando espectrofotómetro de absorción atómica Pye Unicam SP9 (Inglaterra) y llama oxidante aire-acetileno a las longitudes de onda: Zn: 213,9 nm; Cu: 324,7 nm.

### Indicadores de daño oxidativo a biomoléculas y defensa antioxidante

Las muestras de tejido se homogeneizaron acorde a Gómez et al. (2014) y se determinaron los indicadores redox por técnicas espectrofotométricas en equipo T60 UV-Visible (Reino Unido).

#### Indicadores de daño oxidativo a biomoléculas

##### *Indicador de daño oxidativo a lípidos*

Malonildialdehído (MDA). Principio del método: reacción de una molécula de MDA con dos moléculas del reactivo cromogénico N-metil-2-fenil indol en medio ácido a temperatura de incubación 45°C, formándose un compuesto coloreado que absorbe a 586 nm. La concentración de MDA se cuantifica utilizando una curva patrón de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Esterbauer y Cheeseman, 1990).

##### *Indicador de daño oxidativo a proteínas*

Productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP). Principio del método: se sigue la transformación de los iones yoduro a yodo diatómico provocado por los PAOP en condiciones ácidas, formándose un compuesto coloreado que absorbe a 340 nm. La concentración de PAOP se cuantifica utilizando una curva patrón de cloramina T (Kalousavá et al., 2002; Witko-Sarsa et al., 1996).

##### *Indicador de defensa antioxidante*

Glutación reducido (GSH). Principio del método: el GSH reacciona con el colorante DTNB [5,5'-ditiobis (2 ácido nitrobenzoico)], formándose un compuesto coloreado que absorbe a 412 nm. La concentración de GSH se cuantifica utilizando una curva patrón de GSH (Beutler, 1986).

#### Valoración de genotoxicidad

Se realizó el estudio de genotoxicidad en las ratas de los grupos C y CZn; los grupos de ratas inyectados neonatalmente con STZ no se incluyeron teniendo en cuenta que el mayor porcentaje de esta sustancia se elimina en 24 h posteriores a su administración (Busineni et al., 2015), por lo que no tiene efectos sobre la rata adulta.

Las muestras de médula ósea se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min. Por cada muestra se realizaron dos frotis del botón celular en portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 h. La fijación y tinción de las estructuras celulares se realizó por el método May Grünwald-Giemsa y se analizaron al microscopio óptico Olympus CX21 (China) a 100X. Se determinó el índice de genotoxicidad a partir de la frecuencia de eritrocitos policromatófilos (EP) portadores de micronúcleos (MN-EP) en 2000-EP/animal (Krishna y Hayashi, 2000).

#### Análisis estadístico

Las comparaciones cuantitativas se realizaron mediante la prueba no paramétrica U de Mann Whitney teniendo en cuenta la distribución de los datos; los resultados se presentaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Se empleó la correlación de Spearman ( $\rho$ ) para evaluar la relación entre las variables seleccionadas. Las diferencias se consideraron significativas con valores de  $p < 0,05$ .

---

## RESULTADOS

---

Las ratas del grupo-D presentaron niveles significativamente altos de ingesta de alimento y agua y de excreción de orina respecto al C; el peso de los animales no se modificó (Fig. 1A-D). En el grupo-DZn la ingesta alimenticia no presentó cambios respecto al D y mantuvo las diferencias con relación al grupo-C (Fig. 1B); la ingesta de agua y excreción de orina disminuyeron respecto al grupo-D, aunque mantuvieron diferencias respecto al grupo-C (Fig. 1C-D). Los grupos controles, con o sin suplemento de Zn, mantuvieron estables los valores de estas variables.

Las concentraciones de glucosa y HbA1C presentaron niveles superiores en el grupo-D respecto al C, y en el grupo-DZn se regularon los valores medios de estas variables respecto al grupo-D (Fig. 2A,C). Los niveles de insulina no presentaron diferencias entre los grupos (Fig. 2B).

Los índices de sensibilidad a la insulina HOMA-IR, HOMA-cel $\beta$  y QUICKI mostraron un



comportamiento alterado en el grupo-D respecto al C; comprobándose disminución significativa en HOMA-cel $\beta$  (Fig. 2D-F). En el grupo-DZn los niveles de HOMA-cel $\beta$  (Fig. 2E) se normalizaron respecto al grupo-C.

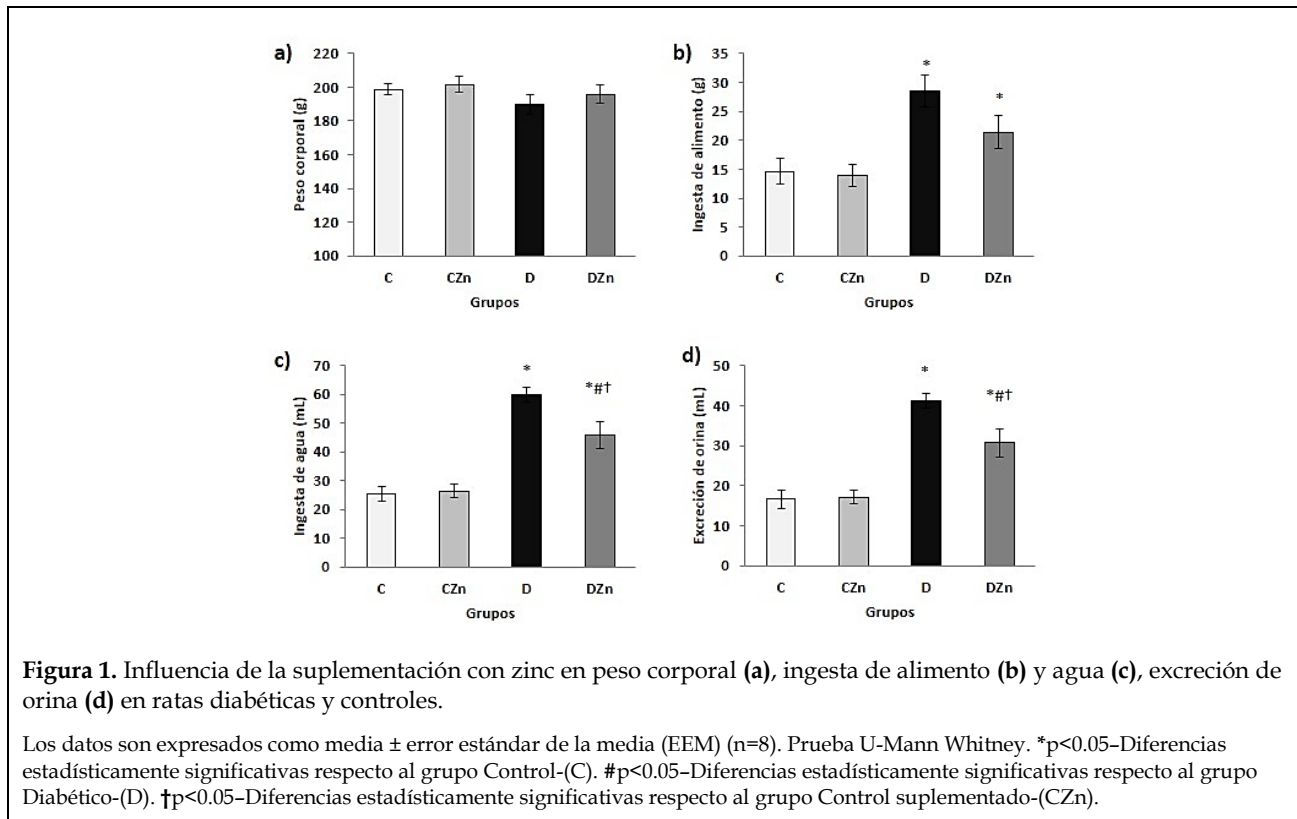
En la curva PTGO el grupo-D evidenció niveles de glucosa superiores en 0, 30, 60 y 120 min respecto al grupo-C. En el grupo-DZn se evidenció un significativo control de la glucemia en los tiempos evaluados respecto al grupo-D, aunque mantuvo las diferencias con el grupo-C (Fig. 2G).

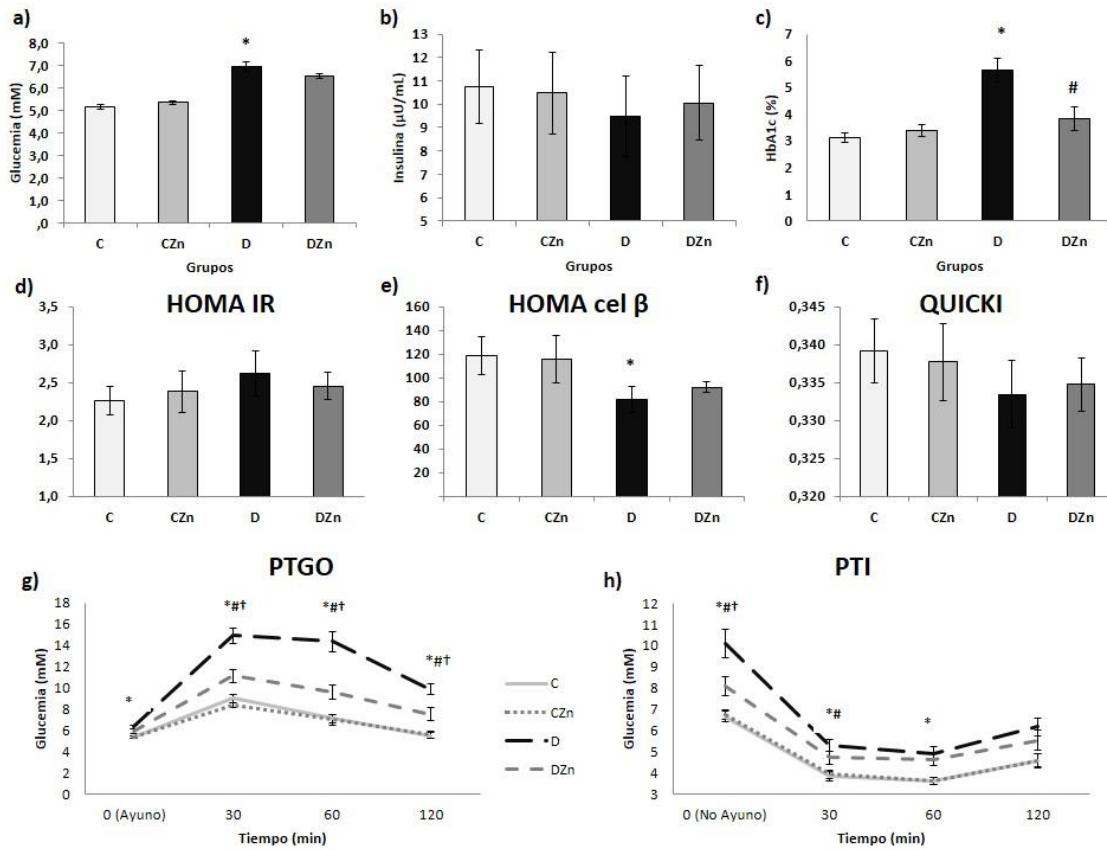
En la PTI la glucemia presentó niveles mayores en los tiempos 0, 30 y 60 min en el grupo-D respecto al C. El grupo-DZn evidenció niveles de glucosa inferiores al inicio y a los 30 min respecto al grupo-D (Fig. 2H).

Los grupos controles, con o sin suplemento de

Zn, mantuvieron estables los indicadores del estado glucémico e índices de sensibilidad y resistencia a la insulina.

El estudio de la concentración de elementos traza evidenció en el grupo-D niveles superiores de la relación Cu/Zn sérica respecto al grupo-C. La suplementación con Zn no produjo cambios significativos en los niveles de Zn séricos entre los grupos suplementados y no suplementados, sin embargo, la relación Cu/Zn se normalizó en el grupo-DZn respecto al C (Fig. 3A). En los tejidos hepático y renal se evidenciaron mayores niveles de Cu y de la relación Cu/Zn en el grupo-D respecto al C. En el grupo-DZn los niveles tisulares de Cu y Cu/Zn se regularon respecto al grupo-C. Además, la concentración de Zn tisular aumentó en ambos grupos suplementados, DZn y CZn, respecto al grupo-C (Fig. 3B-C).





**Figura 2.** Influencia de la suplementación con zinc en el estado glucémico e índices de sensibilidad a la insulina en ratas diabéticas y controles. Niveles de glucosa (a), insulina (b) y HbA1c (c); índices HOMA (d,e,f); Prueba de tolerancia a la glucosa oral (glucosa 2g/kg-pc en 4mL de agua administrada por vía oral con sonda esofágica en ayunas. La glucemia se determinó antes (0 min) y a los 30, 60 y 120 min de administrar glucosa (g); Prueba de Tolerancia a la insulina (solución de insulina inyectada subcutáneamente 0,5U/100 g-pc en área dorsal en condiciones de no ayuno. La glucemia se determinó antes (0 min) y a los 30, 60 y 120 min de inyectar insulina) (h).

Los datos son expresados como media  $\pm$  EEM (n=8). Prueba U-Mann Whitney. \* $p < 0.05$ –Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo Control-(C). # $p < 0.05$ –Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo Diabético-(D). † $p < 0.05$ –Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo Control suplementado-(CZn).

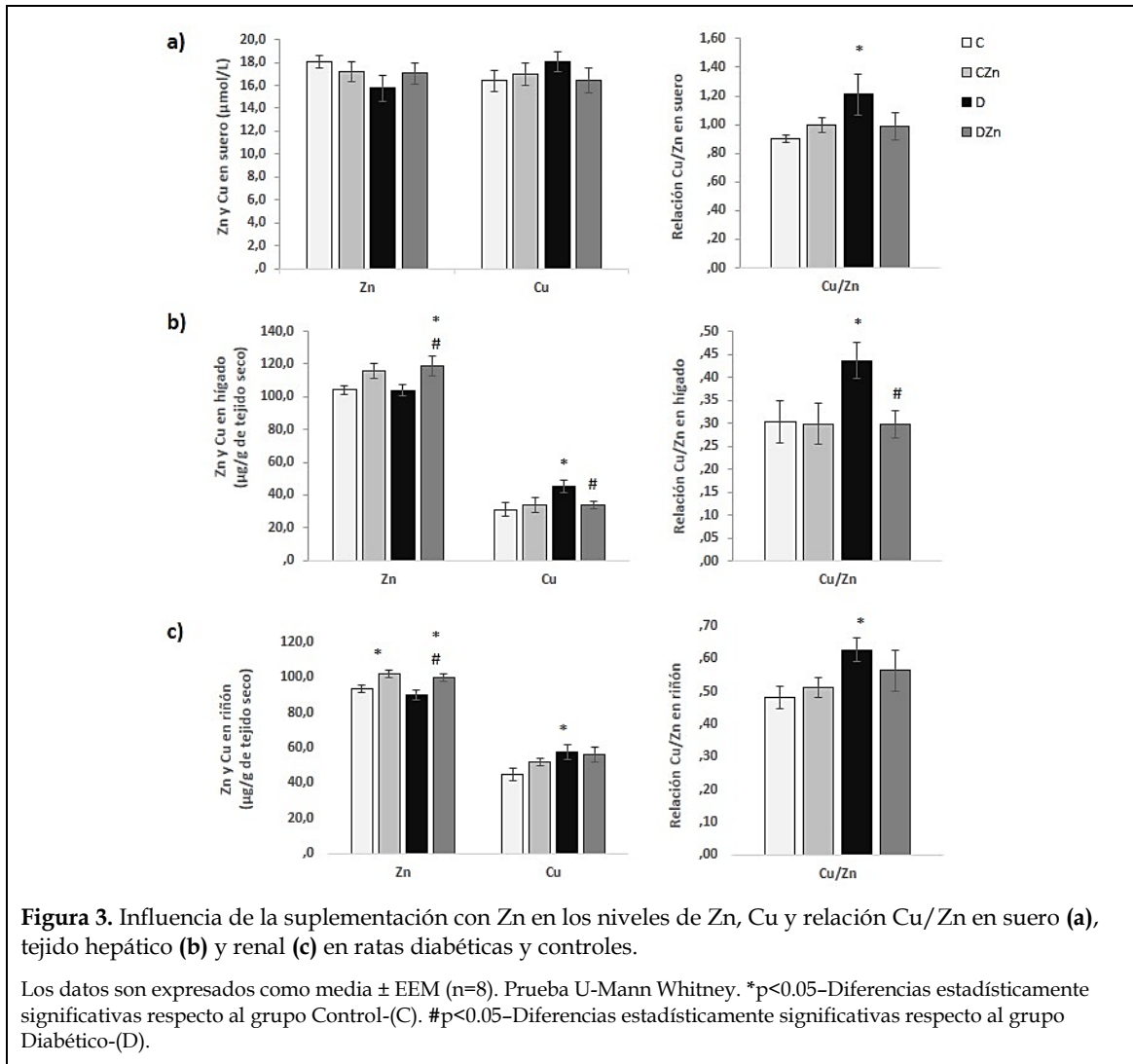
El análisis de los marcadores de daño oxidativo a biomoléculas mostró que en el tejido hepático no existieron cambios significativos en los niveles de MDA entre los grupos D y C; en el grupo-DZn disminuyeron los niveles de MDA respecto al D. En el tejido renal no se evidenciaron diferencias en los niveles de MDA entre los grupos (Fig. 4A). Los niveles de PAOP en hígado y riñón no evidenciaron cambios entre los grupos (Fig. 4B).

El estudio de la concentración de GSH, como antioxidante no enzimático, en hígado y riñón evidenció menores ( $0,5 < p < 0,1$ ) niveles en el grupo-D respecto al C en ambos tejidos, sin llegar a la signifi-

ficación. En el grupo-DZn aumentaron los niveles de GSH hepático y renal respecto al D (Fig. 4C).

Teniendo en cuenta que la concentración de Zn ha sido propuesta como marcador biológico de la defensa antioxidante se realizó en ambos tejidos un estudio de correlación entre los niveles de Zn y los marcadores de daño oxidativo a biomoléculas MDA y PAOP. En el grupo-DZn se observó una relación negativa entre los niveles de estos marcadores y la concentración de Zn (Fig. 5A-D).

La valoración de la genotoxicidad de la dosis 100 mg/kg de sulfato de zinc mediante determinación de micronúcleos en médula ósea mostró los



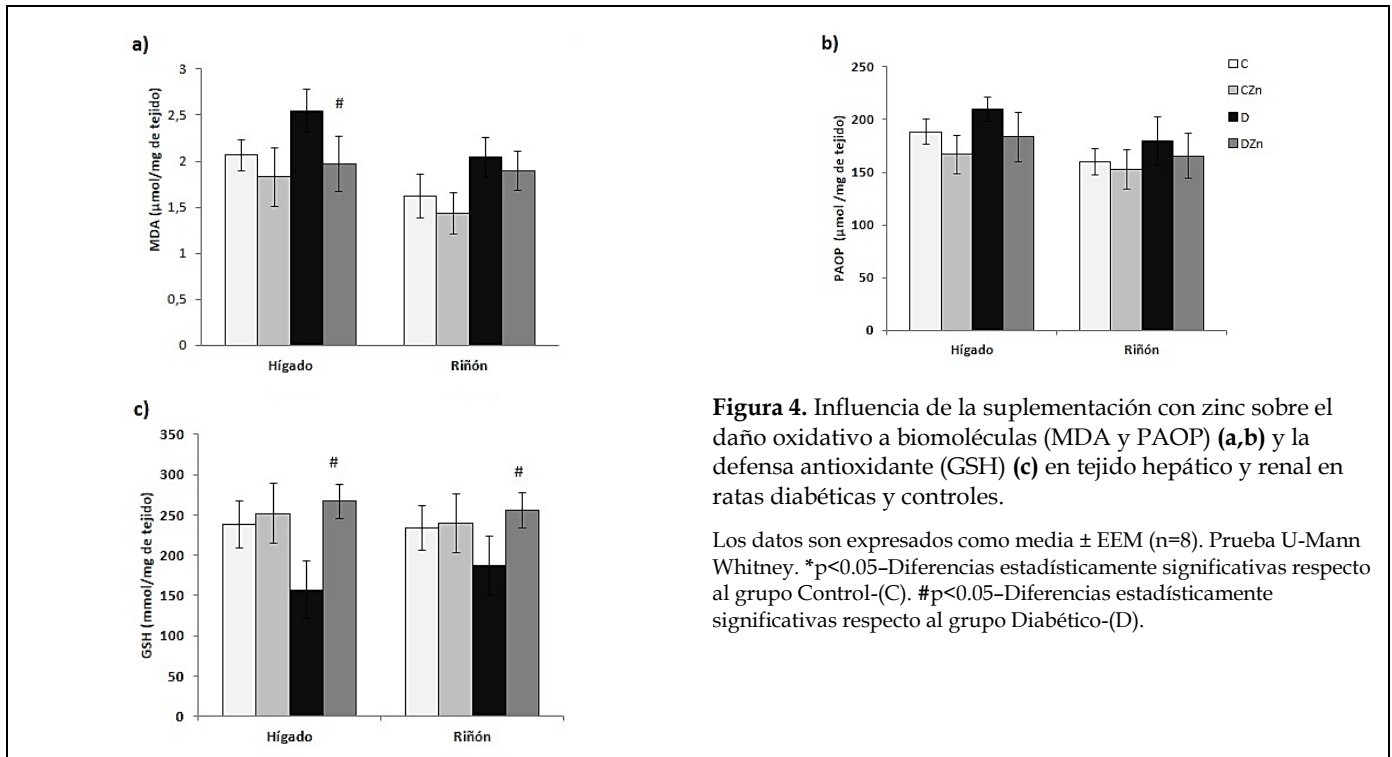
valores %MN-EP (media  $\pm$  EEM): en el grupo-C:  $0,283 \pm 0,05$  y en el grupo-CZn:  $0,292 \pm 0,05$ , sin presentar diferencias significativas. Además, no se observaron síntomas tóxicos, ni decremento en el peso corporal. En la autopsia no se evidenciaron alteraciones patológicas en los órganos analizados (hígado, corazón, riñones y páncreas).

## DISCUSIÓN

En el presente estudio los niveles moderados de hiperglucemia produjeron modificaciones en algunos indicadores metabólicos, elementos traza y marcadores redox en las ratas diabéticas. Los resultados permiten postular que el modelo experimental de diabetes por inducción neonatal con

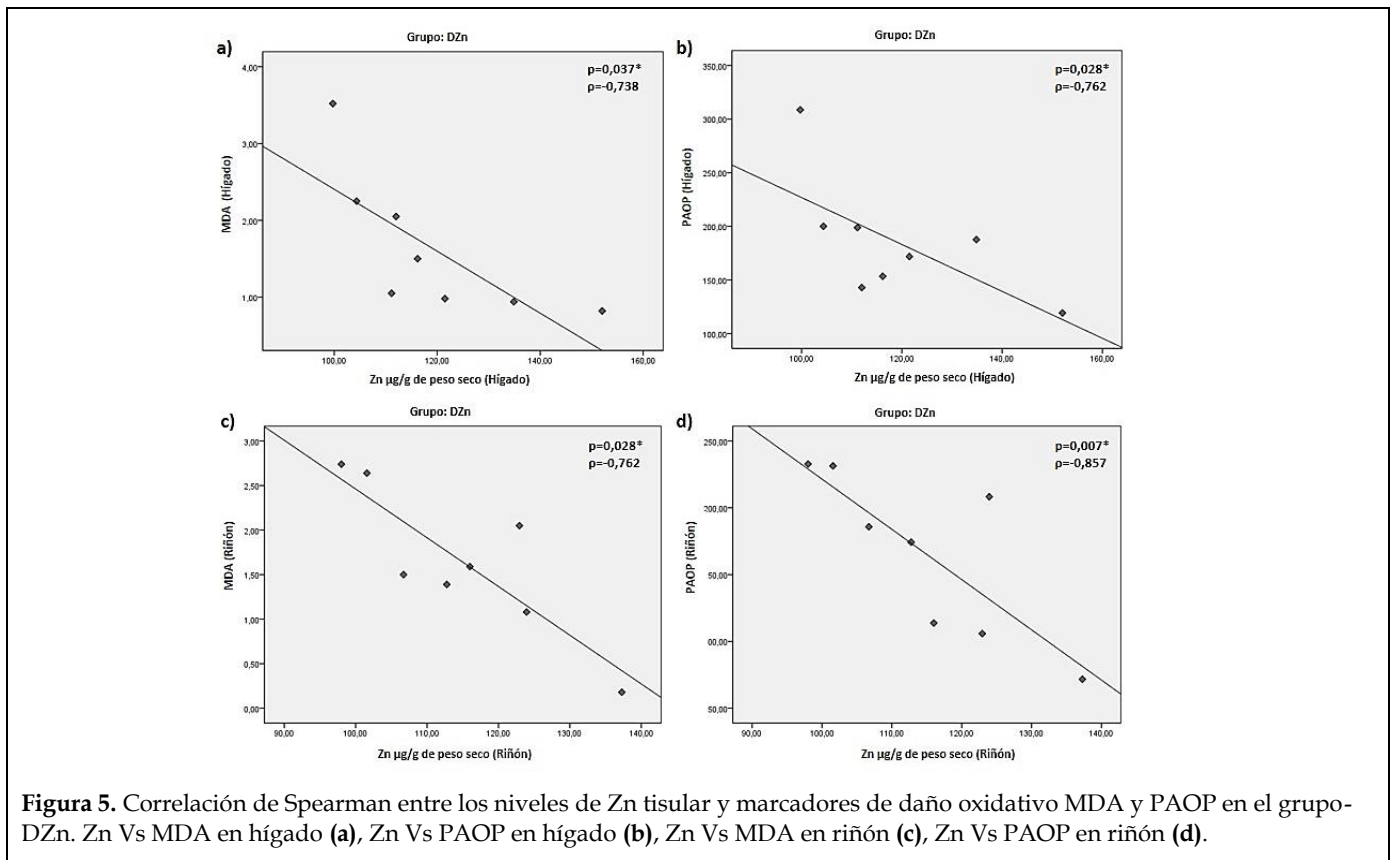
STZ reproduce alteraciones similares a las reportadas en la DM-tipo 2 en el humano, como ha sido anteriormente reportado (Bequer et al., 2014; 2016; Gómez et al., 2014), y que posibilita el estudio del efecto de suplementos nutricionales con acción antioxidante.

El control glucémico es uno de los principales cambios terapéuticos en los cuidados de la diabetes. En el presente estudio la suplementación con Zn produjo la moderación de marcadores de diabetes como HbA1C, índice HOMA-cel $\beta$ , tolerancia a la glucosa y la insulina y síntomas clínicos como la polidipsia y poliuria. Resultados similares han sido mostrados en estudios que evalúan los efectos de la suplementación con Zn en humanos con DM



**Figura 4.** Influencia de la suplementación con zinc sobre el daño oxidativo a biomoléculas (MDA y PAOP) (a,b) y la defensa antioxidante (GSH) (c) en tejido hepático y renal en ratas diabéticas y controles.

Los datos son expresados como media  $\pm$  EEM (n=8). Prueba U-Mann Whitney. \* $p < 0.05$ -Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo Control-(C). # $p < 0.05$ -Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo Diabético-(D).



**Figura 5.** Correlación de Spearman entre los niveles de Zn tisular y marcadores de daño oxidativo MDA y PAOP en el grupo-DZn. Zn Vs MDA en hígado (a), Zn Vs PAOP en hígado (b), Zn Vs MDA en riñón (c), Zn Vs PAOP en riñón (d).



(Jayawardena et al., 2012) y en modelos de diabetes severa inducida por STZ (Barman y Srinivasan, 2016; Wang et al., 2012); sin embargo, no existen evidencias de estudios previos en modelos de diabetes moderada.

En el estado diabético humano se han reportado alteraciones en el metabolismo del Zn y otros elementos traza (Kazi et al., 2008), confirmando la necesidad de un balance mineral para lograr un estado saludable. Se ha comprobado que la deficiencia de Zn no es sólo indicada por niveles bajos de Zn, sino que la proporción de Zn con otros metales como Cu también juega un papel importante en la patogénesis de la resistencia a la insulina, diabetes, síndrome metabólico y trastornos cardiovasculares, entre otras enfermedades (Ekin et al., 2003; Yanagisawaa et al., 2016). En el presente estudio los valores de Cu/Zn aumentados por la diabetes en suero, hígado y riñón, indican la presencia de una moderada deficiencia de Zn en las ratas diabéticas en este modelo experimental. Similarmente, se ha reportado aumento de los niveles séricos de Cu/Zn en pacientes con DM-tipo 2 (Ekin et al., 2003).

El efecto de la suplementación quedó reflejado en la disminución de los niveles Cu/Zn en suero y tejidos hepático y renal, y de los niveles de Cu en ambos tejidos; indicando que el metabolismo del Zn y Cu está mutuamente vinculado. En este sentido se ha comprobado que estos elementos traza comparten moléculas de almacenamiento como Cu/Zn-SOD y metalotioneínas (MT); y que compiten entre ellas por la absorción (Fu, 2013). Por otro lado, el incremento en los niveles de Zn en hígado y riñón en las ratas diabéticas y controles suplementadas sugiere que estos tejidos han sido enriquecidos con la dosis empleada y el tiempo de suplementación, sin llegar a ser tóxicos. Aunque en el presente estudio no se encontraron efectos genotóxicos del Zn por la suplementación, el aumento en los niveles de Zn en hígado y riñón en el grupo control suplementado pudiera indicar que este tratamiento sea aconsejable cuando la deficiencia de Zn haya sido comprobada. Uno de los efectos tóxicos más comunes de la suplementación con Zn es la deficiencia de Cu (Yoshikawa et al.,

2004), lo que no fue evidenciado en el presente estudio.

El rol del estrés oxidativo en la patogénesis de la DM ha sido evidenciado en estudios clínicos y experimentales. En el presente estudio no se evidenció un marcado daño oxidativo a biomoléculas en los tejidos estudiados en las ratas diabéticas. Este resultado está en correspondencia con estudios previos (Bequer et al., 2014; 2018; Gómez et al., 2014), y se ha asociado a una limitada producción de radicales libres en la etapa estudiada de la enfermedad diabética o a una activación de los sistemas antioxidantes endógenos. Considerando que los resultados evidencian una tendencia a presentar concentraciones menores de GSH tisular en las ratas diabéticas es posible sugerir que las hiperglucemias moderadas comienzan a generar una incipiente producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), que se ve eficientemente contrarrestada por la acción antioxidante del GSH. El GSH es capaz de evitar el daño a grandes moléculas por su rol fundamental en la defensa celular contra los radicales libres y otras especies oxidantes (Mak et al., 1996).

Es posible que el enriquecimiento en Zn del hígado y riñón producido por la suplementación fuera suficiente para frenar la incipiente producción de ERO en las ratas diabéticas y por tanto podría incrementar las concentraciones de GSH al disminuir su utilización en la eliminación de estos productos de la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas. Adicionalmente, el hecho de que existiera correlación inversa entre los niveles de Zn Vs MDA y PAOP en ambos tejidos estudiados indica diferencias individuales en respuesta a la suplementación con Zn, así como un papel importante de este elemento traza en la protección frente al ataque oxidativo a macromoléculas. La inducción de MT pudiera ser el mecanismo que subyace en la disminución de los niveles de MDA hepáticos; ha sido comprobado el incremento en la expresión de MT en hígado de ratas tratadas con Zn (Wang et al., 2012). Además, los niveles aumentados de Zn en el tejido hepático de las ratas suplementadas, sin cambios en los niveles de Zn séricos, sugieren que las concentraciones de Zn local pudieran ser un factor importante en la inducción de

MT. Las MT juegan un rol importante en la captación de radicales libres y protegen a la célula del estrés oxidativo vinculadas con el metabolismo del Zn y Cu (Maret y Krezel, 2007).

Por otro lado, se ha identificado que el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) es la principal ERO responsable de la muerte de las células- $\beta$  pancreáticas inducida por STZ. La generación de  $\cdot\text{OH}$  produce un daño preferencial al transportador de glucosa ZnT8, molécula esencial para que las células  $\beta$  respondan a las concentraciones extracelulares de glucosa iniciando la transducción de señal para la secreción de suficiente insulina (Chimienti et al., 2004; Powell, 2000). Los iones Zn tienen la capacidad de captar el  $\cdot\text{OH}$ , al desplazar y competir por sitios de unión con elementos de transición como cobre y hierro en diferentes sistemas biológicos, previniendo la generación de radicales libres generados por metales de transición y rescatando la célula  $\beta$  del daño oxidativo producido por la diabetes (Powell, 2000). Además, el Zn funciona como un complejo antioxidante a través de su participación en la actividad de la SOD y tiorredoxinas, la estabilización de membranas celulares y la inhibición de la peroxidación lipídica (Miao et al., 2013). En consecuencia, se plantea que el Zn, entre otros elementos traza, forma parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes y del mecanismo de defensa antioxidante en general; por lo que la medición de Zn se ha propuesto como marcador biológico del sistema antioxidante (Sánchez et al., 2004).

## CONCLUSIONES

La principal acción de la suplementación con Zn en la diabetes fue la moderación de la glucemia contribuyendo a la recuperación del estado metabólico, redox y de elementos traza. La regulación de las complicaciones de la diabetes se asoció a la acción antioxidante del Zn. Teniendo en cuenta la importancia de una dieta saludable en enfermedades como la diabetes puede sugerirse un rol beneficioso de la suplementación con Zn en condiciones de deficiencia nutricional de este micronutriente.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Las autoras declaran no tener conflicto de interés.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores confirman que no hubo proyecto asociado que financiara esta investigación.

## REFERENCIAS

- ADA (2017) American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. Sec. 2. In Standards of Medical Care in Diabetes 2017. *Diabetes Care* 40(Suppl. 1): S11-S24.
- Barman S, Srinivasan K (2016) Zinc supplementation alleviates hyperglycemia and associated metabolic abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 94(12): 1356-1365.
- Bequer L, Gómez T, Molina J, Álvarez A, Chaviano C, Clapés S (2018) Experimental diabetes impairs maternal reproductive performance in pregnant Wistar rats and their offspring. *Syst Biol Reprod Med* 64(1): 60-70.
- Bequer L, Gómez T, Molina J, López F, Gómez C, Clapés S (2014) Inducción de hiperglicemias moderadas en ratas wistar por inoculación neonatal de estreptozotocina. ¿Inyección subcutánea o intraperitoneal? *Rev Argent Endocrinol Metab* 51(4): 178-184.
- Bequer L, Gómez T, Molina JL, Artiles D, Bermúdez R, Clapés S (2016) Acción diabetogénica de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal. *Biomédica* 26(2): 230-238.
- Beutler E (1986) Improved assay of the enzymes of glutathione synthesis. *Clin Chim Acta* 158(1): 115-123.
- Bolkent S, Yanardag R, Bolkent S, Mutlu O, Yildirim S, Kangawa K, Minegishi Y, Suzuki H (2006) The effect of zinc supplementation on ghrelin-immunoreactive cells and lipid parameters in gastrointestinal tissue of streptozotocin-induced female diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 286(1): 77-85.
- Busineni G, Dwarakanath V, Chikka BK (2015) Streptozotocin. A Diabetogenic Agent in Animal Models. *Int J Pharm Pharm Res* 3: 253-269.
- Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos MP (2008) Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: 1269-1276.
- Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M (2004) Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 53(9): 2330-2337.
- Directive 2010/63/EU (2010) Legislation for the protection of

- animals used for scientific purposes. [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm) [Consultado septiembre 8, 2016].
- Ekin S, Mert N, Gunduz H, Meral I (2003) Serum Sialic Acid Levels and Selected Mineral Status in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Biol Trace Elem Res* 94: 193–201.
- Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186: 407–421.
- Fu A (2013) Zinc Metabolism in the Streptozotocin (STZ)-Diabetes. Dissertation, University of Massachusetts - Amherst.
- Gómez T, Bequer L, Mollineda A, Molina JL, Álvarez A, Lavastida M, Clapés S. (2017) Concentration of zinc, copper, iron, calcium and magnesium in the serum, tissues and urine of streptozotocin-induced mild-diabetic rat model. *Biol Trace Elem Res* 179: 237–246.
- Gómez T, Bequer L, Sánchez C, de la Barca M, Muro I, Reyes MA, Clapés S (2014) Inducción neonatal de hiperglucemias moderadas: indicadores metabólicos y de estrés oxidativo en ratas adultas. *Rev ALAD* 4(4): 148–157.
- Jayawardena R, Ranasinghe P, Galappatthy P, Malkanthi R, Constantine G, Katulanda P (2012) Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr* 4: 13.
- Kalousavá M, Skrha J, Zima T (2002) Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with Diabetes Mellitus. *Physiol Res* 51(6): 597–604.
- Kazi TG, Afridi HI, Kazi N, Jamali MK, Arain MB, Jalbani N (2008) Copper, chromium, manganese, iron, nickel and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. *Biol Trace Elem Res* 122(1): 1–18.
- Kiss AC, Woodside B, Felício LF, Anselmo-Franci J, Damasceno DC (2012) Impact of maternal mild hyperglycemia on maternal care and offspring development and behavior of Wistar rats. *Physiol Behav* 107(3): 292–300.
- Krishna G, Hayashi M (2000) *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 455: 155–166.
- Mak D, Ip S, Li P, Poon M, Ko K (1996) Alterations in tissue glutathione antioxidant system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 162(2): 153–158.
- Maret W, Krezel A (2007) Cellular zinc and redox buffering capacity of metallothionein/thionein in health and disease. *Mol Med* 13(7): 371–375.
- Miao X, Sun W, Fu Y, Miao L, Cai L (2013) Zinc homeostasis in the metabolic syndrome and diabetes. *Front Med* 7(1): 31–52.
- Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G (1974) Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes* 23(11): 889–895.
- Powell SR (2000) The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* 130: 1447S–1454S.
- Sánchez M, Santiago E, Vargas L, Mendoza V (2004) Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica* 29: 81–90.
- Scott DA (1934) Crystalline insulin. *Biochem J* 28(4): 1592–1602.
- Wang X, Li H, Fan Z, Liu Y (2012) Effect of zinc supplementation on type 2 diabetes parameters and liver metallothionein expressions in Wistar rats. *J Physiol Biochem* 68(4): 563–572.
- Witko-Sarsa V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B (1996) Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 49(5): 1304–1313.
- Yanagisawaa H, Kawashimab T, Miyazawac M, Ohshiroc T (2016) Validity of the copper/zinc ratio as a diagnostic marker for taste disorders associated with zinc deficiency. *J Trace Elem Med Biol* 36: 80–83.
- Yoshikawa Y, Ueda E, Kojima Y, Sakurai H (2004) The action mechanism of zinc (II) complexes with insulinomimetic activity in rat adipocytes. *Life Sci* 75(6): 741–751.

<b>AUTHOR CONTRIBUTION:</b>									
<b>Contribution</b>	<b>Gómez T</b>	<b>Bequer L</b>	<b>Mollineda A</b>	<b>Molina JL</b>	<b>Álvarez AO</b>	<b>Lavastida M</b>	<b>Cruz G</b>	<b>Freire C</b>	<b>Clapés S</b>
Concepts or ideas	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Design	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Definition of intellectual content	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Literature search	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Experimental studies	x	x	x	x	x	x	x	x	
Data acquisition	x	x	x	x	x	x	x	x	
Data analysis	x	x	x	x					
Statistical analysis	x	x							
Manuscript preparation	x								
Manuscript editing	x	x							
Manuscript review	x	x	x	x	x	x	x	x	x

**Citation Format:** Gómez T, Bequer L, Mollineda A, Molina JL, Álvarez AO, Lavastida M, Cruz G, Freire C, Clapés S (2019) Beneficios de la suplementación con zinc sobre el estado metabólico, redox y de elementos traza en un modelo de diabetes moderada en ratas [Benefits of zinc supplementation on the metabolic, redox and trace elements status in mild diabetic rats]. *J Pharm Pharmacogn Res* 7(2): 144–155.