



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**Doctorado en Nutrición y Alimentos**

**TITULO DE LA TESIS**

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ZINC SOBRE LA SECRECIÓN DE  
GLUCAGÓN EN DIABETES TIPO 2**

**Tesis presentada como parte de los requisitos  
para optar al grado de**

**Doctor en Nutrición y Alimentos**

**Programa Conjunto**

Facultad de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,  
Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias e Instituto de  
Nutrición y Tecnología de Alimentos

**Por**

**Álvaro Fernando Pérez Bazán**

**Director de Tesis:  
Dr. Manuel Ruz Ortiz**

**Co-Tutor de Tesis:  
Dr. Francisco Pérez-Bravo**

**Santiago, Diciembre 2017**

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ZINC SOBRE LA SECRECIÓN DE  
GLUCAGÓN EN DIABETES TIPO 2**

**Por**

**Álvaro Fernando Pérez Bazán**

Tesis presentada y aprobada como parte de los requisitos para optar al Grado  
Académico de Doctor en Nutrición y Alimentos

**COMITÉ DE TESIS**

Director de Tesis:

Prof. Dr. Manuel Ruz Ortiz

---

Co-Director de Tesis:

Prof. Dr. Francisco Pérez-Bravo

---

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

Prof. Dra. Pilar Durruty

---

Prof. Dr. Mauricio González

---

Prof. Dra. Verónica Mujica

---

Prof. Dra. Sol Morales

---

Fecha de aprobación

---

## ÍNDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA .....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT .....	xv
INTRODUCCIÓN .....	1
<i>Mecanismos de Regulación de la Secreción de Glucagón</i> .....	2
<i>Rol del Zinc en la Regulación de la Secreción de Glucagón</i> .....	3
<i>Desregulación de la Secreción de Glucagón en la Diabetes Mellitus</i> .....	7
<i>Relación entre el Zn y la Diabetes Mellitus tipo 2</i> .....	9
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVO GENERAL .....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	18
<i>Ingesta y estado nutricional de Zn</i> .....	29
<i>Expresión de ZNT-8</i> .....	38
<i>Efecto de la suplementación con Zn sobre la secreción de glucagón, relación con la glicemia y relación con la concentración plasmática de insulina</i> .....	42
<i>Efecto del sobrepeso/obesidad sobre la secreción de glucagón y su relación con el Zn</i> .....	76
<i>Glucagón y lípidos plasmáticos: Efecto de la suplementación con Zn</i> .....	87
<i>Efecto de la suplementación con Zn sobre la relación entre la secreción de glucagón y el estado inflamatorio</i> .....	95
<i>Impacto del estrés oxidativo sobre la secreción de glucagón y efecto de la suplementación con Zn</i> .....	101

<i>Modelo Integrado de Secreción de Glucagón</i> .....	111
CONCLUSIONES .....	114
BIBLIOGRAFÍA .....	116
ANEXO N°1 .....	133

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 - Criterios de inclusión y exclusión. ....	13
Tabla 2 - Características demográficas, antropométricas y bioquímicas de los sujetos al inicio y término del periodo de suplementación. ....	23
Tabla 3 – Estado nutricional de Zn al ingreso y al cabo de un año de suplementación...33	
Tabla 4 – Coeficientes de Correlación de Pearson (r) o Spearman (ρ) al ingreso entre ingesta de Zn e indicadores de estado nutricional de Zn. ....	34
Tabla 5 - Expresión de <i>ZNT-8</i> en PBMC al ingreso y post suplementación.....	40
Tabla 6 - Glucagón plasmático al ingreso.....	45
Tabla 7 - Glicemia (mg/dL), insulina plasmática (μUI/mL) y relación insulina/glucagón (μUI/pg) al ingreso.....	46
Tabla 8 – Coeficientes de Correlación de Pearson (r) o Spearman (ρ) al ingreso entre glucagón y glucosa y glucagón e insulina durante la curva de tolerancia a la glucosa intravenosa modificada (FSIVGTT) .....	47
Tabla 9 - Glucagón plasmático post-suplementación. ....	52
Tabla 10 - Glicemia (mg/dL), insulina plasmática (μUI/mL) y relación insulina/glucagón (μUI/pg) post-suplementación. ....	53
Tabla 11 – Coeficientes de Correlación de Spearman (ρ) al término del periodo de suplementación entre glucagón y glucosa y glucagón e insulina durante la curva de tolerancia a la glucosa intravenosa modificada (FSIVGTT) para el grupo control .....	54
Tabla 12 – Coeficientes de Correlación de Spearman (ρ) al término del periodo de suplementación entre glucagón y glucosa y glucagón e insulina durante la curva de	

tolerancia a la glucosa intravenosa modificada (FSIVGTT) para el grupo suplementado .....	55
Tabla 13 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) al ingreso y término del periodo de suplementación entre expresión de <i>ZNT-8</i> y glicemia, concentración de insulina plasmática y concentración de glucagón plasmático durante la curva de tolerancia a la glucosa intravenosa modificada (FSIVGTT). .....	65
Tabla 14 - Parámetros de Modelo Mínimo de Bergman al ingreso y al término del periodo de suplementación.....	70
Tabla 15 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón y parámetros del modelo mínimo al ingreso.....	71
Tabla 16 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) al término del periodo de suplementación entre glucagón, y parámetros del modelo mínimo para el grupo control .....	72
Tabla 17 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) al término del periodo de suplementación entre glucagón y parámetros del modelo mínimo para el grupo suplementado.....	73
Tabla 18 – Coeficientes de Correlación de Pearson ( $r$ ) o Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón e Índice de Masa Corporal (IMC) y Circunferencia de Cintura (CC) al ingreso.....	79
Tabla 19 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón e Índice de Masa Corporal (IMC) y Circunferencia de Cintura (CC) al término del periodo de suplementación.....	80
Tabla 20 – Coeficientes de Correlación de Pearson ( $r$ ) o Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón y lípidos plasmáticos al ingreso. ....	89
Tabla 21 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) al término del periodo de suplementación entre glucagón y lípidos plasmáticos al año para el grupo control. ....	90
Tabla 22 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) al término del periodo de suplementación entre glucagón y lípidos plasmáticos al año para el grupo suplementado .....	91

Tabla 23 - Proteína C Reactiva ultrasensible al ingreso y al término del periodo de suplementación.....	97
Tabla 24 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón y PCR (mg/L) al ingreso y al término del periodo de suplementación.....	98
Tabla 25 - Estado oxidativo al ingreso y al término del periodo de suplementación. ...	104
Tabla 26 – Coeficientes de Correlación de Pearson (r) o Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón e indicadores de estrés oxidativo al ingreso.....	105
Tabla 27 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón e indicadores de estrés oxidativo al término del periodo de suplementación para el grupo control. ...	106
Tabla 28 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón e indicadores de estrés oxidativo al término del periodo de suplementación para el grupo suplementado.....	107

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Criterios utilizados en la estratificación de voluntarios.....	12
Figura 2: Número de voluntarios iniciales y al término del estudio. ....	18
Figura 3: A) IMC pre-suplementación, B) IMC post-suplementación, C) Cambio en IMC entre pre y post-suplementación.....	25
Figura 4: A) Circunferencia de cintura pre-suplementación, B) circunferencia de cintura post-suplementación, C) cambio en circunferencia de cintura entre pre y post-suplementación.....	26
Figura 5: A) HbA1c pre-suplementación, B) HbA1c post-suplementación, C) cambio en HbA1c entre pre y post-suplementación. ....	27
Figura 6: A) Colesterol HDL pre-suplementación, B) colesterol HDL post-suplementación, C) cambio en colesterol HDL entre pre y post-suplementación. ....	28
Figura 7: A) Ingesta de Zn pre-suplementación, B) Ingesta de Zn post-suplementación, C) Cambio en la ingesta de Zn entre pre y post-suplementación.....	35
Figura 8: A) Zn plasmático pre-suplementación, B) Zn plasmático post-suplementación, C) Cambio en Zn plasmático entre pre y post-suplementación. ....	36
Figura 9: A) Pool de intercambio rápido de Zn pre-suplementación, B) Pool de intercambio rápido de Zn post-suplementación, C) Cambio en el pool de intercambio rápido de Zn entre pre y post-suplementación. ....	37
Figura 10: A) Expresión relativa de ZNT8 en PBMC pre-suplementación, B) Expresión relativa de ZNT8 en PBMC post-suplementación, C) Cambio en expresión relativa de ZNT8 en PBMC entre pre y post-suplementación.....	41



Figura 11: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa en función de la glicemia alcanzada tras la infusión de glucosa al ingreso.....	48
Figura 12: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de glucosa en función de la glicemia alcanzada tras la infusión de glucosa al término del periodo de suplementación.....	56
Figura 13: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la glicemia alcanzada tras la infusión de glucosa al término del periodo de suplementación.....	57
Figura 14: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la glicemia alcanzada tras la infusión de insulina al término del periodo de suplementación.....	58
Figura 15: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la concentración plasmática de insulina alcanzada tras la infusión de insulina al término del periodo de suplementación. ....	59
Figura 16: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa en función de la glicemia alcanzada tras la infusión de glucosa al término del periodo de suplementación. ....	60
Figura 17: Concentración plasmática de insulina alcanzada tras la infusión de insulina en función de la concentración plasmática de glucagón alcanzada tras la infusión de glucosa al término del periodo de suplementación. ....	61
Figura 18: Concentración plasmática de insulina alcanzada tras la infusión de insulina en función del cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa al término del periodo de suplementación. ....	62
Figura 19: Concentración plasmática de insulina alcanzada tras la infusión de insulina en función de la concentración plasmática de glucagón en ayunas al término del periodo de suplementación.....	63
Figura 20: Concentración plasmática de insulina alcanzada tras la infusión de glucosa en función de la expresión relativa de <i>ZNT-8</i> al término del periodo de suplementación. ....	66

Figura 21: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa en función de la expresión relativa de <i>ZNT-8</i> al término del periodo de suplementación.....	67
Figura 22: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la resistencia a la insulina al término del periodo de suplementación. ....	74
Figura 23: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa en función de la eficacia de la glucosa al término del periodo de suplementación.....	75
Figura 24: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa en función del IMC al ingreso.....	81
Figura 25: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función del IMC al término del periodo de suplementación.....	82
Figura 26: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa en función del IMC al término del periodo de suplementación.....	83
Figura 27: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de insulina en función del IMC al término del periodo de suplementación. ....	84
Figura 28: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la circunferencia de cintura al término del periodo de suplementación.....	85
Figura 29: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de insulina en función de la circunferencia de cintura al término del periodo de suplementación.....	86
Figura 30: Concentración plasmática de glucagón en ayunas en función de la concentración plasmática de colesterol LDL al término del periodo de suplementación. ....	92
Figura 31: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la concentración plasmática de colesterol LDL al término del periodo de suplementación.....	93

Figura 32: Concentración plasmática de colesterol total en función de la concentración plasmática de colesterol LDL al término del periodo de suplementación. ....	94
Figura 33: Concentración plasmática de glucagón en ayunas en función de la transformación logarítmica en base e de la concentración plasmática de Proteína C Reactiva ultrasensible al término del periodo de suplementación. ....	99
Figura 34: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la transformación logarítmica en base e de la concentración plasmática de Proteína C Reactiva ultrasensible al término del periodo de suplementación. ....	100
Figura 35: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa en función de la concentración plasmática de TBARS al ingreso. ....	108
Figura 36: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de glucosa en función de la concentración plasmática de isoprostanos al término del periodo de suplementación. ....	109
Figura 37: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la concentración plasmática de isoprostanos al término del periodo de suplementación. ....	110
Figura 38: Modelo teórico de regulación de secreción de glucagón frente a distintas condiciones fisiológicas. A) Ayuno, B) Post-infusión de glucosa, C) Post-infusión de insulina. ....	113

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

ADA	: Asociación Americana de Diabetes
AIRg	: Respuesta Insulínica Aguda a la glucosa
ALT	: Alanino Amino Transferasa
AST	: Aspartato Amino Transferasa
BOND	: Biomarcadores de Nutrición para el Desarrollo
Canales $K^+_{ATP}$	: Canales de $K^+$ sensibles a ATP
CC	: Circunferencia de Cintura
DAG/PKC	: Diacylglycerol/Proteína Quinasa C
DI	: Índice de Disposición de Glucosa
DM1/2	: Diabetes Mellitus 1/2
DPP4	: Dipeptidil Peptidasa
EDTA	: Ácido Etilendiaminotetraacético
EIA	: Ensayo Inmunoenzimático
ERK1/2	: Quinasa Regulada por Señales Extracelulares
EZP	: Pool de Intercambio Rápido de zinc
FA	: Fosfatasa Alcalina
FSIVGTT	: Prueba de Tolerancia Intravenosa a la Glucosa
GABA	: Ácido Gama-Aminobutírico
GCG	: Proglucagón
GEZI	: Efectividad de Uso de la Glucosa en ausencia de insulina
GGT	: Gama Glutamil Transferasa
GLP-1	: Péptido Similar al Glucagón-1
GLP-2	: Péptido Similar al Glucagón-2
GPX	: Glutación Peroxidasa
GR	: Receptor de Glucagón
HbA1c	: Hemoglobina glicosilada
HDL	: Lipoproteína de Alta Densidad
HOMA-IR	: Índice de Resistencia a la Insulina
IL-1 $\beta$	: Interleuquina 1 $\beta$
IL-6	: Interleuquina 6
IMC	: Índice de Masa Corporal
iNOS	: Óxido Nítrico Sintasa inducible
IR	: Receptor de Insulina
IRS-1	: Sustrato del Receptor de Insulina-1
JAK	: Janus Quinasa
JNK/SAPK	: Quinasa c-Jun N-terminal / Proteína Quinasa Activada por Stress
Kir6.0	: Canales de Potasio de Rectificación Interna
LDL	: Lipoproteínas de Alta Densidad
MAPK	: Proteína Quinasa Activada por Mitógenos

NADPH	: Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida Fosfato
NF- $\kappa$ B	: Factor Nuclear $\kappa$ B
Nrf2	: Factor de Transcripción 2 Relacionado con el Factor Nuclear Eritroide-2
PBMC	: Células Mononucleares Periféricas
PC	: Proproteína Convertasa
PCRus	: Proteína C Reactiva ultrasensible
PI-3K	: 3,4,5-Fosfatidilinositol 3 Quinasa
PLC	: Fosfolipasa C
PP2A	: Proteína Fosfatasa 2A
PTP1B	: Proteína-Tirosina Fosfatasa 1B
RIA	: Radio Inmunoensayo
Sg	: Efectividad de la Glucosa
Si	: Sensibilidad a la Insulina
SOCS3	: Supresor de la Señalización de Citoquinas 3
STAT3	: Transductor de Señales y Activador de la Transcripción 3
SUR1/2	: Receptor de Sulfonilureas 1/2
TBARS	: Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico
TFG	: Tasa de Filtración Glomerular
TNF- $\alpha$	: Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
TPEN	: N,N,N',N'-Tetraquis-(2-piridilmetil) Etilendiamina
VGCC	: Canales de Calcio de Apertura por Voltaje
VLDL	: Lipoproteínas de Muy Baja Densidad
Zn	: Zinc
ZnT-8	: Transportador de Zinc 8

## RESUMEN

**Introducción:** El glucagón, junto con la insulina, son las principales hormonas responsables de mantener la glicemia dentro de rangos fisiológicos durante el día. Pese a que desde hace largo tiempo se sabe que la secreción de glucagón aumenta en respuesta a disminuciones de la glicemia, los mecanismos mediante los cuales ésta regula la secreción de glucagón no son del todo claros. El Zn es un mineral que se encuentra altamente concentrado en las vesículas de secreción de insulina de las células  $\beta$ , siendo liberado en grandes cantidades junto con ésta y pudiendo contribuir a la supresión de la secreción de glucagón mediante distintos mecanismos, incluyendo la interacción con canales iónicos específicos y a través de sus propiedades insulino-miméticas. Distintos estudios señalan que los pacientes con DM presentan una desregulación de la secreción de glucagón caracterizada por un aumento absoluto o relativo de su secreción así como por una disminución de su supresión en respuesta a la glucosa. A su vez, distintos estudios han mostrado que pacientes con DM2 tienden a presentar una deficiencia de Zn, mientras que estudios de suplementación muestran que éste contribuye a un mejor control de la glicemia. Considerando lo anterior, se decidió evaluar el efecto que tiene la suplementación con Zn sobre la secreción de glucagón, la relación entre éste y la glicemia e insulina y sobre la regulación de la glicemia, postulándose la hipótesis de que la suplementación crónica con Zn en pacientes con DM2 disminuye en un 10% la secreción de glucagón, lo cual está asociado a un aumento en la expresión del transportador de Zn ZnT-8 y a un aumento en la secreción de y en la sensibilidad a la insulina.

**Materiales y Método:** Treinta y seis individuos fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos, uno de los cuales recibió un suplemento con 30 mg/día de Zn durante un año mientras que el otro recibió un placebo. Al ingreso y al año se evaluaron a través de un “screening” tanto la ingesta de Zn como distintos indicadores de estado nutricional de Zn, además del control glicémico, el estado inflamatorio, el estado de estrés oxidativo y una serie de parámetros antropométricos y bioquímicos. También se evaluaron mediante una curva modificada de tolerancia a la glucosa con muestreo frecuente, tanto la concentración plasmática de glucagón, insulina y glicemia, como distintos parámetros relativos a la homeostasis de la glucosa, los cuales fueron determinados de acuerdo con el modelo mínimo de Bergman.

**Resultados:** No hubo diferencias significativas en la concentración plasmática de glucagón, insulina o glicemia ni en la supresión de la secreción de glucagón en respuesta a la suplementación con Zn. Sin embargo, mientras el grupo control presentó correlaciones significativas entre la concentración plasmática de glucagón en respuesta a la infusión de insulina y la resistencia a la insulina, el índice de masa corporal, la circunferencia de cintura, la concentración plasmática de colesterol LDL y la concentración plasmática de Proteína C Reactiva ultrasensible, estas correlaciones no se presentaron o fueron atenuadas en respuesta a la suplementación con Zn.

***Conclusión:*** La suplementación con Zn disminuye el efecto de la resistencia a la insulina en células  $\alpha$  de pacientes con DM2.

## ABSTRACT

**Introduction:** Glucagon and insulin are the main hormones responsible for keeping blood glucose within physiological range throughout the day. Although it is known since long time ago that glucagon rises in response to blood glucose decrease, the mechanisms involved are still less clear. Zn is a mineral highly concentrated in insulin-containing vesicles from  $\beta$  cells, being released in substantial amounts together with such hormone and it possibly contributes to suppress glucagon secretion by distinct mechanisms, including the interaction with specific ionic channels and through its insulin-mimetic properties. Different studies pointed out that patients with DM show a dysregulation of glucagon secretion, characterized by an absolute or relative increased secretion and by a decreased suppression in response to glucose. In addition, several studies have shown that patients with T2DM have Zn deficiency, and that Zn supplementation improves glycemic control. Considering the aforementioned, we investigated the effect of Zn supplementation on glucagon secretion, the relationship between glucagon, insulin and glycemia, and on glycemic control, postulating the hypothesis that chronic Zn supplementation in T2DM patients decreased in 10% glucagon secretion, which is related with an increase in the expression of Zn transporter ZnT-8 and to an increase in the secretion and sensitivity to insulin.

**Materials and methods:** Thirty six subjects were randomly assigned to one of two groups; one received a 30 mg/day Zn supplement during a year while the other received a placebo. Zn intake and nutritional status, glycemic control, inflammatory and oxidative stress indicators as well as anthropometric and biochemical parameters were investigated at the beginning and at the end of the study. Plasma glucagon and insulin concentration, glycemia and different parameters relatives to glucose homeostasis and calculated according to Bergman's minimal model were also investigated by using the modified Frequently Sampled Intravenous Glucose Tolerance Test.

**Results:** There were no significant differences in plasma glucagon or insulin concentration, glycemia, or glucagon suppression in response to Zn supplementation. However, while the placebo group showed significant positive correlations between plasma glucagon after insulin infusion and insulin resistance, body mass index, waist circumference, LDL-cholesterol and ultrasensitive C Reactive Protein, those correlations were absent or attenuated in response to Zn supplementation.

**Conclusion:** Zn supplementation decrease insulin resistance in  $\alpha$  cells of T2DM patients.



## INTRODUCCIÓN

El glucagón es una hormona peptídica pequeña, formada por 29 aminoácidos (Thomsen *et al.* 1972), descubierta el año 1922 en perros por John Kimball y Charles Murlin durante sus intentos por perfeccionar un método de purificación de insulina a partir de extractos pancreáticos (Kimball y Murlin 1923). Esta hormona es producida y secretada por las células  $\alpha$  (Sutherland y De Duve 1948), las cuales se encuentran formando parte principalmente de los islotes de Langerhans del páncreas endocrino, aunque en especies como perros y conejos se ha descrito su presencia también en la mucosa gástrica (Sutherland y De Duve 1948, Muller *et al.* 1978). En el caso de los humanos, recientemente se ha descrito la presencia de glucagón en individuos depancreatectomizados, sugiriendo también la existencia de células  $\alpha$  extrapancreáticas (Lund *et al.* 2016).

El glucagón es producido a partir de la expresión del gen del proglucagón (*GCG*), la cual hasta el momento se describe restringida sólo a células  $\alpha$ , células L intestinales y células cerebrales (Gromada *et al.* 2007). Mientras que en células  $\alpha$  la expresión del *GCG* da origen a glucagón, en células L y células cerebrales la expresión del *GCG* da origen a los péptidos *Glucagon Like Peptide-1* (GLP-1) y *Glucagon Like Peptide-2* (GLP-2) (Jin 2008). La síntesis de una u otra de estas hormonas por los distintos tipos celulares está dada por la presencia diferencial de las enzimas *Proprotein Convertases* (PC), siendo la PC2 la responsable del procesamiento de proglucagón a glucagón en células  $\alpha$  y las PC1/3 las responsables de la formación de GLP-1 y GLP-2 en células L y cerebrales (Jiang y Zhang 2003).

La secreción de glucagón aumenta principalmente en respuesta a la disminución de la concentración plasmática de glucosa, siendo su principal función aumentar esta última mediante el incremento en la liberación de glucosa hepática (Jiang y Zhang 2003). Para esto, el glucagón debe unirse con el receptor de glucagón (GR) presente en los hepatocitos (proteína de membrana perteneciente a la familia B de la superfamilia de Receptores Acoplados a Proteínas G), dando como resultado la activación de una cascada de señalización que involucra la activación de la proteína  $G_s$ , la activación de la adenililciclase y el aumento de la concentración intracelular de cAMP (Authier y Desbuquois 2008), traducándose finalmente en la estimulación de la gluconeogénesis y de la glucogenolisis y en la supresión de la glicólisis y de la glucogenogénesis (Jiang y Zhang 2003). Adicionalmente, dentro de la cascada de señalización del glucagón se ha descrito la activación de la PLC y el aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , aunque su función no es del todo clara (Authier y Desbuquois 2008).

Junto con el hígado, el riñón es el órgano con mayor presencia de GR. Sin embargo éste también se encuentra presente, aunque en menor medida, en corazón, tejido adiposo,

bazo, glándulas adrenales, páncreas endocrino y corteza cerebral, donde el glucagón ejerce diversos efectos (Authier y Desbuquois 2008, Bansal y Wang 2008). Entre las distintas acciones del glucagón no relacionadas con la mantención de la homeostasis de la glucosa, una que ha despertado un creciente interés en los últimos años dice relación con el rol del glucagón en la regulación del gasto energético. Distintas observaciones indican que el glucagón induce un aumento en el consumo de oxígeno a la vez que favorece una reducción en el apetito (Habegger *et al.* 2010, Campbell y Drucker 2015), lo cual ha derivado en que actualmente sea estudiado su potencial terapéutico en el control de la obesidad (Habegger *et al.* 2010).

### *Mecanismos de Regulación de la Secreción de Glucagón*

Pese a que ha transcurrido más de medio siglo desde que se sugirió por primera vez que la secreción de glucagón es estimulada por la hipoglicemia (Gromada *et al.* 2007), todavía no son bien comprendidos los mecanismos que regulan la secreción de esta hormona.

La célula  $\alpha$ , al igual que la célula  $\beta$ , es una célula excitable, con una gran variedad de canales iónicos presentes en su membrana plasmática. Su regulación es compleja, interactuando estímulos de tipo nerviosos, endocrinos, paracrinos, autocrinos y yuxtacrinos con el efecto directo que ejercen diversos macro y micronutrientes como la glucosa, ciertos aminoácidos y lípidos, entre otros (Gromada *et al.* 2007, Quesada *et al.* 2008).

Actualmente, las dos principales teorías respecto de los mecanismos de regulación de la secreción de glucagón postulan que: 1) esta regulación se produce de manera intrínseca a nivel de la célula  $\alpha$  como consecuencia del metabolismo de la glucosa o 2) la regulación de la secreción de glucagón recae fundamentalmente en la acción paracrina de diversos productos de secreción liberados por las demás células del islote de Langerhans (Walker *et al.* 2011, Gylfe 2016). Sin embargo, resulta probable que ambos mecanismos colaboren en la regulación de la secreción de glucagón y que la importancia relativa de uno u otro sea dependiente de la concentración de glucosa plasmática. De este modo, los mecanismos de regulación intrínsecos tendrían una mayor relevancia en un contexto de hipoglicemia mientras que en estados de hiperglicemia los mecanismos de regulación predominantes serían aquellos de tipo paracrino (Walker *et al.* 2011, Gylfe 2016).

Diversas teorías existen también respecto de los mecanismos intrínsecos mediante los cuales la glucosa regularía la secreción de glucagón. Si bien la teoría más aceptada propone a los canales de  $K^+$  sensibles a ATP ( $K^+_{ATP}$ ) como los principales responsables de traducir los cambios metabólicos a cambios en el potencial de membrana de la célula  $\alpha$  (Rorsman *et al.* 2008), también la bomba  $Na^+/K^+$  ATPasa y la bomba de  $Ca^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) han sido postulados como posibles intermediarios a través de los cuales la glucosa ejercería su efecto inhibitorio (Gylfe 2013).

En el caso de la regulación paracrina de la secreción de glucagón, tanto las células  $\beta$  como las células  $\delta$  han sido propuestas como las responsables de llevar a cabo esta función. Mientras que en el caso de la célula  $\delta$  es la somatostatina la que participa en la modulación de la secreción de glucagón (Hauge-Evans *et al.* 2009), en el caso de la célula  $\beta$  se han descrito varios productos de secreción capaces de modular la secreción de ésta hormona, entre los que se cuentan la insulina, el ácido  $\gamma$  amino-butírico (GABA) y el Zn (Gromada *et al.* 2007).

### *Rol del Zinc en la Regulación de la Secreción de Glucagón*

El Zn es un micronutriente esencial que participa en múltiples funciones en el organismo, cumpliendo tanto roles estructurales como catalíticos y de señalización (Maret 2013). En mamíferos, forma parte de más de 300 metaloenzimas y de más de 3000 metaloproteínas, encontrándose altamente concentrado en ciertos órganos como próstata, tejido mamario y páncreas (Kelleher *et al.* 2011, Maret 2013). En el páncreas, el Zn se encuentra concentrado principalmente en las vesículas de secreción de insulina de las células  $\beta$ , participando en la cristalización de ésta y siendo liberado en gran cantidad durante su secreción (Foster *et al.* 1993, Kristiansen *et al.* 2001, Qian *et al.* 2003, Dunn 2005).

El rol inhibitorio del Zn sobre la secreción de glucagón fue descrito por primera vez en 2003 por Ishihara *et al.* en experimentos llevados a cabo en páncreas perfundidos e islotes pancreáticos aislados de ratas. En dichos experimentos, los autores observaron que la adición de Zn en una concentración de 30  $\mu$ M a una solución con piruvato (sustrato mitocondrial capaz de ingresar en células  $\alpha$  pero incapaz de ingresar en células  $\beta$ ) disminuyó en un 80% la secreción de glucagón inducida por éste mientras que la aplicación de EDTA (quelante inespecífico) durante la perfusión de páncreas con una solución con monometil-succinato (sustrato mitocondrial capaz de ingresar en células  $\alpha$  y  $\beta$ ) modificó el efecto inhibitorio de éste sobre las células  $\alpha$ , pasando a ser un estimulante sin alterar la secreción de insulina (Ishihara *et al.* 2003).

Tras un par de años, y a partir de resultados obtenidos en experimentos con páncreas perfundidos, islotes pancreáticos aislados y células  $\alpha$  aisladas de rata, Franklin *et al.* postularon que la acción inhibitoria del Zn sobre la secreción de glucagón se debía específicamente a la activación de los canales  $K^+_{ATP}$  (Franklin *et al.* 2005), cuya actividad se encuentra regulada principalmente por el estado energético de las células (relación ATP/ADP-Mg) (Seino 1999). En este sentido, los canales  $K^+_{ATP}$  son considerados como verdaderos sensores metabólicos, siendo responsables de acoplar el metabolismo celular a cambios en el potencial de membrana (McTaggart *et al.* 2010).

Los canales  $K^+_{ATP}$  son canales iónicos de tipo hetero-octámeros, estando compuestos por cuatro subunidades de Receptores de Sulfonilureas (*Sulfonylurea Receptor*, *SUR1* o *SUR2*) y cuatro subunidades de Canales de  $K^+$  de Rectificación Interna Kir6.0 (*Inwardly Rectifying  $K^+$  channels*, *Kir6.1* o *Kir6.2*) (Seino 1999). Han sido descritos en múltiples tejidos, incluyendo células  $\alpha$  y  $\beta$  pancreáticas; músculo esquelético, liso y cardiaco;

cerebro; glándula pituitaria y riñón, entre otros (Bokvist *et al.* 1999, Seino 1999) y algunos de los procesos fisiológicos en los cuales participan incluyen la secreción de insulina, la excitabilidad de miocitos y neuronas y el reciclaje de  $K^+$  en el epitelio renal (Seino 1999). En el caso específico de las células  $\alpha$ , se ha descrito que la ausencia de canales de  $K^+_{ATP}$  funcionales en islotes pancreáticos aislados de ratón (ratones K.O. para la subunidad SUR1) produjo una disminución en la secreción de glucagón frente a bajas concentraciones de glucosa, a la vez que inhibió la respuesta de las células  $\alpha$  a la adición de glucosa y de tolbutamida (sulfonilurea) (Gromada *et al.* 2004).

El Zn es capaz de modular la actividad de los canales de  $K^+_{ATP}$  tanto a nivel intra como extracelular. A nivel extracelular, el Zn puede actuar como un activador o como un inhibidor de éstos dependiendo de la conformación que posean, siendo su acción inhibitoria en el caso de los canales compuestos por subunidades SUR2A y activadora en el caso de los canales compuestos por subunidades SUR1. A nivel intracelular el Zn es capaz de activar tanto los canales  $K^+_{ATP}$  compuestos por subunidades SUR1 como por subunidades SUR2A (Prost *et al.* 2004). En cuanto al efecto activador del Zn sobre los canales  $K^+_{ATP}$  compuestos por subunidades SUR1, este estaría mediado específicamente por la unión del Zn a dos residuos de histidina presentes en la fracción extracelular de dicha subunidad (Bancila *et al.* 2005). En el caso de los islotes de Langerhans, se sabe que células  $\alpha$  y  $\beta$  pancreáticas sólo expresan canales  $K^+_{ATP}$  compuestos por subunidades SUR1 y Kir6.2 (Bokvist *et al.* 1999, Miki *et al.* 1999), por lo que la presencia extracelular de Zn resultaría en la apertura de éstos.

Pese a que distintos estudios confirman la participación de los canales de  $K^+_{ATP}$  en la inhibición de la secreción de glucagón mediada por Zn (Franklin *et al.* 2005, Zhou *et al.* 2007, Slucca *et al.* 2010), diversos estudios han fallado en demostrar esta relación (Ravier y Rutter 2005, Quoix *et al.* 2009), lo cual se suma al hecho de que, a diferencia de lo que sucede con el rol de los canales  $K^+_{ATP}$  en las células  $\beta$ , el rol de estos canales en las células  $\alpha$  aún no está del todo claro. En este sentido, mientras que está bien establecido que en las células  $\beta$  el aumento en la glucosa induce el cierre de los canales de  $K^+_{ATP}$ , lo cual genera la despolarización de la célula y la secreción de insulina (Tarasov *et al.* 2004, McTaggart *et al.* 2010), en el caso de las células  $\alpha$  la hipótesis más aceptada postula que el cierre de los canales de  $K^+_{ATP}$  produce la inactivación de ciertos canales de  $Na^+$  que operan a bajo voltaje, de los cuales depende a su vez la actividad de los canales de  $Ca^{2+}$  responsables del ingreso del  $Ca^{2+}$  necesario para la exocitosis de las vesículas de glucagón (Rorsman *et al.* 2014). Sin embargo, hasta el momento al menos un estudio ha descrito un fenómeno diferente en células  $\alpha$  de ratas, en las cuales el mecanismo de secreción de glucagón remeda al mecanismo de secreción de insulina de las células  $\beta$ , siendo exclusivamente el efecto paracrino el responsable de inhibir la secreción de glucagón frente a concentraciones elevadas de glucosa (Olsen *et al.* 2005).

Además de la acción del Zn sobre los canales  $K^+_{ATP}$ , otro mecanismo mediante el cual el Zn podría inhibir la secreción de glucagón dice relación con la actividad del transportador de Zn ZnT-8. Este transportador de Zn fue descrito originalmente como un transportador de Zn específico de las células  $\beta$  pancreáticas, encontrándose asociado

exclusivamente a las vesículas de secreción de insulina (Chimienti *et al.* 2004). Sin embargo, estudios posteriores demostraron su presencia en otros tipos celulares, aunque su expresión resulta particularmente abundante en células  $\alpha$  y  $\beta$  pancreáticas (Murgia *et al.* 2009, Zhong *et al.* 2012).

A diferencia de lo que sucede en las células  $\beta$ , en las cuales está bien descrito que el ZnT-8 es necesario para permitir el ingreso del Zn a las vesículas de secreción de insulina y la adecuada cristalización de ésta (Wijesekara *et al.* 2010), el rol de este transportador en la célula  $\alpha$  todavía se desconoce. Sin embargo, un estudio reciente llevado a cabo en ratones K.O. para ZnT-8 en células  $\alpha$  describió que el silenciamiento de este transportador indujo una mayor secreción de glucagón en respuesta a una baja concentración de glucosa (1 mM) en un subgrupo de estas células respecto de células  $\alpha$  de ratones wild type, situación que no se replicó frente a altas concentraciones de glucosa (17 mM) (Solomou *et al.* 2015). Del mismo modo, la sobreexpresión de este transportador también en células  $\alpha$  de ratón produjo en estos animales una disminución significativa de la secreción de glucagón en respuesta a la hipoglicemia evaluada mediante un clamp hipoglicémico hiperinsulinémico, lo cual fue reafirmado luego en cultivos estáticos de células  $\alpha$  de estos mismos ratones cuando fueron expuestas a bajas concentraciones de glucosa. Al igual que en el caso anterior, este efecto tampoco fue observado frente a concentraciones elevadas de glucosa (Solomou *et al.* 2016). De esta forma, pese a que el mecanismo involucrado todavía es desconocido, los antecedentes permiten especular que el ZnT-8 tiene un rol importante en la regulación de la secreción de glucagón por parte de las células  $\alpha$ , aunque al parecer sólo en situaciones de hipoglicemia.

Finalmente, un último mecanismo mediante el cual el Zn podría inhibir directamente la secreción de glucagón dice relación con su interacción con canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje (VGCC, *voltage gated calcium channels*). En este caso, un estudio llevado a cabo por Drobinskaya *et al.* en ratones K.O. para la subunidad  $\text{Ca}_v2.3$  de los canales VGCC, mostró que el silenciamiento de esta subunidad produjo un aumento en la secreción de glucagón en ratones hembra, lo cual fue también observado en ratones hembras wild type tratadas con DEDTC (Diethylthiocarbamate), el cual es un quelante de Zn utilizado en los roedores para inducir la depleción de este mineral. Pese a que el efecto del DEDTC sobre la secreción de glucagón fue igualmente observado en ratones hembra K.O. para la subunidad  $\text{Ca}_v2.3$ , este efecto fue significativamente más pronunciado en los ratones hembras wild type. De este modo, la posible explicación propuesta por Drobinskaya *et al.* sugiere que los canales  $\text{Ca}_v2.3$  también estarían involucrados en la regulación paracrina de la secreción de glucagón, siendo el Zn en este caso un inhibidor alostérico de estos canales (Drobinskaya *et al.* 2015).

Además de los efectos directos del Zn en la regulación de la secreción de glucagón, éste también podría contribuir de manera indirecta mediante su actividad insulino-mimética (Vardatsikos *et al.* 2013). En ese sentido, Miranda y Dey observaron que la aplicación de Zn (20  $\mu\text{M}$ ) en cultivos estáticos de células C2C12 fue capaz de estimular significativamente la fosforilación del receptor de insulina (IR), teniendo además un

efecto aditivo a la insulina y siendo su efecto aún mayor sobre la fosforilación del sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) (Miranda y Dey 2004). El efecto del Zn sobre la fosforilación del IR e IRS-1 estaría mediado más bien por la inhibición de la actividad de fosfatasa como la PTP1B (principal enzima responsable de desfosforilar ambas proteínas luego de su activación) más que por la estimulación directa de la actividad tirosina quinasa del IR (Haase y Maret 2003), siendo su resultado una mayor estimulación de la actividad de PI-3K y Akt (Barthel *et al.* 2007). Además del aumento en la fosforilación de IR e IRS-1, el efecto insulino-mimético del Zn sería amplificado a nivel de Akt producto del efecto inhibitorio de éste sobre la actividad de otra fosfatasa, la fosfatasa PP2A, la cual es una serina/treonina fosfatasa responsable de desfosforilar a Akt activado (Lee *et al.* 2009).

En el caso de la vía de las MAPK, se ha descrito un efecto estimulador del Zn sobre la actividad de ERK1/2, el cual podría ser atribuido en algunos casos a la activación de Ras (la cual sería específica para ciertas isoformas de ésta) (Klein *et al.* 2006) y a la inhibición que ejerce el Zn sobre la actividad de fosfatasa como PP2A (Ho *et al.* 2008).

En cuanto al efecto de la insulina sobre la secreción de glucagón, se han descrito al menos tres mecanismos mediante los cuales la insulina inhibe la secreción o expresión de glucagón (Bansal y Wang 2008): 1) disminución de la sensibilidad de los canales de  $K^+_{ATP}$  al ATP, 2) aumento de la actividad del GABA en la célula  $\alpha$  y 3) inhibición de la expresión del gen de glucagón (*GCG*).

En el caso de la acción de la insulina sobre los canales de  $K^+_{ATP}$ , se ha observado que ésta es capaz de disminuir la sensibilidad de los canales  $K^+_{ATP}$  al aumento de la concentración de ATP y posiblemente disminuya también la estabilidad de la conformación cerrada de éstos, induciendo una hiperpolarización de la célula  $\alpha$  (Leung *et al.* 2006, Lin y Chai 2008). A diferencia del Zn, cuyo efecto se produce sobre las subunidades SUR1 (reguladoras) de los canales  $K^+_{ATP}$  (Bancila *et al.* 2005), la acción de la insulina estaría mediada por la fosforilación de las subunidades Kir6.2, responsables estructuralmente de la formación del poro (Lin y Chai 2008). En cuanto a su mecanismo de acción, se ha descrito tanto que estaría mediado por PI-3K como que sería independiente de ésta y estaría mediado por la vía de Ras-ERK (Leung *et al.* 2006, Lin y Chai 2008).

El GABA se encuentra presente en las células  $\beta$  en vesículas de secreción similares a las vesículas sinápticas, las cuales son diferentes de las vesículas de secreción de insulina, e inhibe la secreción de glucagón a partir de su unión con el receptor de GABA tipo A ( $GABA_A R$ ), cuya activación induce el influjo de iones  $Cl^-$  y la hiperpolarización de las células  $\alpha$  (Braun *et al.* 2004, Gromada *et al.* 2007). Aunque no existe claridad respecto del efecto de la glucosa sobre la secreción de GABA por parte de las células  $\beta$  (Franklin y Wollheim 2004), se ha observado que la insulina es capaz de inducir la traslocación de los receptores  $GABA_A R$  hacia la membrana plasmática de las células  $\alpha$ , efecto que estaría mediado por la acción de Akt sobre residuos específicos de Ser presentes en la subunidad  $\beta$  de este receptor (Xu *et al.* 2006). De este modo, pese a que no habría un

aumento en la secreción de GABA por parte de la célula  $\beta$ , la mayor presencia de receptores GABA<sub>A</sub>R sería responsable de una mayor supresión de la secreción de glucagón.

Finalmente, se ha observado que la insulina es capaz de inhibir la expresión del gen del proglucagón (Philippe 1989). Aunque posiblemente esto no tenga ningún efecto sobre la secreción aguda de glucagón, sí podría representar un mecanismo de control de largo plazo sobre la secreción de éste. En este caso, al igual que lo que sucede con la traslocación de los GABA<sub>A</sub>R, el efecto estaría mediado específicamente por la vía de la PI-3K (Schinner *et al.* 2005).

Pese a todo lo anterior, el efecto del Zn en la vía de señalización de la insulina al parecer sería dependiente del tipo celular estudiado (Vardatsikos *et al.* 2013), lo cual requeriría estudiar el efecto del Zn específicamente en el órgano o tejido de interés.

### *Desregulación de la Secreción de Glucagón en la Diabetes Mellitus*

De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (*American Diabetes Association*, ADA), la diabetes mellitus (DM) corresponde a un conjunto heterogéneo de enfermedades metabólicas caracterizadas por la presencia de hiperglicemia, presentándose como resultado de defectos en la secreción de insulina, en su respuesta, o en ambas (*American Diabetes Association* 2014). De acuerdo a su etiología, ésta puede ser clasificada como diabetes tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2), gestacional, o como otro tipo de diabetes, siendo este último grupo de baja prevalencia (*American Diabetes Association* 2016).

A nivel mundial, la DM1 da cuenta aproximadamente del 5 – 10% del total de casos de DM, siendo el 90 – 95% restante DM2 (*American Diabetes Association* 2016). Esto es importante considerando que mientras la DM1 es consecuencia principalmente de un trastorno autoinmune con un fuerte componente genético, la DM2 es más bien multifactorial, con un componente genético más acotado, y sus principales factores de riesgo son la edad, el sedentarismo y la obesidad (*American Diabetes Association* 2016).

Actualmente, la DM2 es considerada una epidemia (Zimmet *et al.* 2001), estimándose que el año 2010 esta enfermedad alcanzó una prevalencia mundial de 6,4% en personas entre 20 y 79 años, afectando a aproximadamente 285 millones de individuos (Shaw *et al.* 2010). Para el año 2030 se estima que esta enfermedad afectará a aproximadamente 439 millones de personas en el mundo, alcanzando una prevalencia de 7,7% y observándose el mayor aumento de ésta en países en vías de desarrollo (Shaw *et al.* 2010). Además del fuerte impacto que esta enfermedad tiene en los pacientes y sus familias, ésta repercute también fuertemente en las sociedades, las cuales deben hacer frente a altos costos por conceptos de tratamientos de salud así como por pérdidas de la capacidad laboral de los individuos afectados. En este sentido, se estima que tan sólo en 2012 los costos directos e indirectos de la DM en los Estados Unidos alcanzaron los US\$245 billones, siendo US\$69 billones asociados a pérdida en la productividad

(American Diabetes Association 2013). En Chile, los datos de la Encuesta Nacional de Salud 2009-2010 revelaron una prevalencia de DM de 9,4% en personas sobre 15 años, reflejando esto un importante aumento respecto del 6,3% observado en la Encuesta Nacional de Salud del año 2003 (Chile. Ministerio de Salud. 2011).

Aunque según la definición de la ADA la DM es considerada una enfermedad monohormonal, desde hace ya algún tiempo que ciertos autores han planteado que los defectos en la secreción de glucagón son una parte fundamental y necesaria para el desarrollo de ésta, postulando que la deficiencia de insulina sería responsable de la intolerancia a la glucosa mientras que el exceso de glucagón lo sería de su excesiva producción endógena (Unger y Orci 1975). Diversas revisiones se han publicado al respecto (Dunning y Gerich 2007, D'Alessio 2011, Cryer 2012, Gaisano *et al.* 2012, Li y Zhuo 2013), observándose que 1) los pacientes con DM presentan niveles elevados de glucagón plasmático, ya sea en forma absoluta o relativa a los niveles de glucosa plasmática; 2) a su vez, estos pacientes presentan una inadecuada supresión de la secreción de glucagón en respuesta a la glucosa, ya sea ésta administrada por vía oral o por vía endovenosa; 3) los pacientes con DM presentan una secreción exagerada de glucagón en respuesta a estímulos como arginina o una dieta rica en aminoácidos; y 4) la falta de supresión de la secreción de glucagón contribuye al exceso de producción de glucosa hepática, la cual a su vez participa en el desarrollo de la hiperglicemia postprandial.

Estudios realizados en modelos animales confirman el rol del glucagón en el desarrollo de la DM. En ese sentido, Li *et al.* observaron que la administración de glucagón en ratas por cuatro semanas produjo trastornos en la homeostasis de la glucosa y daño renal propios de la DM2, lo cual no fue replicado por la administración de glucosa durante el mismo tiempo (Li *et al.* 2008), mientras que Lee *et al.* observaron en ratones K.O. para el GR tratados con estreptozotocina que la ausencia del efecto del glucagón en condiciones de déficit de insulina evita la aparición de manifestaciones clínicas de DM (Lee *et al.* 2012). De este modo, algunos autores sugieren que sería más bien el exceso de glucagón más que la ausencia de insulina o de su efecto el principal responsable de la DM (Unger y Cherrington 2012).

En cuanto a la posible causa de la desregulación en la secreción de glucagón, se postula que ésta responde a la ausencia del efecto de la insulina sobre las células  $\alpha$ , ya sea esto producto de la falta misma de insulina (propia de la DM1 o de estados avanzados de DM2) o del desarrollo de resistencia a la insulina en estas células. En este sentido, Tsuchiyama *et al.* evaluaron la secreción de glucagón e insulina (medida mediante péptido C) en respuesta a la infusión de arginina en 35 sujetos sanos, 35 sujetos con DM1 y 130 sujetos con DM2, hallando una correlación inversa entre la secreción de glucagón (expresada como área bajo la curva,  $AUC_{IRG}$ ) y la secreción de insulina (expresada como área bajo la curva,  $AUC_{CPR}$ ) en individuos con DM1 y una correlación positiva entre el  $AUC_{IRG}$  y el  $AUC_{CPR}$  en pacientes con DM2. Al relacionar estos resultados con otros parámetros, en el caso de la DM1 observaron que el  $AUC_{IRG}$  aumentaba en la medida que aumentaba la duración de la enfermedad mientras que



disminuía el  $AUC_{CPR}$ . En el caso de la DM2, tanto el  $AUC_{IRG}$  como el  $AUC_{CPR}$  aumentaban en la medida que aumentaba el IMC y la resistencia a la insulina (evaluada mediante HOMA-IR), mientras que disminuían en la medida que aumentaba la sensibilidad a la insulina (evaluada mediante QUICKI) (Tsuchiyama *et al.* 2007). Por su parte, González *et al.* observaron que la exposición prolongada de células InR1-G9 (células  $\alpha$  de hámster) a la acción de la insulina abolió el efecto inhibitor de esta última sobre la expresión del gen del proglucagón debido al desarrollo de resistencia a la insulina en este tipo de células (disminución del contenido de IR, menor fosforilación de IR, IRS-1, Akt) (Gonzalez *et al.* 2008), mientras que Piro *et al.* observaron que la exposición de células  $\alpha$ TC1-6 a una concentración de 0,5 mmol/L de palmitato durante 48 horas generó una condición de resistencia a la insulina en estas células (menor fosforilación de IR, IRS-1, PI-3K, y Akt), lo que a su vez provocó un incremento en la secreción basal de glucagón y una disminución en la supresión de ésta por parte de la insulina (Piro *et al.* 2010). En este último caso, los autores observaron también que la exposición a palmitato produjo un aumento en la expresión del gen del proglucagón mediado por un aumento en la activación de la vía de las MAPK de forma independiente a la insulina (Piro *et al.* 2010).

#### *Relación entre el Zn y la Diabetes Mellitus tipo 2*

La relación entre la homeostasis del Zn y la DM es compleja; mientras que la homeostasis del Zn se ve alterada en presencia de DM, la instauración y progresión de esta última también se ve modificada en relación con distintos parámetros de la homeostasis del Zn.

Una importante característica de la DM2 es la presencia de un estado inflamatorio crónico de bajo grado, el cual involucra la desregulación de múltiples citoquinas entre las que destacan la IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$  y la IL-6 (Pickup y Crook 1998, Alexandraki *et al.* 2006, Donath y Shoelson 2011). Mientras que el exceso de IL-1 $\beta$  ha sido relacionado principalmente con la disfunción de la célula  $\beta$  (Dinarello *et al.* 2010), el TNF- $\alpha$  ha sido identificado como el principal responsable de la generación de resistencia a la insulina a nivel de tejidos periféricos (Hotamisligil *et al.* 1994). Distintos estudios han observado que el Zn es capaz de modular tanto la secreción de IL-1 $\beta$  como la activación de NF- $\kappa$ B, principal mediador involucrado en la señalización de esta citoquina y que también participa en la señalización de TNF- $\alpha$  (Jansen *et al.* 2009, Ortis *et al.* 2012). A su vez, las propiedades insulino-miméticas del Zn descritas previamente podrían contribuir a atenuar los efectos que el TNF- $\alpha$  ejerce sobre la fosforilación del IR e IRS-1, disminuyendo la resistencia a la insulina. En el caso de la IL-6, aunque su rol en la DM es menos claro, se postula que su elevación crónica también participa en la generación de resistencia a la insulina mediante la activación de la vía JAK2-STAT3-SOCS3 (Wunderlich *et al.* 2013), la cual es inhibida a nivel STAT3 por el Zn (Kitabayashi *et al.* 2010).

Además del estado inflamatorio, otra característica de la DM2 es la presencia de un estado de estrés oxidativo producto, entre otras cosas, del aumento crónico de la

glicemia y del consiguiente incremento en la glicólisis y fosforilación oxidativa, el cual puede llevar, entre otras cosas, a una disminución de la secreción de insulina (Keane *et al.* 2015). En este sentido, se ha observado que el Zn posee importantes propiedades antioxidantes, siendo capaz de inducir la expresión de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos como superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión; inhibir la actividad de enzimas pro-oxidantes como la Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS) y la NADPH oxidasa; inducir la expresión de metalotioneína, proteína rica en residuos cisteína con gran capacidad antioxidante; e incluso regular al alza la actividad de Nrf2, factor de transcripción fundamental para la expresión de múltiples proteínas y enzimas antioxidantes (Prasad 2014).

Diversos estudios de suplementación con Zn en pacientes con DM2 han concluido que la suplementación con Zn mejora el manejo de la glicemia en estos pacientes (Jayawardena *et al.* 2012, Capdor *et al.* 2013, Ruz *et al.* 2016), mientras que el polimorfismo rs13266634 C/T del transportador de Zn ZnT-8 se ha asociado con un aumento de en el riesgo de DM2 (Scott *et al.* 2007, Sladek *et al.* 2007, Zeggini *et al.* 2007). A su vez, se ha descrito que el transportador ZnT-8 actúa como autoantígeno en DM1 (Wenzlau *et al.* 2007).

La DM también afecta la homeostasis del Zn, siendo una de las consecuencias más comúnmente observadas la hipozincemia, la cual se especula podría tener su origen en la excreción aumentada de Zn a través de la orina, en una disminución de la absorción de Zn o en ambos (Chausmer 1998), y podría contribuir a profundizar los defectos presentes en la homeostasis de la glucosa (Ruz *et al.* 2016). Además, el aumento del contenido de metalotioneína hepática generado en respuesta a la inflamación crónica de bajo grado antes mencionada podría contribuir también a la disminución del Zn plasmático mediante el secuestro de éste (Pickup y Crook 1998). En el caso de la hiperzincuria, éste también es un fenómeno común en pacientes con DM, siendo posiblemente una consecuencia secundaria de la poliuria ocasionada por la hiperglicemia (Chausmer 1998).

Pese a todos los antecedentes previamente mencionados, hasta el momento no existen estudios de suplementación con Zn cuyo objetivo sea evaluar el efecto de ésta sobre la secreción de glucagón en pacientes con DM2, por lo cual el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación crónica con Zn sobre la secreción de glucagón y la homeostasis de la glucosa.

## HIPÓTESIS

La suplementación crónica con Zn a niveles fisiológicos en pacientes con DM2 disminuye en un 10% la secreción de glucagón, lo cual está asociado a un aumento en la expresión del transportador de Zn ZnT-8 y a un aumento en la secreción y en la sensibilidad a la insulina.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la suplementación con Zn sobre la regulación de la glicemia y concentraciones plasmáticas de glucagón, insulina y relación insulina/glucagón en individuos con DM2, así como sobre la expresión del transportador de Zn ZnT-8 y su relación con la secreción de glucagón.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la suplementación crónica con Zn sobre distintos indicadores de estado nutricional de Zn en individuos con DM2.
2. Evaluar el efecto de la suplementación crónica con Zn sobre la expresión del transportador de Zn ZnT-8 en células mononucleares periféricas de individuos con DM2.
3. Evaluar el efecto de la suplementación crónica con Zn sobre el control de la glicemia en individuos con DM2.
4. Evaluar el efecto de la suplementación crónica con Zn sobre las concentraciones plasmáticas de glucagón, insulina y relación insulina/glucagón en individuos con DM2.
5. Evaluar el efecto de la suplementación crónica con Zn sobre la relación entre la glicemia y la concentración plasmática de insulina con la regulación de la secreción de glucagón en individuos con DM2.
6. Evaluar el efecto de la suplementación crónica con Zn sobre la relación entre la expresión del transportador de Zn ZnT-8 en células mononucleares periféricas y el control de la glicemia y las concentraciones plasmáticas de glucagón, insulina y relación insulina/glucagón.
7. Evaluar el efecto de la suplementación crónica con Zn sobre perfil lipídico, estado inflamatorio y estrés oxidativo en pacientes con DM2.
8. Evaluar el efecto de la suplementación crónica con Zn sobre la relación entre parámetros antropométricos, perfil lipídico, estado inflamatorio y estrés oxidativo con la regulación de la secreción de glucagón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Treinta y seis pacientes con DM2 fueron reclutados mediante el uso de correos electrónicos institucionales masivos y avisos en prensa local. Los criterios de inclusión y exclusión se detallan en la Tabla 1.

El estudio fue diseñado como un estudio clínico doble ciego, aleatorizado, pareado por sexo y tiempo de diagnóstico (ver Figura 1) y controlado por placebo. Para esto, los individuos fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes dos grupos:

- a) Grupo suplementado: El cual recibió una suplementación diaria con 30 mg de zinc elemental durante un año, suministrado en la forma de sulfato de zinc. El suplemento se entregó en envases con 30 cápsulas, los cuales fueron reemplazados mensualmente en el domicilio de los voluntarios, retirándose el envase anterior. La adherencia fue controlada mediante el recuento de las cápsulas sobrantes en los envases retirados.
- b) Grupo control: El cual recibió un placebo, con cápsulas de igual aspecto al suplemento. La entrega y retiro del placebo, así como el control de su adherencia, se realizó de la misma manera que para el grupo control.

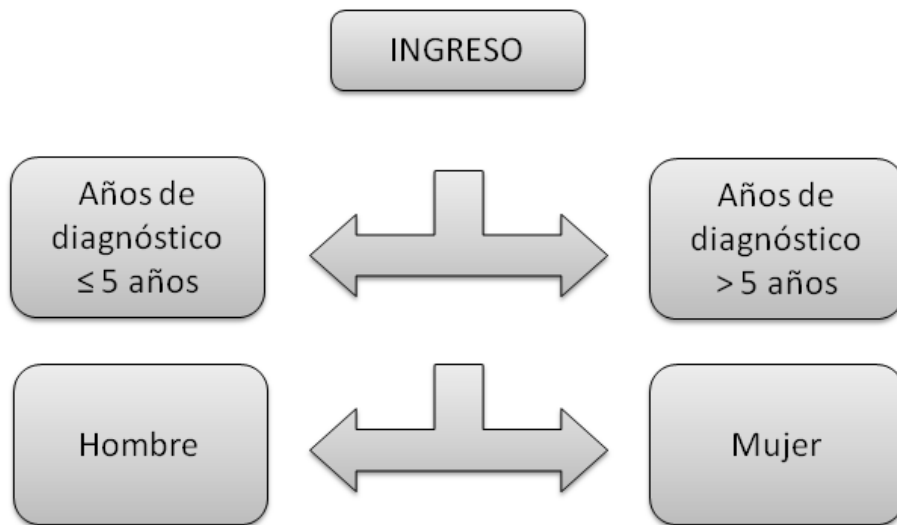


Figura 1: Criterios utilizados en la estratificación de voluntarios.

Tabla 1 - Criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Edad entre 30 – 65 años	Terapia con insulina
Diabetes Mellitus tipo 2 con menos de 10 años de diagnóstico	Antecedentes de cetoacidosis o síndrome hiperglicémico hiperosmolar no cetósico en los últimos seis meses
IMC entre 20 – 40 kg/m <sup>2</sup>	Tasa de filtración glomerular (TFG) menor a 60 mL/min de acuerdo con la ecuación MRDR (Levey <i>et al.</i> 2006)
Menos de 5% de variación de peso en los últimos tres meses	Valores de ALT o AST sobre 2,5 veces el límite superior
Hb A1c entre 5,7 – 8,0%	Insuficiencia cardíaca congestiva grado III o IV de acuerdo con la definición de la New York Heart Association (Dolgin y New York Heart Association Criteria Committee 1994)
Glicemia en ayunas menor a 180 mg/dL	Hipertensión no controlada
	Colesterol plasmático sobre 240 mg/dL o triglicéridos plasmáticos sobre 200 mg/dL
	Ataque isquémico transitorio, infarto agudo al miocardio o accidente cerebrovascular en los últimos cinco años
	Antecedentes de cirugía o infección aguda en los últimos tres meses
	Enfermedades psiquiátricas que puedan afectar la adherencia
	Terapia con fármacos agonistas de GLP-1 o inhibidores de DPP4
	Uso de fármacos antipsicóticos
	Uso de glucocorticoides sistémicos en las últimas seis semanas

---

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
	<p data-bbox="1050 381 1596 414">Ingesta de alcohol igual o superior a dos vasos/día</p> <p data-bbox="1050 446 1848 511">Diagnóstico o terapia por cáncer en los últimos cinco años a excepción de aquellos que hayan sido curados y tengan buen pronóstico</p> <p data-bbox="1050 535 1260 568">Infección por VIH</p> <p data-bbox="1050 592 1291 625">Embarazo o lactancia</p> <p data-bbox="1050 657 1816 690">Uso de suplementos vitamínicos o minerales en los últimos tres meses</p>

---

Tanto al ingreso como a los 12 meses de estudio los pacientes fueron citados en ayunas para la realización de un screening, procedimiento en el cual se recolectaron muestras de sangre y pelo para la determinación de:

- Estado metabólico en ayunas mediante la determinación de glicemia en ayunas y HbA1c;
- Estado inflamatorio mediante la determinación de Proteína C Reactiva ultrasensible (PCRus);
- Estado Nutricional de Zn mediante la determinación de Zn plasmático, Zn en pelo, pool de intercambio rápido de Zn (EZP) y Zn en células mononucleares periféricas (PBMC);
- Estrés oxidativo mediante determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutatión total, glutatión reducido, relación glutatión reducido/glutatión total, glutatión peroxidasa (GPX) e isoprostanos totales en plasma y;
- Determinación de expresión de *ZNT-8* en células PBMC.

Adicionalmente, a los pacientes se les realizó una encuesta alimentaria y un registro de consumo de alimento de tres días para determinar la ingesta de zinc.

Luego del “screening” y dentro de un mes los pacientes fueron citados nuevamente para la realización de una curva de tolerancia a la glucosa intravenosa con muestreo frecuente modificada (FSIVGTT, *Frequently Sampled Intravenous Glucose Tolerance Test*). Para esto, los pacientes fueron admitidos a primera hora de la mañana luego de 12 horas de ayuno, colocándoseles un catéter en cada brazo para permitir la infusión de glucosa, insulina y permitir la toma de muestras. A tiempo 0 ( $T_0$ ) a los pacientes se les infundió un bolo de 0,3 g/kg de peso de glucosa al 50% en un periodo de dos minutos y a los 20 minutos ( $T_{20}$ ) se les infundió un bolo de 0,05 UI/kg de insulina en un periodo de 30 segundos. Quince y cinco minutos previos a la infusión de glucosa ( $T_{-15}$  y  $T_{-5}$ ) se procedió a la toma de muestras de sangre para la determinación de glicemia e insulina plasmática basal y luego de la infusión de glucosa se tomaron muestras de sangre a los 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 19, 22, 24, 27, 30, 40, 50, 70, 90, 120, 150 y 180 minutos. Los datos de glicemia e insulina fueron analizados utilizando el software MINMOD 6.02 de acuerdo al modelo mínimo de Bergman para calcular los valores de respuesta insulínica aguda a la glucosa (AIRg), el índice de disposición (DI), la sensibilidad a la insulina (Si), la eficacia de la glucosa (Sg), la eficacia de la glucosa en ausencia de insulina (GEZI), la función de la célula  $\beta$  y la resistencia a la insulina (Boston *et al.* 2003). Cinco minutos previos a la infusión de glucosa, así como 10 y 30 minutos luego de ésta se tomaron muestras de sangre para determinar la concentración plasmática de glucagón. Para esto, 2 mL de sangre fueron recolectados en tubos con 500 KIU de aprotinina (Merck Millipore, Alemania)/mL de sangre, previamente enfriados en hielo. Las muestras fueron centrifugadas inmediatamente tras su recolección a 4.000 g durante cinco minutos, separadas y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

La glicemia fue analizada mediante colorimetría de punto final (DIALAB GmbH, Wr. Neudorf, Austria) y la Proteína C Reactiva ultrasensible fue analizada mediante inmuniturbidimetría (Química Clínica Aplicada S.A., Tarragona, España) en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 de doble haz (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón).

El Zn en plasma fue determinado de acuerdo al método de Smith *et al.* (1979) en un espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin-Elmer AAnalyst 100 (Perkin-Elmer Corporation), mientras que las muestras de pelo y orina fueron procesadas de acuerdo al método descrito por Ruz *et al.* (2011), siendo luego determinado el Zn por espectrofotometría de absorción atómica (Smith *et al.* 1979, Ruz *et al.* 2011).

Para la evaluación de Zn en PBMC, las células fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L de agua desionizada y una alícuota de 10  $\mu$ L fue retirada para la determinación de proteínas. Los 90  $\mu$ L restantes fueron diluidos con la misma cantidad de HNO<sub>3</sub> e incubados a baño maría a 60 – 80°C durante 12 horas para su digestión. Finalmente, los PBMC digeridos fueron diluidos en agua desionizada y el Zn fue medido por espectrofotometría de absorción atómica.

Para la evaluación del EZP se preparó una solución stock de <sup>67</sup>Zn mediante disolución de <sup>67</sup>Zn en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M y neutralización con NH<sub>4</sub>OH hasta alcanzar pH 6,0. La solución stock fue luego diluida con solución salina estéril hasta alcanzar una concentración final de Zn de 1,5 mM y filtrada mediante el uso de un filtro de jeringa de 0,2  $\mu$ m. La solución final de <sup>67</sup>Zn fue analizada para detectar la presencia de pirógenos inmediatamente previo a su uso.

El análisis de isótopos estables de Zn fue realizado mediante espectrometría de masa con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) en un PlasmaQuad III (VG Elemental, Winsford, Reino Unido) en el Laboratorio de Nutrición del Departamento de Pediatría, Escuela de Medicina, Universidad de Colorado, Denver, de acuerdo a Miller *et al.* (1994).

La concentración de TBARS fue determinada de acuerdo al método descrito por Jo y Ahn (1998) y la concentración de glutatión total y reducido fue determinada de acuerdo al método descrito por Rahman *et al.* (2006). Tanto la actividad de glutatión peroxidasa como la concentración de 8-isoprostanos fueron determinadas mediante el uso de kits comerciales siguiendo las indicaciones de los fabricantes. En el caso de la determinación de actividad de glutatión peroxidasa, esta fue realizada mediante colorimetría (BioVision Incorporated, CA, Estados Unidos), mientras que la concentración plasmática de 8-isoprostanos fue determinada mediante EIA (Cayman Chemical Company, MI, Estados Unidos). En todos los casos salvo en la determinación de TBARS se utilizó un equipo Infinite® m200 Pro NanoQuant (Tecan, Männedorf, Suiza). Para la determinación de TBARS se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 de doble haz (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón).



El cálculo de la ingesta de Zn a partir de las encuestas alimentarias y registros de consumo de alimentos de tres días fue realizado utilizando el software Food Processor SQL (ESHA Research, OR, Estados Unidos).

El glucagón fue analizado mediante radioinmunoensayo (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Los Angeles, CA, USA) al ingreso y mediante enzimoimmunoensayo (RayBiotech Inc., Norcross, GA, USA) al término del periodo de suplementación debido a la discontinuación del kit de RIA utilizado en un inicio. La insulina fue determinada mediante radioinmunoensayo (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Los Angeles, CA, USA).

Para la expresión de *ZNT-8*, la extracción de RNA de células PBMC fue realizada utilizando TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, Estados Unidos) de acuerdo a las indicaciones del fabricante y el RNA extraído fue luego retrotranscrito a cDNA (Improm II™ reverse transcriptase, Promega Corporation, WI, Estados Unidos). La cuantificación relativa de la expresión de *ZNT-8* fue determinada mediante qPCR utilizando el kit Brilliant II SYBR Green (Agilent Technologies, CA, Estados Unidos) en un equipo Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, CA, Estados Unidos) y analizados mediante el software MxPro. Como normalizador se utilizó el gen de GAPDH. Las secuencias de los partidores utilizados fueron: GAPDH, F: 5'- AAT GGG CAG CCG TTA GGA AA -3', R: 5'- GCC CAA TAC GAC CAA ATC AGA G -3'; *ZNT-8*, F: 5'- AGC ATG CTG TCA CCT CTC AAT -3', R: 5'- AGG GAG AGA GAC ATC CGC AG -3'.

Todos los sujetos participantes fueron adecuadamente instruidos respecto de los potenciales riesgos y beneficios de participar en este estudio, debiendo firmar un consentimiento informado previo a su incorporación. Este estudio fue desarrollado de acuerdo a los principios éticos para la investigación en seres humanos provistos por la Declaración de Helsinki (World Medical Association 2013), contando con la aprobación del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características demográficas, antropométricas y de bioquímica clínica de los sujetos reclutados, tanto al inicio como al término del periodo de suplementación, se detallan en la Tabla 2. De los 36 sujetos reclutados inicialmente, tan sólo 28 completaron el periodo de estudio (ver Figura 2).

Respecto de los ocho sujetos que abandonaron el estudio, cuatro lo hicieron por motivos personales mientras que cuatro comenzaron terapia con inhibidores de DPP4. Ninguno de los voluntarios reportó la presencia de efectos secundarios durante el desarrollo del estudio ni tampoco al término del periodo de intervención.

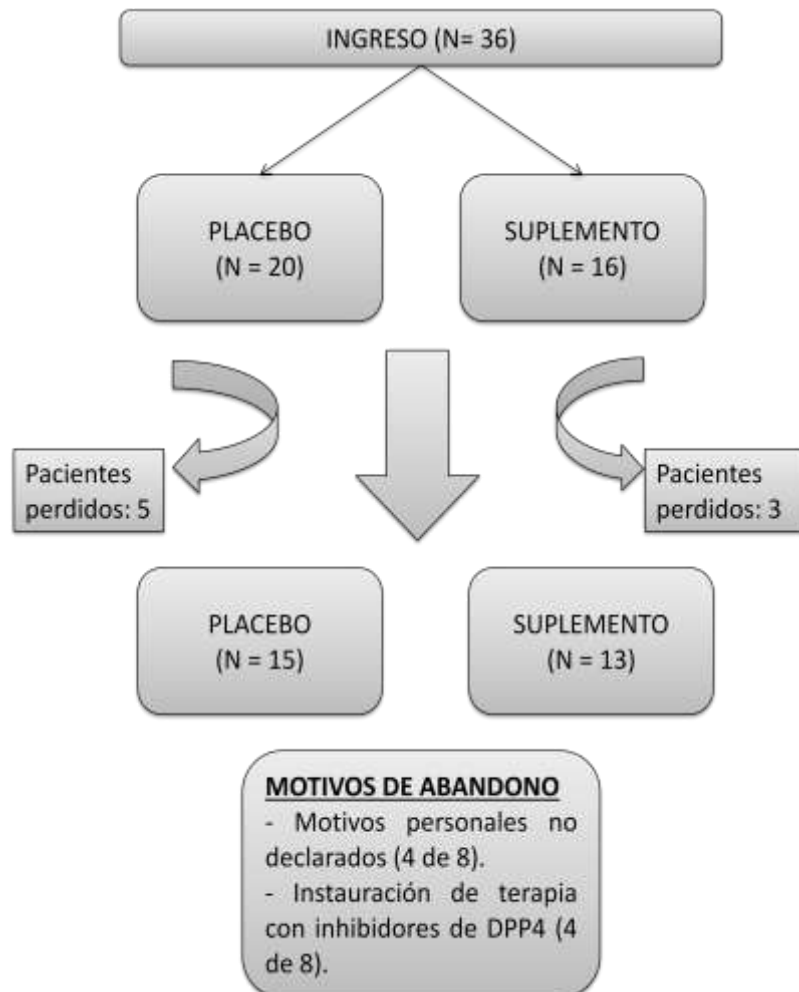


Figura 2: Número de voluntarios iniciales y al término del estudio.

Pese a que las características demográficas y de bioquímica clínica de ambos grupos al ingreso fueron similares, ambos grupos presentaron diferencias significativas al ingreso respecto de los valores de IMC (Figura 3) y de circunferencia de cintura (CC) (Figura 4), los cuales fueron más altos en el grupo suplementado. Esta diferencia se mantuvo a lo largo de todo el estudio.

En el caso de los años transcurridos desde el diagnóstico de DM2 también se observó una diferencia significativa entre los grupos placebo y suplemento la cual, sin embargo, sólo estuvo presente al término del estudio, siendo atribuida al efecto generado por los casos perdidos. En cuanto al impacto que esta diferencia puede tener, si bien la disfunción de la célula  $\alpha$  en la progresión de la DM2 no ha sido bien caracterizada, estudios llevados a cabo en pacientes con DM1 sugieren que los defectos en la secreción de glucagón aparecen precozmente luego del diagnóstico de ésta, aumentando con el tiempo. En este sentido, al menos tres estudios han observado un aumento significativo en la secreción de glucagón entre el ingreso y el año frente a una ingesta de comida mixta en pacientes con DM1 con menos de un año de diagnóstico (Brown *et al.* 2008, Sherr *et al.* 2014, Fredheim *et al.* 2015). A su vez, esta secreción mostró un aumento significativo a los cinco años respecto del ingreso y del año (Fredheim *et al.* 2015). Por otra parte, adicionalmente al exceso de glucagón secretado en respuesta a la ingesta, los defectos en la secreción de glucagón en pacientes con DM incluyen una respuesta disminuida a la hipoglicemia. En este caso, Siafarikas *et al.* compararon la respuesta a la hipoglicemia en 28 individuos con DM1 y 12 individuos controles mediante un clamp hipoglicémico hiperinsulinémico y observaron que los defectos en la respuesta de la célula  $\alpha$  a la hipoglicemia aparecieron con una mediana de tiempo de 8 meses desde el diagnóstico de DM1, siendo en algunos casos tan tempranos como un mes luego del diagnóstico (Siafarikas *et al.* 2012). En el caso de la DM2, al menos un estudio ha descrito que la secreción de glucagón se encuentra ya desregulada en individuos categorizados como prediabéticos (Calanna *et al.* 2014).

Respecto del control metabólico de los voluntarios durante el transcurso del estudio, no se observaron diferencias significativas en los valores de HbA1c entre ambos grupos, ya sea al comienzo o al término de éste. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas cuando se evaluó la diferencia entre grupos respecto del cambio absoluto en los valores de HbA1c entre el ingreso y el término del estudio (ver Figura 5). En cuanto a los valores de glicemia en ayunas, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tiempos evaluados.

Los resultados de HbA1c y glicemia en ayunas fueron inesperados, considerando que en al menos dos meta-análisis recientes, uno llevado a cabo exclusivamente en individuos con DM (Jayawardena *et al.* 2012) y otro en el cual se incluyeron estudios realizados en sujetos con DM, síndrome metabólico e individuos sanos (Capdor *et al.* 2013), han encontrado una disminución modesta pero significativa en la glicemia en ayunas en los individuos que han recibido suplementación con Zn y uno de ellos reportó además una disminución significativa en la concentración de HbA1c (Jayawardena *et al.* 2012),

aunque en el meta-análisis de Capdor igualmente se presentó una tendencia a la disminución de ésta.

Sin embargo, de acuerdo con Ruz *et al.* los efectos positivos de la suplementación con Zn sobre el control de la glicemia podrían ser dependientes de la presencia previa de deficiencia de Zn (Ruz *et al.* 2016), condición no observada en este estudio (ver Tabla 3) y que podría explicar la ausencia de efecto de la suplementación con Zn sobre la glicemia en ayunas. Hasta el momento no tenemos información de otro estudio en el cual la suplementación con Zn haya producido un aumento en la HbA1c, sin embargo, el pequeño tamaño de los grupos impide realizar correcciones por factores como tiempo de diagnóstico, IMC o CC, los cuales podrían actuar como fuentes de confusión. En este sentido, Yoshida *et al.* observaron en 7.726 japoneses (hombres y mujeres entre 50 y 74 años de edad) un aumento significativo en los niveles de HbA1c en la medida que aumentó la CC (Yoshida *et al.* 2009), mientras que Philipsen *et al.* recientemente reportaron una asociación entre distintos parámetros de obesidad, entre ellos CC, y HbA1c, según la cual el aumento en una desviación estándar en alguno de ellos se asoció con un aumento de 0,06 a 0,1% en HbA1c (Philipsen *et al.* 2015). En el caso de este estudio, no se puede descartar que la disminución de la CC observada en el grupo placebo esté asociada con un retraso en el deterioro de los niveles de HbA1c, efecto que sí se observó en el grupo suplementado. Sin embargo, debe considerarse la posibilidad de que la suplementación con Zn a largo plazo en pacientes con DM2 bien controlados (como los reclutados en este estudio) pueda tener efectos no deseados en el control de la glicemia, con el consiguiente aumento en el riesgo de desarrollo de comorbilidades.

En cuanto a los valores de lípidos plasmáticos, en este estudio se consideraron dentro de los criterios de exclusión la presencia de valores de colesterol total iguales o superiores a 240 mg/dL y de triglicéridos plasmáticos iguales o superiores a 200 mg/dL, utilizando como puntos de corte valores considerados de alto riesgo cardiovascular de acuerdo a la definición presentada por el estudio ATP III (National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) 2002). De este modo, ambos grupos presentaron valores promedios de colesterol total y de triglicéridos plasmáticos considerados deseables, mientras que los niveles de colesterol LDL fluctuaron entre deseables y ligeramente elevados y los de colesterol HDL estuvieron ligeramente reducidos al término del estudio en ambos grupos. En cuanto a la comparación de los valores de lípidos plasmáticos entre ambos, éstos presentaron valores similares tanto de colesterol total, HDL, LDL y VLDL, así como de triglicéridos plasmáticos ( $P > 0,05$  en todos los casos) tanto al inicio como al término del estudio.

Sobre el efecto de la suplementación con Zn en los valores de lípidos plasmáticos, se observó una diferencia significativa entre los grupos control y suplementado en cuanto al cambio en la concentración de colesterol HDL entre el ingreso y el término de la intervención (ver Figura 6), presentándose una mayor disminución de este parámetro en el grupo que recibió el suplemento. Este resultado se contrapone también a los resultados de dos meta-análisis recientes, en los cuales la suplementación con Zn se ha

asociado con un aumento en el colesterol HDL en pacientes con DM2 (Foster *et al.* 2010) o en sujetos considerados “no sanos” (incluyendo pacientes con DM, degeneración macular, enfermedad de Wilson, enfermedad renal en etapa de diálisis, cáncer intestinal, obesidad o enfermedad cardíaca isquémica) (Ranasinghe *et al.* 2015). Adicionalmente, Ranasinghe *et al.* observaron una disminución significativa en los valores de colesterol total, LDL y triglicéridos plasmáticos en los análisis que incluyeron a todos los sujetos, efecto que fue mayor para todos los parámetros cuando se analizaron específicamente a los sujetos “no sanos” y que perdió significación o disminuyó su magnitud en los sujetos sanos. Estos efectos no fueron observados en este estudio.

Una posible explicación de las diferencias observadas en este estudio dice relación con el adecuado control de la enfermedad presente en estos participantes. En este sentido, tanto en el meta-análisis de Foster *et al.* como en el de Ranasinghe *et al.* se describe que al realizar los análisis por grupo, los individuos sanos que recibieron suplementación con Zn presentaron una reducción significativa en sus niveles de colesterol HDL (Foster *et al.* 2010, Ranasinghe *et al.* 2015).

Al igual que en el caso de la HbA1c, debe evaluarse esta información considerando la posibilidad de que la suplementación con Zn tenga efectos no deseados en los valores de colesterol HDL en individuos con DM2 bien controlada, lo cual podría aumentar el riesgo cardiovascular.

Finalmente, los niveles de fosfatasa alcalina (FA) presentaron un aumento al término del estudio en el grupo suplementado, aunque no se observaron diferencias significativas en los valores de cada tiempo entre los grupos control y suplemento. Sí se observaron en cambio diferencias significativas cuando el análisis se realizó respecto de la diferencia entre los valores de FA plasmática entre el ingreso y el año para ambos grupos.

La FA es una glicoproteína de membrana capaz de hidrolizar ésteres de monofosfatos y cuyo pH óptimo, como su nombre lo indica, se encuentra en el rango de los pH alcalinos. Existen varias isoformas de FA: intestinal, placentaria, de línea germinal e inespecífica, la cual es producida en hígado, hueso y riñón. Su función es poco conocida aunque en el caso de la isoforma ósea se especula participa en la mineralización del hueso (Sharma *et al.* 2014).

La FA es considerada una metaloenzima, debido a que para su actividad requiere de la presencia de dos iones  $Zn^{2+}$  y un ion  $Mg^{2+}$  en su sitio activo (Sharma *et al.* 2014). Por este motivo, al igual que otras metaloenzimas dependientes de Zn, ha sido estudiada como potencial biomarcador del estado nutricional de éste. Hasta el momento no se ha logrado establecer una relación directa entre estado nutricional de Zn y concentración de enzimas Zn-dependientes, por lo que no se recomienda su uso (King *et al.* 2016). En este sentido, un meta-análisis realizado por Lowe *et al.* en el cual se evaluaron distintos candidatos a biomarcadores de estado nutricional de Zn observó que la suplementación con Zn no mostró efectos concluyentes sobre la concentración de esta enzima (Lowe *et*

*al.* 2009). Adicionalmente, existen una serie de condiciones patológicas en las cuales la concentración de esta enzima se puede presentar alterada (Sharma *et al.* 2014).

Pese a esto, los resultados observados en este estudio sugieren que la concentración de FA plasmática responde a la suplementación con Zn, al menos de largo plazo, requiriendo este aspecto de mayores estudios.

Tabla 2 - Características demográficas, antropométricas y bioquímicas de los sujetos al inicio y término del periodo de suplementación. Los valores se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar o como mediana [Q1 – Q3].

	Ingreso			Post-Suplementación			P ( $\Delta$ ingreso-término)
	Placebo	Suplemento	P	Placebo	Suplemento	P	
N	20	16	-	15	13	-	-
Edad al ingreso (años)	56,0 [51,0 – 62,0]	55,5 [53,3 – 63,0]	0,765 <sup>1</sup>	56,0 [51,0 – 62,0]	55,0 [53,5 – 60,0]	0,982 <sup>1</sup>	-
Sexo (mujeres/hombres)	8/12	10/6	0,180 <sup>2</sup>	6/9	9/4	0,122 <sup>2</sup>	-
Años de diagnóstico al ingreso	5,0 [2,0 – 7,0]	2,5 [1,0 – 6,0]	0,175	5,0 [2,0 – 7,0]	2,0 [1,0 – 5,5]	0,041 <sup>1</sup>	-
ALT (U/L)	34,4 $\pm$ 15,1	29,8 $\pm$ 12,2	0,479 <sup>1</sup>	33,7 $\pm$ 23,2	37,8 $\pm$ 26,5	0,629 <sup>1</sup>	0,197 <sup>1</sup>
AST (U/L)	24,0 $\pm$ 9,9	21,0 $\pm$ 6,4	0,459 <sup>1</sup>	24,0 $\pm$ 12,3	25,0 $\pm$ 9,6	0,269 <sup>1</sup>	0,210
FA (U/L)	190,2 $\pm$ 59,4	187,3 $\pm$ 43,3	0,871	190,3 $\pm$ 54,6	224,2 $\pm$ 58,2	0,125	0,016
GGT (U/L)	27,2 $\pm$ 18,8	31,5 $\pm$ 17,0	0,211 <sup>1</sup>	25,5 $\pm$ 9,2	37,4 $\pm$ 32,6	0,333 <sup>1</sup>	0,817 <sup>1</sup>
Bilirrubina total (mg/dL)	0,54 $\pm$ 0,40	0,45 $\pm$ 0,22	0,814 <sup>1</sup>	0,45 $\pm$ 0,16	0,37 $\pm$ 0,11	0,160	0,861
Bilirrubina directa (mg/dL)	0,14 $\pm$ 0,08	0,14 $\pm$ 0,07	0,671 <sup>1</sup>	0,16 $\pm$ 0,09	0,13 $\pm$ 0,03	0,835 <sup>1</sup>	0,644 <sup>1</sup>
Bilirrubina indirecta (mg/dL)	0,40 $\pm$ 0,35	0,31 $\pm$ 0,16	0,741 <sup>1</sup>	0,29 $\pm$ 0,12	0,24 $\pm$ 0,10	0,257	0,796
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,88 $\pm$ 0,16	0,90 $\pm$ 0,16	0,798	0,82 $\pm$ 0,14	0,87 $\pm$ 0,17	0,397	0,176
TFG	99,2 $\pm$ 21,4	97,8 $\pm$ 24,1	0,694 <sup>1</sup>	105,6 $\pm$ 19,8	100,2 $\pm$ 22,1	0,503	0,148
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,6 $\pm$ 3,4	30,8 $\pm$ 3,2	0,008	26,8 $\pm$ 3,6	31,4 $\pm$ 3,4	0,002	0,118

	Ingreso			Post-Suplementación			P ( $\Delta$ ingreso-término)
	Placebo	Suplemento	P	Placebo	Suplemento	P	
Circunferencia de cintura (cm)	94,3 $\pm$ 9,3	100,1 $\pm$ 6,2	0,040	91,4 $\pm$ 9,7	99,9 $\pm$ 6,2	0,011	0,064
Glicemia en ayunas (mg/dL)	127,9 $\pm$ 20,9	125,7 $\pm$ 21,4	0,762	126,7 $\pm$ 30,5	131,2 $\pm$ 22,5	0,661	0,299 <sup>1</sup>
Hb A1c (%)	6,6 $\pm$ 0,6	6,4 $\pm$ 0,6	0,176	6,6 $\pm$ 0,8	6,8 $\pm$ 0,6	0,419 <sup>1</sup>	0,014 <sup>1</sup>
Colesterol total (mg/dL)	169,6 $\pm$ 31,5	160,5 $\pm$ 27,0	0,366	189,6 $\pm$ 30,7	165,7 $\pm$ 34,3	0,062	0,257
Colesterol HDL (mg/dL)	40,1 $\pm$ 8,5	39,3 $\pm$ 12,0	0,539 <sup>1</sup>	38,0 $\pm$ 8,8	34,2 $\pm$ 8,9	0,213 <sup>1</sup>	0,049
Colesterol LDL (mg/dL)	108,6 $\pm$ 27,0	97,5 $\pm$ 30,4	0,251	126,8 $\pm$ 29,6	107,5 $\pm$ 34,4	0,122	0,672
Colesterol VLDL (mg/dL)	20,9 $\pm$ 6,8	23,8 $\pm$ 7,7	0,251	24,8 $\pm$ 8,6	24,0 $\pm$ 7,4	0,809	0,281
Relación Col. total/HDL	4,4 $\pm$ 0,9	4,4 $\pm$ 1,6	0,846	5,2 $\pm$ 1,3	5,1 $\pm$ 1,8	0,595 <sup>1</sup>	0,931
Triglicéridos plasmáticos (mg/dL)	104,7 $\pm$ 34,3	118,9 $\pm$ 38,3	0,249	123,8 $\pm$ 42,9	120,1 $\pm$ 36,9	0,811	0,281

Diferencias entre tratamientos fueron analizadas mediante prueba de t de Student para muestras independientes salvo que se indique otra cosa.

<sup>1</sup> Prueba de la U de Mann-Whitney

<sup>2</sup> Prueba de X<sup>2</sup>



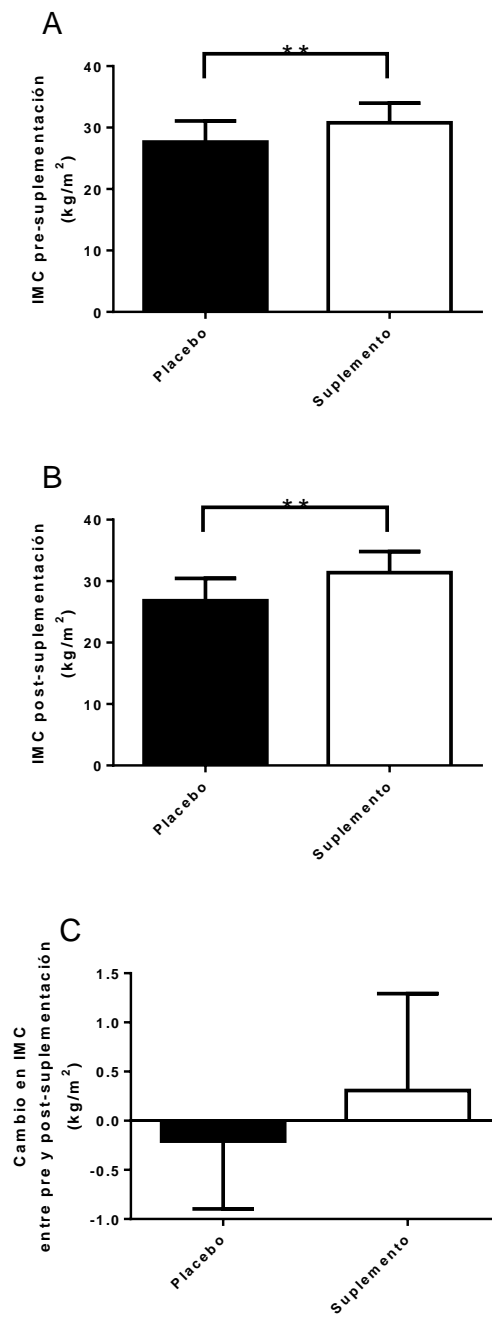


Figura 3: A) IMC pre-suplementación, B) IMC post-suplementación, C) Cambio en IMC entre pre y post-suplementación. \*\*  $p < 0,01$ .

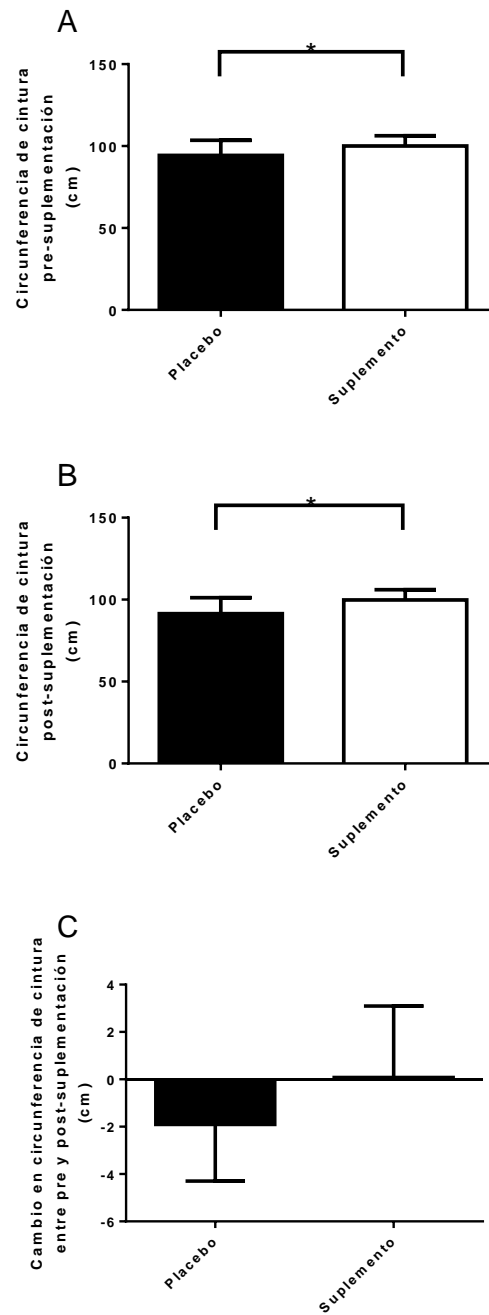


Figura 4: A) Circunferencia de cintura pre-suplementación, B) circunferencia de cintura post-suplementación, C) cambio en circunferencia de cintura entre pre y post-suplementación. \*  $p < 0,05$ .

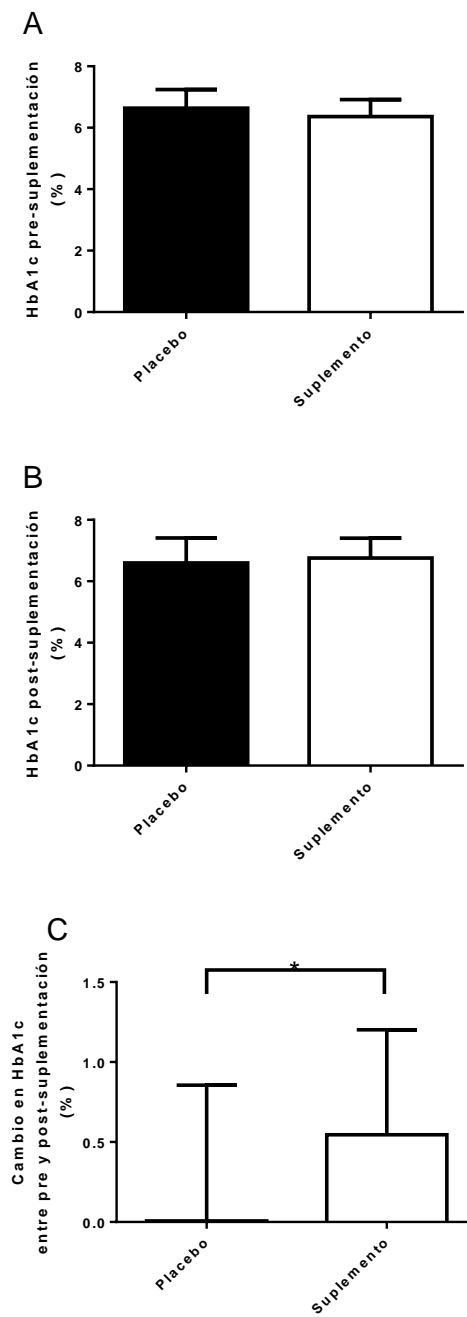


Figura 5: A) HbA1c pre-suplementación, B) HbA1c post-suplementación, C) cambio en HbA1c entre pre y post-suplementación. \*  $p < 0,05$ .

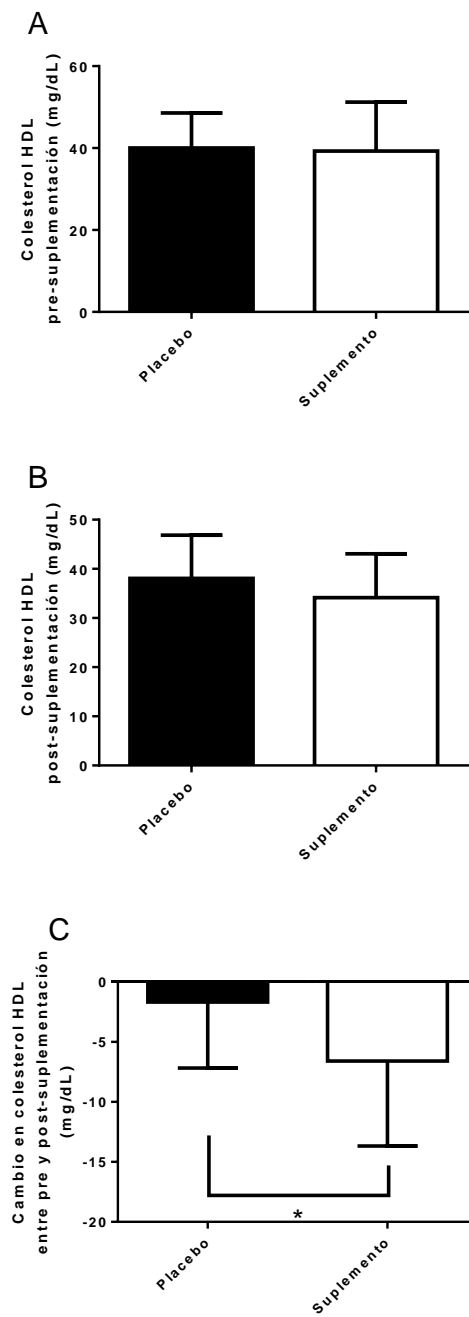


Figura 6: A) Colesterol HDL pre-suplementación, B) colesterol HDL post-suplementación, C) cambio en colesterol HDL entre pre y post-suplementación. \*  $p < 0,05$ .

### *Ingesta y estado nutricional de Zn*

Los valores de ingesta de Zn así como los de los distintos indicadores de estado nutricional de Zn evaluados al ingreso y post intervención se presentan en la Tabla 3.

Como se puede apreciar, la ingesta de Zn no presentó diferencias significativas al ingreso entre ambos grupos (ver Figura 7), siendo en ambos casos inferior a lo recomendado (RDA mujeres > 19 años, 8 mg/d; RDA hombres > 19 años, 11 mg/d) (King *et al.* 2016). Mientras que en el caso del grupo control la ingesta de Zn se mantuvo insuficiente al término del estudio, en el grupo suplementado ésta aumentó como efecto de la intervención, encontrándose al término del estudio dentro de rangos considerados adecuados. Valores de ingesta de Zn similares a los observados en este estudio fueron reportados previamente por Olivares *et al.*, quienes dan cuenta de una alta prevalencia de deficiencia en la ingesta de Zn en el Gran Santiago (Olivares *et al.* 2004).

La evaluación del estado nutricional de Zn mediante el uso de distintos indicadores mostró resultados dispares. Pese a que tanto el grupo control como el grupo suplementado presentaron deficiencias en la ingesta de Zn, ambos grupos presentaron valores de Zn plasmático dentro del rango considerado adecuado, mostrando este indicador una baja sensibilidad frente a deficiencias moderadas en la ingesta. Esta afirmación es apoyada a su vez por el hecho de que la gran diferencia en la ingesta de Zn observada entre ambos grupos al término de la intervención no se vio reflejada en diferencias significativas en los valores de Zn plasmático ni tampoco al comparar el cambio en los valores de este indicador entre el ingreso y el año entre ambos grupos (ver Figura 8).

En el caso del Zn en pelo no se observaron diferencias significativas entre los grupos control y suplementado al término del periodo de intervención ni tampoco al comparar el cambio en la concentración de Zn en pelo entre el ingreso y el término de la suplementación. Cabe destacar el bajo número de sujetos que pudieron ser evaluados al término del estudio (seis y ocho personas de los grupos control y suplemento, respectivamente; correspondiendo la mayor proporción a mujeres), debido a la escasa cantidad de pelo disponible en gran parte de los voluntarios.

En el caso del EZP, el valor de éste al término del estudio sí fue significativamente más alto en el grupo suplementado que en el grupo que recibió el placebo, diferencia que también se observó al evaluar el cambio en los valores de EZP entre el ingreso y el término del periodo de intervención entre ambos grupos, reflejando de mejor manera las diferencias en la ingesta (ver Figura 9).

Finalmente, en el caso del Zn en PBMC tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos control y suplemento al ingreso o al término del periodo de suplementación, así como tampoco se observaron cuando se compararon entre ambos los valores de cambio entre el ingreso y el término de la intervención.

El análisis de las correlaciones observadas entre los distintos indicadores de estado nutricional de Zn con la ingesta de Zn previo a la suplementación se presenta en la Tabla 4. Como se puede observar, no se encontraron correlaciones significativas entre la ingesta de Zn y ninguno de los indicadores de estado nutricional de Zn evaluados, así como tampoco se encontraron asociaciones entre uno y otro indicador de estado nutricional de Zn. Considerando que sólo la transformación logarítmica del EZP presentó diferencias significativas al término del periodo de suplementación entre ambos grupos, se realizó un análisis de regresión lineal simple considerando la suplementación como variable independiente, la cual arrojó un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) ajustado de 0,466. De este modo, la suplementación con Zn no alcanza a explicar ni siquiera el 50% de la variación observada en el único indicador de estado nutricional de Zn que presentó diferencias significativas al término de la intervención.

A la fecha, varias revisiones han abordado el tema de los indicadores de estado nutricional de Zn en la búsqueda de sistematizar la información existente y de proponer alternativas a los indicadores actualmente en uso, de manera de mejorar la sensibilidad y especificidad de la determinación (Wood 2000, de Benoist *et al.* 2007, Gibson *et al.* 2008, Lowe *et al.* 2009, King 2011, King *et al.* 2016, Lowe 2016). Sin embargo, hasta ahora los únicos indicadores aceptados por la comunidad científica siguen siendo la ingesta de Zn, el Zn sérico o plasmático y el crecimiento en respuesta a la suplementación en niños, utilizado como indicador funcional (de Benoist *et al.* 2007, King *et al.* 2016). Pese a esto, en el caso del Zn plasmático la recomendación de uso es a nivel poblacional y no individual, presentando su aplicación a nivel individual varias limitantes para la detección de deficiencias marginales de Zn (King 1990), tal como se observó en este estudio. En el caso del crecimiento en respuesta a la suplementación, además de ser éste un indicador de tipo poblacional y restringido exclusivamente a niños, debe ir acompañado de la evaluación de indicadores bioquímicos de estado nutricional de Zn (King *et al.* 2016).

Uno de los biomarcadores de estado nutricional de Zn considerado prometedor es el EZP (Lowe *et al.* 2009, King *et al.* 2016), el cual puede ser definido como la cantidad de Zn que se intercambia completamente con el Zn plasmático en dos días y que se estima representa menos del 10% del total de Zn corporal (Miller *et al.* 1994). Considerando que el Zn requerido para funciones catalíticas y de señalización debe estar disponible rápidamente, se especula que esta fracción del Zn corporal sería responsable de varias de las funciones fisiológicas de este mineral (Miller *et al.* 1994). Mientras que se estima que los cambios en Zn plasmático podrían ser un buen indicador del cambio en el pool de intercambio rápido de Zn cuando las condiciones de deficiencia son tan severas que se sobrepasan los mecanismos encargados de la homeostasis de este mineral (King 1990), el uso de isótopos estables provee de un método relativamente sencillo para estimar el tamaño del pool de intercambio rápido de Zn en condiciones de normalidad (Miller *et al.* 1994). Respecto de su utilidad como indicador de estado nutricional de Zn, si bien se ha observado que éste se correlaciona con la ingesta, el número de estudios disponibles al respecto aún es insuficiente para establecer valores de referencia para este indicador o para determinar si cambios en el EZP se correlacionan también con

modificaciones en las funciones metabólicas dependientes de Zn (King *et al.* 2016). De acuerdo a lo observado en este estudio, pese a que el EZP fue el único indicador bioquímico de Zn que reflejó la diferencia en la ingesta de este mineral entre los grupos control y suplemento al término del estudio, éste careció de la sensibilidad necesaria para detectar el aumento en el estado nutricional de Zn del grupo que recibió la suplementación.

En el caso del Zn en pelo, éste ha sido reconocido recientemente por el panel de expertos en Zn de la iniciativa BOND (*Biomarkers of Nutrition for Development*) como un buen potencial biomarcador de estado nutricional de Zn (King *et al.* 2016). Fisiológicamente, el Zn es captado por el pelo durante su fase de formación en el folículo piloso a partir del Zn circulante, quedando recluido en su interior al momento de la queratinización. De este modo, a diferencia del Zn plasmático o del EZP, su medición representa el estado nutricional de Zn de aproximadamente cuatro a ocho semanas antes del momento de la toma de muestra, que es el tiempo aproximado que tarda en crecer uno o dos centímetros de pelo desde la superficie del cuero cabelludo (King *et al.* 2016). A diferencia de las conclusiones presentadas por los expertos de la iniciativa BOND, los resultados en este estudio sugieren que el Zn en pelo es poco sensible frente a modificaciones de la ingesta de Zn, respondiendo de forma errática frente a la suplementación.

En el caso del Zn en PBMC, la mayoría de los autores concuerdan en que este no refleja cambios en la ingesta, por lo que no cumple con los requisitos necesarios para ser considerado un biomarcador de estado nutricional de Zn (Gibson *et al.* 2008, Lowe *et al.* 2009, King *et al.* 2016). Los resultados de este estudio se encuentran en línea con lo anterior, observándose una ausencia de respuesta a la suplementación.

La ausencia de un indicador sensible y específico para el estado nutricional de Zn se explica en parte por las características nutricionales propias de este mineral. El Zn es considerado un nutriente tipo 2, los cuales se caracterizan por participar en múltiples funciones metabólicas y carecer de reservas orgánicas adecuadas para soportar una deficiencia de más de un par de días. A diferencia de los nutrientes tipo 1, en los cuales la deficiencia genera una disminución en la actividad de una o más vías metabólicas específicas y ocasiona signos clínicos claramente reconocibles, en el caso de los nutrientes tipo 2 la deficiencia genera una rápida disminución de las pérdidas endógenas junto con la disminución de la actividad metabólica de las vías de más alta demanda, siendo los signos clínicos de deficiencia de tipo inespecíficos (King 2011).

Cabe destacar también que no necesariamente un indicador de estado nutricional de Zn se correlaciona adecuadamente con cambios en los efectos fisiológicos de este mineral, lo cual se explica por la diversidad de funciones en las que éste participa. En este mismo sentido, King plantea que aunque la búsqueda de un indicador de estado nutricional de Zn se ha enfocado tradicionalmente en que este refleje los cambios en la ingesta, los estudios a nivel de metabolismo celular sugieren que los cambios en las funciones fisiológicas relacionadas con el Zn se encuentran más bien ligadas a fluctuaciones

intracelulares de este mineral, las cuales no necesariamente se correlacionan con cambios en la ingesta (King 2011).



Tabla 3 – Estado nutricional de Zn al ingreso y al cabo de un año de suplementación. Los valores se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar o como mediana [Q1 – Q3].

	Ingreso			Post-suplementación			P ( $\Delta$ ingreso-término)
	Placebo	Suplemento	P	Placebo	Suplemento	P	
Ingesta de zinc (mg/d)	4,1 [3,0 – 7,7]	5,6 [3,2 – 8,3]	0,723 <sup>1</sup>	5,0 [4,3 – 6,1]	34,1 [32,7 – 35,3]	< 0,001 <sup>2</sup>	< 0,001
N	18	16		11	10		
Zinc plasmático ( $\mu$ g/dL)	89,5 $\pm$ 8,4	88,8 $\pm$ 9,5	0,828	81,6 $\pm$ 10,4	85,5 $\pm$ 10,4	0,329	0,433
N	20	16		15	13		
Zinc en pelo ( $\mu$ g/g)	156,5 $\pm$ 56,2	141,6 $\pm$ 20,7	0,396	139,0 $\pm$ 47,4	108,6 $\pm$ 11,9	0,103	0,897 <sup>2</sup>
N	13	9		6	8		
Zinc en PBMC ( $\mu$ g/g de proteína)	1,32 [0,98 – 1,69]	1,20 [0,88 – 1,70]	0,766 <sup>2</sup>	0,71 [0,48 – 0,87]	0,81 [0,71 – 0,97]	0,053	0,790 <sup>2</sup>
N	19	16		15	13		
EZP (mg)	167,7 $\pm$ 28,6	161,8 $\pm$ 26,4	0,523	138,8 $\pm$ 23,2	205,4 $\pm$ 51,8	0,003 <sup>1</sup>	0,003
N	20	16		8	7		

Diferencias entre tratamientos fueron analizadas utilizando la prueba de t de Student para muestras independientes salvo que se indique otra cosa.

<sup>1</sup> Prueba de t sobre variable normalizada mediante transformación logarítmica en base e.

<sup>2</sup> Prueba de la U de Mann-Whitney

Tabla 4 – Coeficientes de Correlación de Pearson (r) o Spearman ( $\rho$ ) al ingreso entre ingesta de Zn e indicadores de estado nutricional de Zn.

	Zn plasmático ( $\mu\text{g/dL}$ )	Zn en pelo ( $\mu\text{g/g}$ )	Zn en PBMC ( $\mu\text{g/g}$ de proteína)	EZP (mg)
Ingesta de Zn (mg/d)	$\rho = -0,296$	$\rho = 0,084$	$\rho = -0,160$	$\rho = 0,080$
N	34	21	33	34
Zn plasmático ( $\mu\text{g/dL}$ )		$\rho = -0,277$	$\rho = -0,042$	$r = -0,058$
N		22	35	36
Zn en pelo ( $\mu\text{g/g}$ )			$\rho = 0,174$	$\rho = 0,110$
N			22	22
Zn en PBMC ( $\mu\text{g/g}$ de proteína)				$\rho = 0,092$
N				35

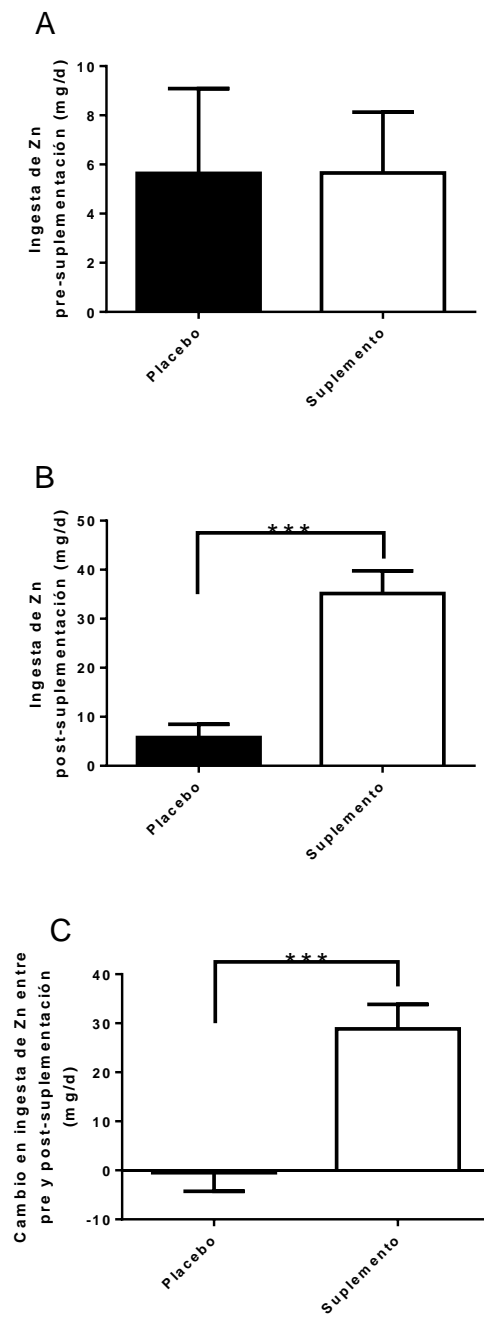


Figura 7: A) Ingesta de Zn pre-suplementación, B) Ingesta de Zn post-suplementación, C) Cambio en la ingesta de Zn entre pre y post-suplementación. \*\*\*  $p < 0,001$ .

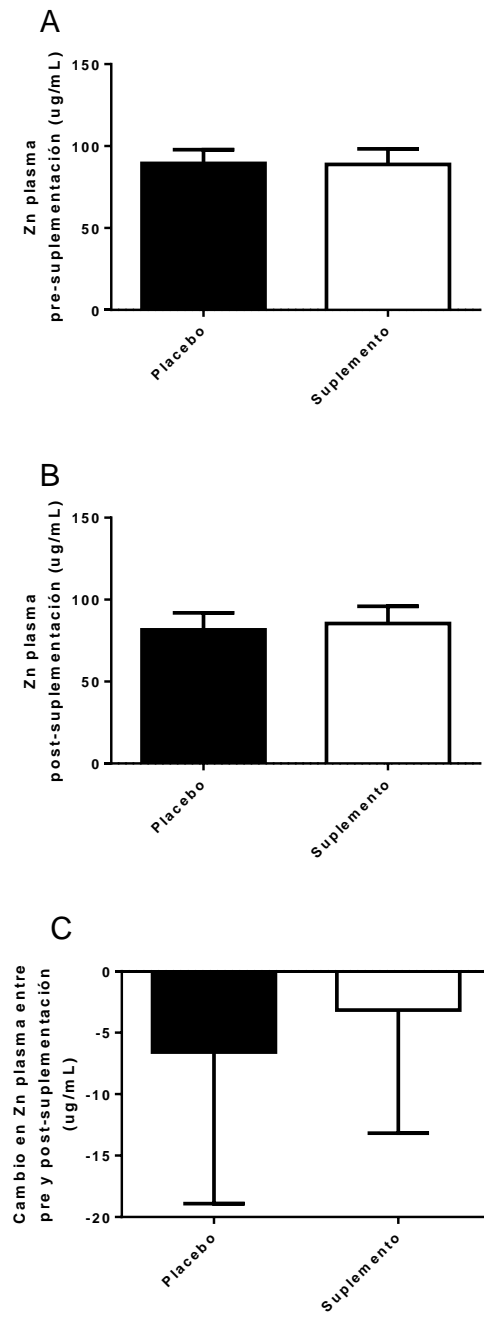


Figura 8: A) Zn plasmático pre-suplementación, B) Zn plasmático post-suplementación, C) Cambio en Zn plasmático entre pre y post-suplementación.

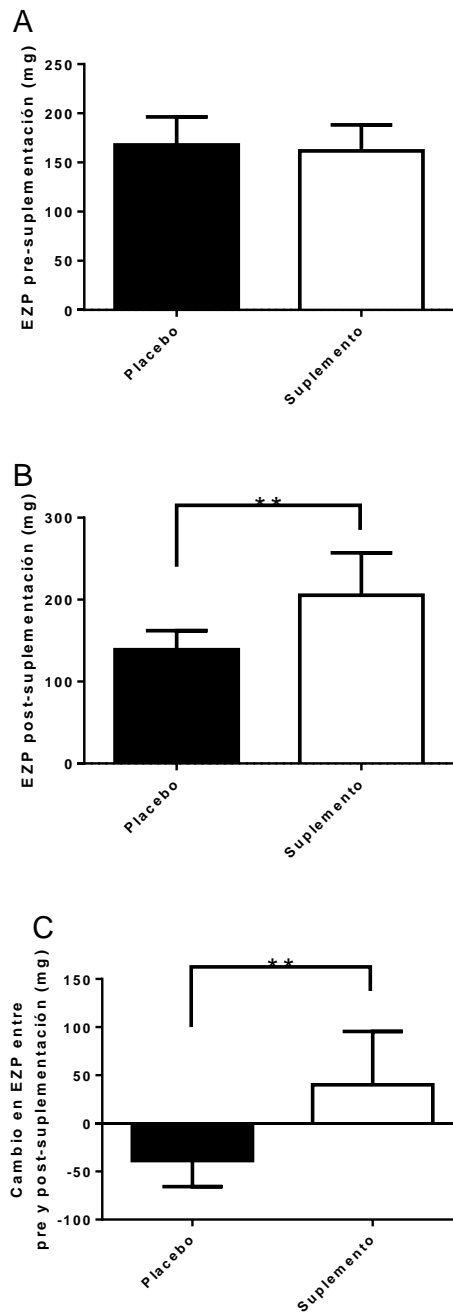


Figura 9: A) Pool de intercambio rápido de Zn pre-suplementación, B) Pool de intercambio rápido de Zn post-suplementación, C) Cambio en el pool de intercambio rápido de Zn entre pre y post-suplementación. \*\*  $p < 0,01$ .

### *Expresión de ZNT-8*

Los resultados de expresión de *ZNT-8* en PBMC al ingreso y al año se presentan en la Tabla 5. Tanto al ingreso como al año, la expresión de *ZNT-8* se observó en alrededor del 50% de los pacientes evaluados (17 de 35 individuos al ingreso, equivalentes al 49% de los sujetos evaluados, y 15 de 27 individuos al año, equivalentes al 56%), lo cual concuerda con los resultados de estudios realizados por Foster *et al.*, quienes observaron que la expresión de *ZNT-8* en PBMC es variable, no presentándose en todos los individuos (Foster *et al.* 2011, 2013).

Al comparar el nivel de expresión de *ZNT-8* entre los grupos que recibieron placebo y suplemento, no se observaron diferencias significativas en la expresión de éste ni al comienzo ni al término de la intervención (teniendo en consideración el bajo número de individuos que expresaron el transportador). Del mismo modo, no se observaron diferencias en cuanto al cambio en la expresión de *ZNT-8* entre el ingreso y el término de la suplementación al comparar ambos grupos. Cabe mencionar, sin embargo, que tan sólo cinco individuos del grupo control y cuatro individuos del grupo suplementado expresaron *ZNT-8* al ingreso y luego de la intervención. De este modo, aunque el grupo que recibió suplementación presentó un aumento importante en la expresión de *ZNT-8* al término del estudio (ver Figura 10), el número de individuos incluidos en el análisis fue muy pequeño para determinar si este cambio fue significativo.

De acuerdo a la información encontrada en la literatura, al parecer la concentración intracelular de Zn en células  $\beta$  pancreáticas modificaría la expresión de *ZNT-8*. En este sentido, Lefebvre *et al.* observaron que la depleción de Zn inducida mediante la adición de TPEN (N,N,N',N'-Tetrakis-(2-pyridilmethyl) ethylenediamine, 20  $\mu$ M por 18 horas) en islotes pancreáticos humanos aislados produjo una disminución en la expresión de *ZNT-8* de un 74%, sin alterar la expresión de otros transportadores evaluados (*ZNT-1*, *ZNT-5* y *ZNT-6*), mientras que Nygaard *et al.* observaron en cultivos estáticos de células INS-1E (línea celular  $\beta$  pancreática de rata) que tanto la suplementación del medio de cultivo con Zn como la quelación de Zn mediante el uso de TPEN, modificaron los niveles de expresión de *znt-8* (Lefebvre *et al.* 2012, Nygaard *et al.* 2014). Los resultados de este estudio, si bien no mostraron diferencias significativas, sugieren que la suplementación con Zn tuvo algún grado de efecto sobre la expresión de *ZNT-8* en células PBMC. Sin embargo, es importante considerar que los estudios antes descritos fueron realizados modificando directamente la concentración de Zn intracelular en células  $\beta$  pancreáticas mientras que en este estudio la expresión de *ZNT-8* fue evaluada en células PBMC como indicador de expresión en células  $\beta$ . En este sentido, los resultados observados en células PBMC en cuanto a modificaciones en la expresión génica no necesariamente replican las modificaciones que se producen a nivel de tejidos específicos. Aunque la información existente al respecto es escasa, Witt *et al.* compararon mediante un análisis de genoma completo (*Genome Wide Microarray*) la expresión de 29.215 genes en sangre completa, hipocampo y corteza prefrontal de ratas, observando una expresión de genes compartida entre sangre y un tipo de tejido cerebral de tan sólo un 56,8%, mientras que esta cifra alcanzó el 55,3% cuando se evaluó la

expresión compartida entre sangre y ambos tejidos cerebrales (Witt *et al.* 2013). Respecto de estudios que hayan evaluado el cambio en la expresión de genes específicos en múltiples tejidos cuando éstos han sido expuestos a un estímulo, no existe información. Otra diferencia importante de destacar entre este estudio y los estudios mencionados anteriormente es que mientras estos indujeron cambios en el estado intracelular de Zn en las células  $\beta$  pancreáticas mediante la suplementación o quelación directa de éste, la evaluación de la concentración intracelular de Zn en PBMC no reflejó cambios entre el ingreso y el término de la suplementación ni tampoco presentó diferencias al término del estudio entre ambos grupos, de modo que el estímulo evaluado en los estudios de Lefebvre *et al.* y de Nygaard *et al.* no coinciden con lo sucedido en este estudio.

Tabla 5 - Expresión de *ZNT-8* en PBMC al ingreso y post suplementación. Los datos se presentan como mediana [Q1 – Q3].

	Placebo	Suplemento	P
Expresión relativa de <i>ZNT-8</i> al ingreso	0,17 [0,09 – 0,42]	0,29 [0,14 – 0,43]	0,499
N	9	8	
Expresión relativa de <i>ZNT-8</i> post-suplementación	1,12 [0,01 – 1,37]	1,32 [0,09 – 2,07]	0,315
N	9	6	
$\Delta$ Expresión relativa de <i>ZNT-8</i> (ingreso-término)	0,98 [-3,14 – 1,61]	1,09 [0,27 – 2,69]	0,327
N	5	4	

Diferencias entre grupos fueron analizadas mediante prueba de la U de Mann-Whitney.



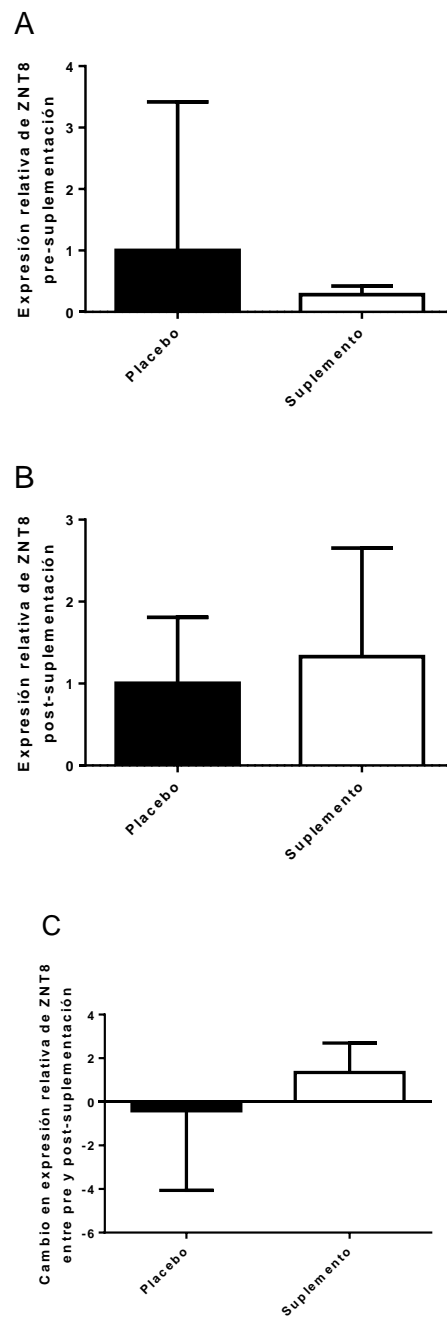


Figura 10: A) Expresión relativa de ZNT8 en PBMC pre-suplementación, B) Expresión relativa de ZNT8 en PBMC post-suplementación, C) Cambio en expresión relativa de ZNT8 en PBMC entre pre y post-suplementación.

*Efecto de la suplementación con Zn sobre la secreción de glucagón, relación con la glicemia y relación con la concentración plasmática de insulina*

Los valores de glucagón plasmático observados durante la FSIVGTT al ingreso y al término de la suplementación se presentan separadamente en la Tabla 6 y Tabla 9, respectivamente, debido a que entre ambas mediciones el kit utilizado para la determinación de glucagón fue descontinuado, debiendo ser reemplazado. Esto trajo como consecuencia una modificación tanto en el método de determinación de glucagón (RIA vs. EIA) como en la empresa fabricante del kit, por lo que los valores obtenidos en ambas determinaciones no fueron comparados. En este sentido, diversos estudios muestran que la sensibilidad y especificidad de los distintos kits comerciales para determinación de glucagón difieren (Bak *et al.* 2014, Wewer Albrechtsen *et al.* 2014, Wewer Albrechtsen *et al.* 2016), siendo ésta una de las principales dificultades al momento de interpretar los resultados en función de los datos presentes en la literatura. Los valores de glicemia, insulina plasmática y relación insulina/glucagón obtenidos en los mismos tiempos de la FSIVGTT que el glucagón, se presentan en la Tabla 7 y Tabla 10.

Como se puede apreciar en la Tabla 6, la secreción de glucagón al ingreso disminuyó significativamente luego de la infusión de glucosa e insulina, sin presentarse diferencias significativas entre ambos grupos. La adecuada supresión del glucagón en respuesta a ambos estímulos sugiere que al momento del ingreso los pacientes reclutados no presentaban un deterioro significativo en la capacidad de respuesta de estas células, lo cual, debido a la ausencia de pacientes controles sanos, no pudo ser confirmado. De la misma forma, la ausencia de controles sanos impide saber si es que al momento del ingreso los pacientes presentaban o no el estado de hiperglucagonemia absoluta o relativa descrito en la literatura (ver *Desregulación de la Secreción de Glucagón en la Diabetes Mellitus*).

En el caso de la glicemia en ayunas, ésta se presentó en promedio ligeramente por sobre los niveles considerados por la ADA como prediabetes (American Diabetes Association 2016), lo cual sumado a los bajos niveles de HbA1c observados al momento del screening sugieren un excelente control de la enfermedad por parte de los voluntarios al momento del ingreso, característica que podría explicar la falta de deterioro observada en la respuesta de las células  $\alpha$ . Como era de esperar, luego de la infusión de glucosa esta se elevó significativamente en ambos grupos, disminuyendo a los 10 minutos de la infusión de insulina también en ambos grupos. En ninguna de las mediciones se observaron diferencias significativas entre los grupos. En el caso de la insulina, esta aumentó significativamente luego de la infusión de glucosa e insulina también en ambos grupos.

Respecto de la regulación de la secreción de glucagón, se observó que la infusión de glucosa produjo una supresión significativa de la secreción de éste. Sin embargo, al ser la glucosa también un estímulo para la secreción de insulina, resulta imposible distinguir

si el efecto en la supresión de la secreción de glucagón se produjo por efecto propio del metabolismo de la glucosa, producto del alza de la insulina en respuesta a la glucosa, o debido al efecto combinado de ambas. La administración de insulina por su parte produjo nuevamente una disminución significativa en la secreción de glucagón, la cual considerando que fue acompañada de una reducción significativa en la glicemia, puede atribuirse con relativa certeza al efecto que tiene la insulina por sí misma. Aunque el efecto supresor de la insulina en la secreción de glucagón posteriormente a su infusión predominó por sobre la reducción de la glicemia, debe considerarse que los valores de glicemia plasmática alcanzados todavía fueron lo suficientemente elevados como para no estimular en sí mismos la secreción de glucagón (Gromada *et al.* 2007). Por otro lado, debe considerarse también que los niveles plasmáticos de insulina luego de su infusión fueron aproximadamente 10 veces los valores alcanzados post-infusión de glucosa. Contrario a este último punto, sin embargo, se puede argumentar que aunque la concentración de insulina plasmática se encontró bastante por sobre los niveles fisiológicos, tanto la concentración de insulina como la concentración de glucagón disminuyen de manera importante luego de abandonar el islote de Langerhans producto del efecto de dilución que se produce en la circulación sistémica (Unger y Orci 2010). Además, el flujo sanguíneo del páncreas drena a través de la circulación portal, siendo el hígado uno de los principales órganos blancos tanto de la insulina como del glucagón y participando activamente en el clearance de ambas hormonas (Balage y Grizard 1986, Duckworth *et al.* 1998).

En resumen, aunque se observó que la insulina por sí misma es capaz de suprimir la secreción de glucagón, no se puede determinar si el efecto supresor de la glucosa es producido por la glucosa en sí misma o por su efecto sobre la secreción de insulina. Por otro lado, con los antecedentes disponibles tampoco es posible determinar si el efecto supresor de la insulina observado en este estudio es comparable con el efecto causado a nivel del islote de Langerhans por la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$ .

En el caso de la relación insulina/glucagón, se observó una diferencia significativa en ésta en ayunas entre los grupos control y suplemento al ingreso, siendo ésta mayor en el grupo posteriormente suplementado lo cual podría estar explicado por la diferencia en el IMC y la CC entre ambos grupos. En este sentido, se ha descrito que tanto la secreción de insulina como la secreción de glucagón se correlacionan positivamente con el sobrepeso (Borghgi *et al.* 1984, Polonsky *et al.* 1988). Luego de la infusión de glucosa, la diferencia en la relación insulina/glucagón entre ambos grupos perdió significancia.

Por último, cabe destacar que dos de 35 sujetos presentaron un aumento en la concentración de glucagón plasmático en vez de una disminución luego de la infusión de glucosa, aumentando esta cifra a siete de 31 sujetos luego de la infusión de insulina. De éstos, ningún sujeto presentó incrementos en la concentración plasmática de glucagón en respuesta a ambos estímulos. En la búsqueda de una posible explicación a este fenómeno se analizó gráficamente la relación entre el cambio en la concentración de glucagón post-infusión de glucosa y post- infusión de insulina con algunos otros parámetros evaluados en este estudio: años desde el diagnóstico de DM2 como indicador de

progresión de la enfermedad; HbA1c como indicador del grado de deterioro en la homeostasis de la glucosa; IMC y CC como indicadores de obesidad y obesidad central, respectivamente; HOMA-IR como indicador de resistencia a la insulina; PCRus como indicador de estado inflamatorio; TBARS, GPX, glutatión total, relación glutatión reducido/glutatión total e isoprostanos como indicadores de estrés oxidativo; colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL y triglicéridos plasmáticos como indicadores de dislipidemia; e ingesta de Zn, Zn plasmático y EZP como indicadores de estado nutricional de Zn; sin encontrarse asociación con ninguno de estos parámetros salvo en el caso del cambio relativo en la concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de glucosa y el IMC (ver *Efecto del sobrepeso/obesidad sobre la secreción de glucagón: Rol del Zn*) y en el caso del cambio relativo en la concentración de glucagón plasmático luego de la infusión de insulina y la ingesta de Zn ( $\rho = 0,572$ ,  $N = 29$ ,  $p = 0,001$ ), ambas correlaciones contrarias a lo esperado.

Considerando la complejidad de los mecanismos de regulación de la secreción de glucagón y la diversidad de estímulos que participan de ésta, es claro que la supresión o estimulación de la secreción de glucagón en respuesta a la glucosa o a la insulina depende de más de un factor. Sin embargo, considerando el pequeño número de participantes de este estudio resultó inviable la realización de análisis multivariados que pudieran haber contribuido a aclarar este aspecto.

En la Tabla 8 se presentan las correlaciones observadas al ingreso entre los valores de glucagón plasmático, el cambio relativo en la concentración plasmática de glucagón luego de las infusiones de glucosa e insulina y los valores de glicemia e insulina plasmática evaluados en los mismos tiempos. Como se puede observar, sólo el cambio relativo en la concentración de glucagón plasmático post-infusión de glucosa se correlacionó negativamente con el valor de glicemia post-infusión de glucosa (ver Figura 11), siendo mayor la supresión relativa de la secreción de glucagón cuando se alcanzaron valores de glicemia más elevados. Esta asociación sugiere que frente a un aumento en la glicemia, la glucosa por sí misma regularía directamente la secreción de glucagón, aunque nuevamente no es posible discernir si esto lo hace interactuando directamente con la célula  $\alpha$  o si lo realiza mediante otros mecanismos, responsables finalmente de la supresión de la secreción de glucagón. Por otro lado, aunque la ausencia de correlaciones significativas entre la supresión de la secreción de glucagón y las concentraciones plasmáticas de insulina sugieren que la insulina no es la principal determinante de la supresión de la secreción de glucagón, no puede descartarse por completo su efecto ya que, como se mencionó anteriormente, las concentraciones de insulina y glucagón plasmáticos no son representativas de las concentraciones de dichas hormonas al interior del islote de Langerhans y, además, la infusión de insulina en concentraciones superiores a las fisiológicas pueden sobrepasar el umbral de respuesta de la célula  $\alpha$ , perdiéndose de esta forma la asociación entre uno y otro valor.

Tabla 6 - Glucagón plasmático al ingreso. Los valores se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar.

	Basal (pg/mL)	Post-glucosa (pg/mL)	Post-insulina (pg/mL)	P (tiempo*tratamiento)
Placebo	62,86 $\pm$ 32,48 <sup>a</sup>	34,74 $\pm$ 25,47 <sup>b</sup>	30,98 $\pm$ 23,02 <sup>c</sup>	0,367
Suplemento	66,29 $\pm$ 36,12 <sup>a</sup>	44,77 $\pm$ 32,10 <sup>b</sup>	35,90 $\pm$ 28,00 <sup>c</sup>	
N (placebo/suplemento)	20/16	20/16	20/16	

Diferencias entre tratamientos y tiempos fueron evaluadas mediante análisis de Modelo Lineal General (GLM) para muestras repetidas utilizando el factor de corrección de Greenhouse-Geisser. Distintos superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tiempos.

Tabla 7 - Glicemia (mg/dL), insulina plasmática ( $\mu\text{UI}/\text{mL}$ ) y relación insulina/glucagón ( $\mu\text{UI}/\text{pg}$ ) al ingreso. Los valores se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar o como mediana [Q1 – Q3].

	Basal	Post-glucosa	Post-insulina	P (tiempo*tratamiento)
<i>Glicemia (mg/dL)</i>				
Placebo	129,93 $\pm$ 23,24 <sup>a</sup>	289,12 $\pm$ 33,97 <sup>b</sup>	221,11 $\pm$ 31,41 <sup>c</sup>	0,089
Suplemento	126,02 $\pm$ 12,83 <sup>a</sup>	284,18 $\pm$ 30,77 <sup>b</sup>	234,26 $\pm$ 29,59 <sup>c</sup>	
N (placebo/suplemento)	20/16	20/16	20/16	
<i>Insulina (<math>\mu\text{UI}/\text{mL}</math>)</i>				
Placebo	7,24 $\pm$ 3,65 <sup>a</sup>	15,34 $\pm$ 12,97 <sup>b</sup>	192,66 $\pm$ 57,09 <sup>c</sup>	0,563
Suplemento	10,92 $\pm$ 5,36 <sup>a</sup>	24,04 $\pm$ 17,45 <sup>b</sup>	244,51 $\pm$ 57,18 <sup>c</sup>	
N (placebo/suplemento)	20/16	20/16	20/16	
<i>Relación insulina/glucagón (<math>\mu\text{UI}/\text{pg}</math>)</i>				
Placebo	0,093 [0,062 – 0,148] <sup>a</sup>	0,272 [0,205 – 1,011] <sup>b</sup>	5,486 [3,360 – 10,664] <sup>c</sup>	ND
Suplemento	0,179 [0,123 – 0,207] <sup>a,*</sup>	0,404 [0,241 – 0,750] <sup>b</sup>	7,616 [3,539 – 18,717] <sup>c</sup>	
N (placebo/suplemento)	19/16	17/14	17/15	

Diferencias entre tiempos y tratamientos fueron evaluadas utilizando el Modelo Lineal General (GLM) para muestras repetidas corregidas mediante el factor de Greenhouse-Geisser en el caso de variables con distribución normal. Para variables con distribución no normal, las diferencias entre tiempos fueron evaluadas mediante la prueba de Friedman y en caso de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) se realizaron contrastes pareados entre tiempos utilizando la prueba de los Rangos con Signo de Wilcoxon sin corregir. A su vez, las diferencias entre tratamientos para cada tiempo fueron analizadas utilizando la prueba de la U de Mann-Whitney. Diferentes superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tiempos. \*  $p < 0,05$  respecto del placebo. ND = No Determinado.

Tabla 8 – Coeficientes de Correlación de Pearson (r) o Spearman ( $\rho$ ) al ingreso entre glucagón y glucosa y glucagón e insulina durante la curva de tolerancia a la glucosa intravenosa modificada (FSIVGTT) (N = 36).

	Glucagón basal (pg/mL)	Glucagón post glucosa (pg/mL)	Glucagón post insulina (pg/mL)	$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%) <sup>1</sup>	$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%) <sup>2</sup>
<i>Glicemia</i>					
Glucosa basal (mg/dL)	r = -0,220	r = -0,135	r = -0,111	r = 0,026	$\rho$ = -0,023
Glucosa post glucosa (mg/dL)	r = -0,085	r = -0,212	r = -0,074	r = -0,396 *	$\rho$ = 0,124
Glucosa post insulina (mg/dL)	r = -0,109	r = -0,133	r = -0,027	r = -0,176	$\rho$ = 0,226
<i>Insulina plasmática</i>					
Insulina basal ( $\mu$ UI/mL)	$\rho$ = 0,110	$\rho$ = 0,032	$\rho$ = 0,168	$\rho$ = -0,168	$\rho$ = 0,137
Insulina post glucosa ( $\mu$ UI /mL)	$\rho$ = 0,228	$\rho$ = 0,113	$\rho$ = 0,118	$\rho$ = -0,180	$\rho$ = -0,141
Insulina post insulina ( $\mu$ UI /mL)	$\rho$ = 0,059	$\rho$ = -0,070	$\rho$ = -0,022	$\rho$ = -0,148	$\rho$ = 0,120

\* P < 0,05.

<sup>1</sup> N = 35

<sup>2</sup> N = 31

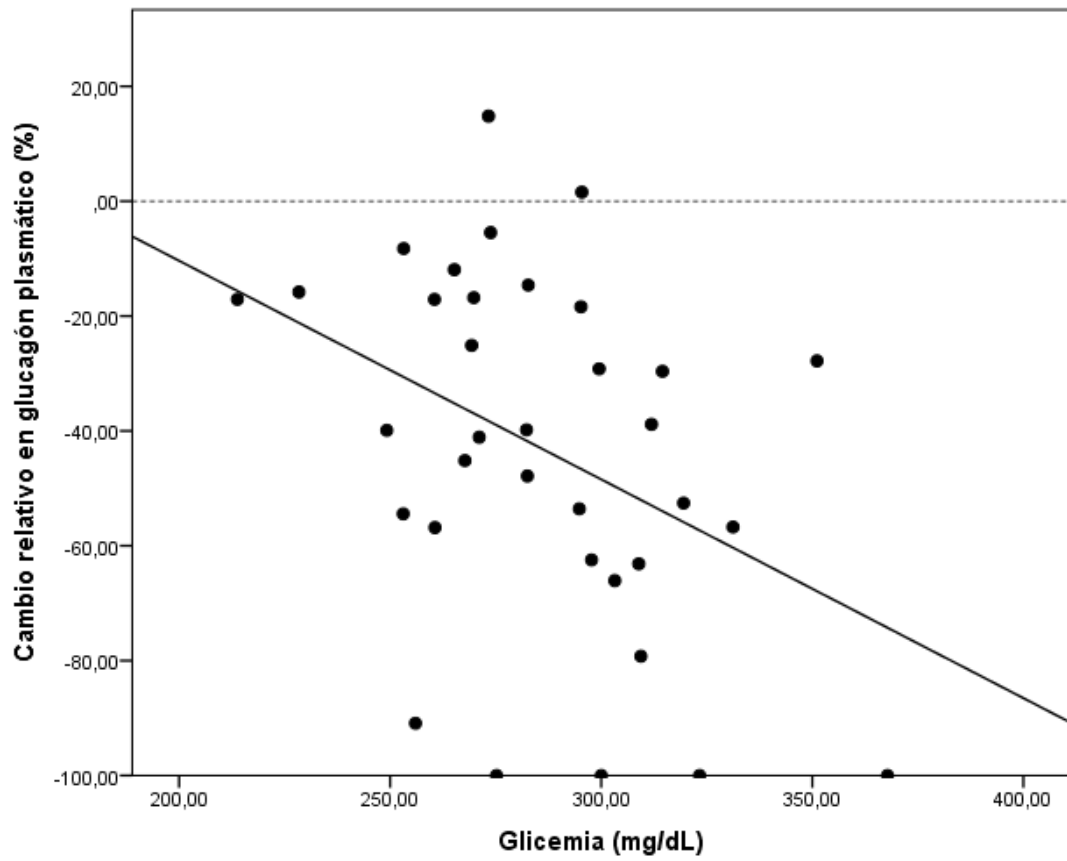


Figura 11: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa en función de la glicemia alcanzada tras la infusión de glucosa al ingreso.



En cuanto a los resultados obtenidos luego del término del periodo de suplementación, no se observaron cambios significativos en la concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de glucosa o insulina en ninguno de los dos grupos, así como tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos para ninguna de las condiciones evaluadas. Esta situación difiere de lo observado al ingreso y una posibilidad es que sea consecuencia del cambio en la técnica de determinación de glucagón. En este sentido, la alta variabilidad observada en los resultados influyó directamente en la ausencia de resultados significativos. En promedio, los valores de glucagón plasmático obtenidos mediante EIA fueron un 325% más altos que los valores al ingreso, lo cual posiblemente de cuenta de importantes diferencias en la recuperación de glucagón desde el plasma (Bak *et al.* 2014).

Respecto de los valores de glicemia y concentración plasmática de insulina al término del estudio, el grupo que recibió el placebo presentó un aumento significativo en la concentración de insulina en ayunas respecto del ingreso mientras que el grupo suplementado presentó un aumento significativo en los valores de glicemia y concentración plasmática de insulina luego de la infusión de glucosa. En el caso del incremento en la insulina plasmática en ayunas del grupo control, éste seguramente responde a la progresión normal de la enfermedad, reflejando un aumento en la resistencia a la insulina. En el caso de las diferencias observadas en el grupo suplementado, los cambios en la glicemia e insulinemia post-infusión de glucosa muestran un deterioro en la tolerancia a esta última, el cual no es prevenido por la suplementación con Zn. En cuanto al efecto diferencial de la suplementación con Zn, sólo se observó en el grupo suplementado una mayor concentración de insulina plasmática en respuesta a la infusión de glucosa que en el grupo control, la cual posiblemente fue en respuesta al aumento observado en la glicemia post-infusión de glucosa y no a un efecto directo de la suplementación con Zn.

Las correlaciones entre las concentraciones plasmáticas de glucagón, la glicemia y las concentraciones plasmáticas de insulina al término del periodo de intervención se presentan en la Tabla 11 y Tabla 12 para los grupos placebo y suplemento, respectivamente. Como se puede observar, en el grupo placebo se presentaron correlaciones positivas entre la glicemia post-infusión de glucosa con las concentraciones de glucagón plasmático post-infusión de glucosa y post-infusión de insulina (ver Figura 12 y Figura 13), mientras que en el grupo suplementado se presentaron correlaciones positivas entre la glicemia post-infusión de glucosa y el cambio en la concentración plasmática de glucagón post-infusión de glucosa y entre la glicemia post-infusión de insulina y los valores de glucagón plasmático tras la infusión de insulina (ver Figura 12 y Figura 14).

Respecto de las correlaciones observadas entre las concentraciones plasmáticas de glucagón e insulina, el grupo placebo presentó correlaciones inversas entre la concentración de insulina plasmática post-infusión de insulina y las concentraciones plasmáticas de glucagón en ayunas y post-infusión de insulina (ver Figura 15 y Figura 19), mientras que el grupo suplementado presentó correlaciones inversas entre la

concentración de insulina plasmática post-infusión de insulina y las concentraciones de glucagón plasmático post-infusión de glucosa y post-infusión de insulina, así como con el cambio en la concentración de glucagón plasmático en respuesta a la infusión de glucosa (ver Figura 15, Figura 17 y Figura 18).

Contrario a lo esperado, el análisis de las correlaciones por grupo de intervención no mostró diferencias importantes en la magnitud o sentido de éstas, sugiriendo que la suplementación con Zn no tuvo efectos significativos sobre la modulación de la secreción de glucagón por parte de la glucosa o de la insulina. En cuanto a los efectos mismos de la glucosa y de la insulina en la regulación de la secreción de glucagón, en ambos grupos los valores más altos de glicemia se asociaron con niveles más elevados de glucagón plasmático mientras que los niveles más elevados de insulina se asociaron con una mayor supresión en la secreción de glucagón.

La interpretación de los resultados observados es compleja. Considerando que no se observaron diferencias entre la concentración de glucagón plasmático en ayunas, post-infusión de glucosa y post-infusión de insulina es posible especular que las correlaciones observadas entre la glicemia y la concentración de glucagón plasmático se deban a diferencias en la capacidad de supresión de las células  $\alpha$  en función de la glicemia misma y a la contribución realizada por el glucagón a la liberación de glucosa endógena. Sin embargo, también es posible que la infusión de glucosa produzca de manera paradójica una mayor secreción de glucagón, fenómeno observado en ratones y ratas (Olsen *et al.* 2005, Salehi *et al.* 2006).

En el caso de las relaciones observadas entre las concentraciones plasmáticas de glucagón e insulina, aunque éstas son concordantes con el efecto supresor de la insulina sobre la secreción de glucagón, la temporalidad observada en estas asociaciones aporta complejidades a su interpretación. En este sentido, una posible explicación a las asociaciones observadas entre la concentración plasmática de glucagón en ayunas y post-infusión de glucosa respecto de la concentración plasmática de insulina post-infusión de insulina es que los resultados observados no estén evidenciando la acción directa de la insulina sobre la secreción de glucagón sino la acción de mecanismos comunes a la regulación de la secreción de glucagón y al manejo de la insulina. La carencia de péptido C impide distinguir si las relaciones observadas son explicadas por la secreción de insulina o por la infusión de insulina exógena, incorporando un nuevo elemento de confusión.

Es importante destacar que no se observaron asociaciones estadísticas entre la glicemia pre-infusión de glucosa o en la insulina pre-infusión de insulina con la concentración de glucagón plasmático en ninguno de sus tiempos, lo cual sugiere que los efectos observados fueron producidos específicamente por la infusión de la glucosa e insulina. En el caso de la glucosa, esta condición se produce normalmente luego de la ingesta de alimentos y podría indicar que la desregulación en la supresión de la secreción de glucagón (al menos en el caso de estos pacientes) contribuye específicamente a la intolerancia a la glucosa y no a la hiperglicemia en ayunas. Sin embargo, considerando

las glicemias alcanzadas y en línea con el posible efecto estimulador de la glucosa sobre la secreción de glucagón, también podría indicar que para que la glucosa tenga este efecto se debe superar una determinada concentración umbral que se encontraría por sobre la concentración de glucosa plasmática observada en estos pacientes en ayuno.

En el caso de la insulina, los resultados demuestran que pese a que la insulina se relaciona negativamente con la secreción de glucagón (y es posible especular que tenga un rol supresor sobre éste), las concentraciones necesarias para que esta situación se produzca no son logradas por estos pacientes de manera fisiológica (característica esperable en pacientes con DM2), por lo que desde el punto de vista de la regulación hormonal normal, el aporte de la concentración de insulina sería marginal en estos sujetos.

Tabla 9 - Glucagón plasmático post-suplementación. Los valores se presentan como mediana [Q1 – Q3].

	Basal (pg/mL)	Post-glucosa (pg/mL)	Post-insulina (pg/mL)	P (entre tiempos)
Placebo	105,50 [27,40 – 260,80]	198,80 [27,40 – 246,00]	119,40 [27,60 – 147,10]	0,627
Suplemento	195,60 [48,30 – 250,45]	194,60 [56,50 – 297,85]	205,10 [56,55 – 260,10]	0,368
N	15/13	15/13	15/13	

Diferencias entre tiempos fueron evaluadas mediante la prueba de Friedman y diferencias entre tratamientos fueron evaluadas utilizando la prueba de la U de Mann-Whitney.

Tabla 10 - Glicemia (mg/dL), insulina plasmática ( $\mu$ UI/mL) y relación insulina/glucagón ( $\mu$ UI/pg) post-suplementación. Los valores se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar o como mediana [Q1 – Q3].

	Basal	Post-glucosa	Post-insulina	P (tiempo*tratamiento)
<i>Glicemia (mg/dL)</i>				
Placebo	130,81 $\pm$ 26,56 <sup>a</sup>	288,69 $\pm$ 36,28 <sup>b</sup>	226,19 $\pm$ 29,33 <sup>c</sup>	0,193
Suplemento	123,86 $\pm$ 20,80 <sup>a</sup>	303,68 $\pm$ 38,60 <sup>b, &amp;</sup>	238,43 $\pm$ 28,97 <sup>c</sup>	
N	15/13	15/13	15/13	
<i>Insulina (<math>\mu</math>UI/mL)</i>				
Placebo	10,50 [7,60 – 15,00] <sup>a, &amp;</sup>	17,20 [12,10 – 21,00] <sup>b</sup>	175,20 [149,00 – 268,60] <sup>c</sup>	ND
Suplemento	11,60 [8,10 – 21,45] <sup>a</sup>	31,70 [18,40 – 48,90] <sup>b, *, &amp;</sup>	227,60 [188,45 – 327,75] <sup>c</sup>	
N	15/13	15/13	15/13	
<i>Relación insulina/glucagón (<math>\mu</math>UI/pg)</i>				
Placebo	0,119 [0,038 – 0,452] <sup>a</sup>	0,098 [0,052 – 0,675] <sup>a</sup>	2,781 [0,919 – 8,265] <sup>b</sup>	ND
Suplemento	0,069 [0,034 – 0,336] <sup>a</sup>	0,155 [0,091 – 0,748] <sup>b</sup>	1,224 [0,808 – 8,876] <sup>c</sup>	
N	15/13	15/13	15/13	

Diferencias entre tiempos y tratamientos fueron evaluadas utilizando el Modelo Lineal General (GLM) para muestras repetidas corregidas mediante el factor de Greenhouse-Geisser en el caso de variables con distribución normal. Para variables con distribución no normal, las diferencias entre tiempos fueron evaluadas mediante la prueba de Friedman y en caso de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) se realizaron contrastes pareados entre tiempos utilizando la prueba de los Rangos con Signo de Wilcoxon sin corregir. A su vez, las diferencias entre tratamientos para cada tiempo fueron analizadas utilizando la prueba de la U de Mann-Whitney. Diferentes superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tiempos. \*  $p < 0,05$  respecto del placebo, &  $p < 0,05$  respecto del ingreso. ND = No Determinado.

Tabla 11 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) al término del periodo de suplementación entre glucagón y glucosa y glucagón e insulina durante la curva de tolerancia a la glucosa intravenosa modificada (FSIVGTT) para el grupo control (N = 15).

	Glucagón basal (pg/mL)	Glucagón post glucosa (pg/mL)	Glucagón post insulina (pg/mL)	$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%)	$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%)
<i>Glicemia</i>					
Glucosa basal (mg/dL)	$\rho = 0,143$	$\rho = 0,343$	$\rho = 0,211$	$\rho = 0,079$	$\rho = -0,154$
Glucosa post glucosa (mg/dL)	$\rho = 0,361$	$\rho = 0,629 *$	$\rho = 0,536 *$	$\rho = 0,118$	$\rho = 0,032$
Glucosa post insulina (mg/dL)	$\rho = 0,225$	$\rho = 0,336$	$\rho = 0,371$	$\rho = -0,021$	$\rho = 0,082$
<i>Insulina plasmática</i>					
Insulina basal ( $\mu$ UI /mL)	$\rho = 0,200$	$\rho = 0,132$	$\rho = 0,250$	$\rho = -0,275$	$\rho = 0,229$
Insulina post glucosa ( $\mu$ UI /mL)	$\rho = -0,193$	$\rho = -0,364$	$\rho = -0,068$	$\rho = -0,239$	$\rho = 0,429$
Insulina post insulina ( $\mu$ UI /mL)	$\rho = -0,546 *$	$\rho = -0,500$	$\rho = -0,529 *$	$\rho = -0,204$	$\rho = -0,054$

\* P < 0,05.

Tabla 12 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) al término del periodo de suplementación entre glucagón y glucosa y glucagón e insulina durante la curva de tolerancia a la glucosa intravenosa modificada (FSIVGTT) para el grupo suplementado (N = 13).

	Glucagón basal (pg/mL)	Glucagón post glucosa (pg/mL)	Glucagón post insulina (pg/mL)	$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%)	$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%)
<i>Glicemia</i>					
Glucosa basal (mg/dL)	$\rho = -0,143$	$\rho = -0,055$	$\rho = 0,044$	$\rho = 0,324$	$\rho = -0,005$
Glucosa post glucosa (mg/dL)	$\rho = -0,082$	$\rho = 0,324$	$\rho = 0,291$	$\rho = 0,692^{**}$	$\rho = -0,170$
Glucosa post insulina (mg/dL)	$\rho = 0,104$	$\rho = 0,401$	$\rho = 0,555^{*}$	$\rho = 0,363$	$\rho = 0,121$
<i>Insulina plasmática</i>					
Insulina basal ( $\mu$ UI/mL)	$\rho = -0,292$	$\rho = -0,217$	$\rho = 0,099$	$\rho = -0,234$	$\rho = 0,613^{*}$
Insulina post glucosa ( $\mu$ UI /mL)	$\rho = 0,033$	$\rho = -0,181$	$\rho = 0,137$	$\rho = -0,412$	$\rho = 0,544$
Insulina post insulina ( $\mu$ UI /mL)	$\rho = -0,137$	$\rho = -0,637^{*}$	$\rho = -0,560^{*}$	$\rho = -0,758^{**}$	$\rho = 0,209$

\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

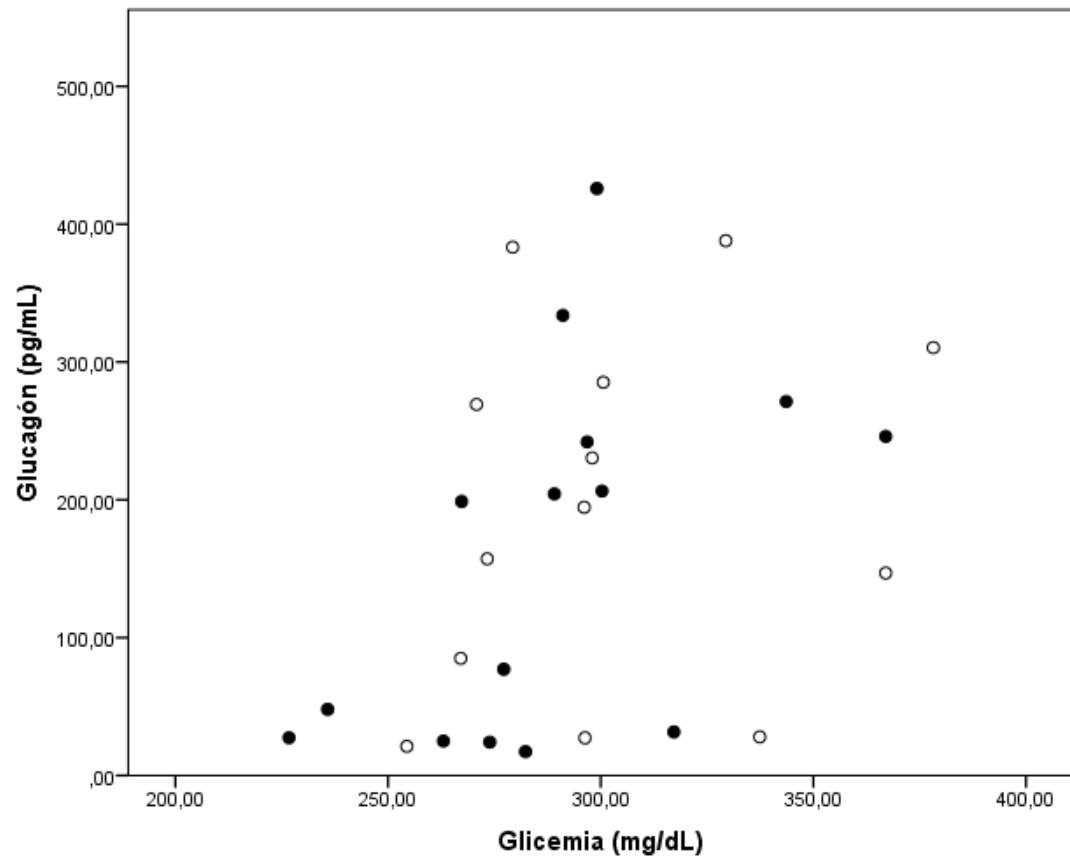


Figura 12: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de glucosa en función de la glicemia alcanzada tras la infusión de glucosa al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*



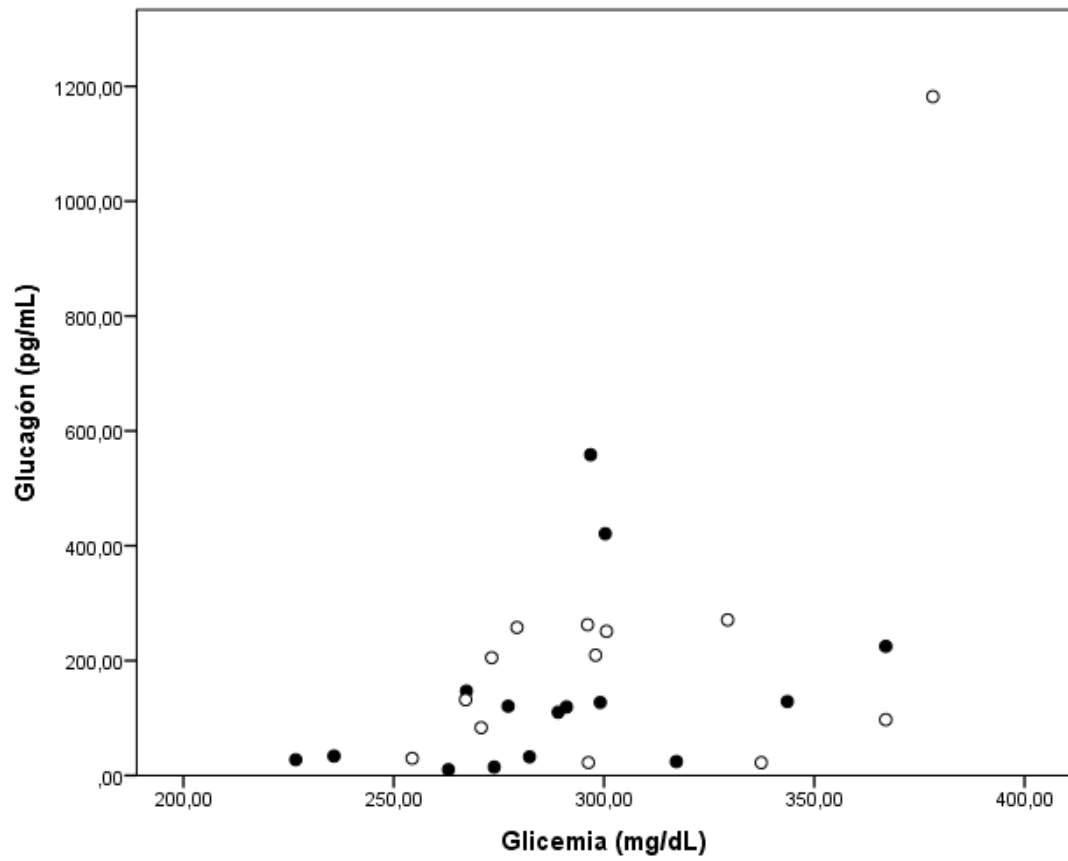


Figura 13: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la glicemia alcanzada tras la infusión de glucosa al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

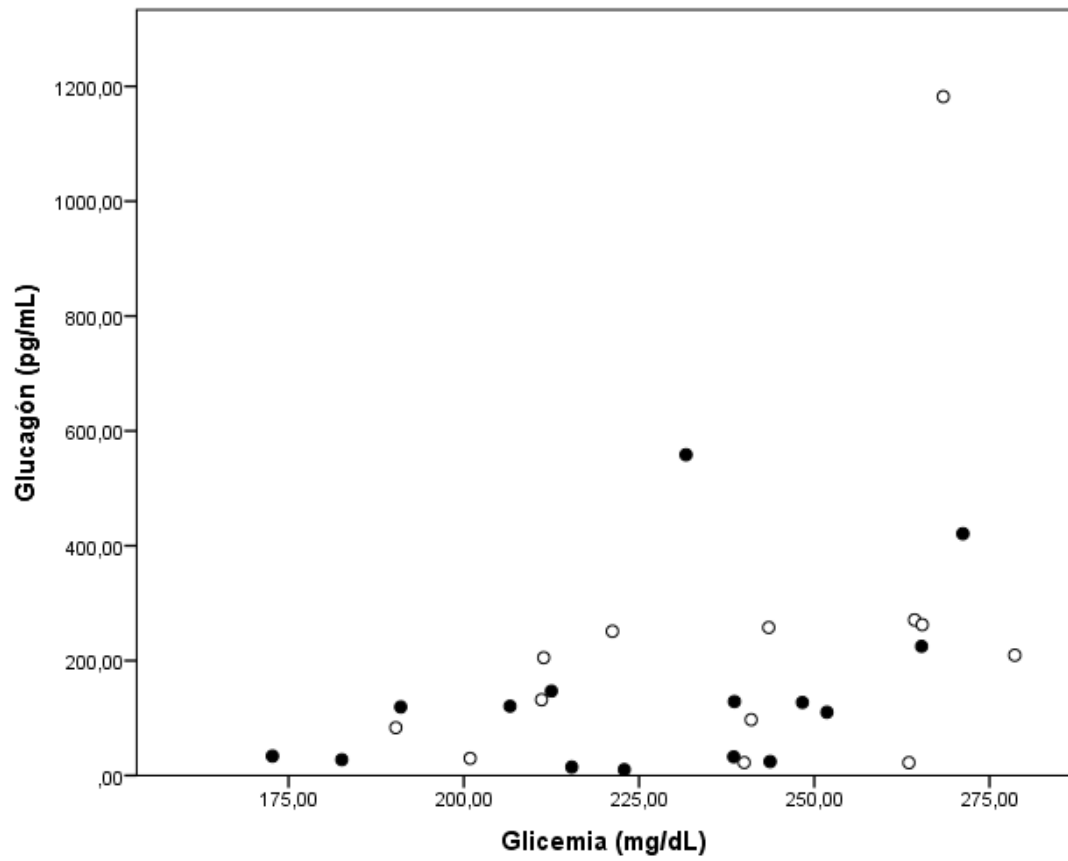


Figura 14: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la glicemia alcanzada tras la infusión de insulina al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

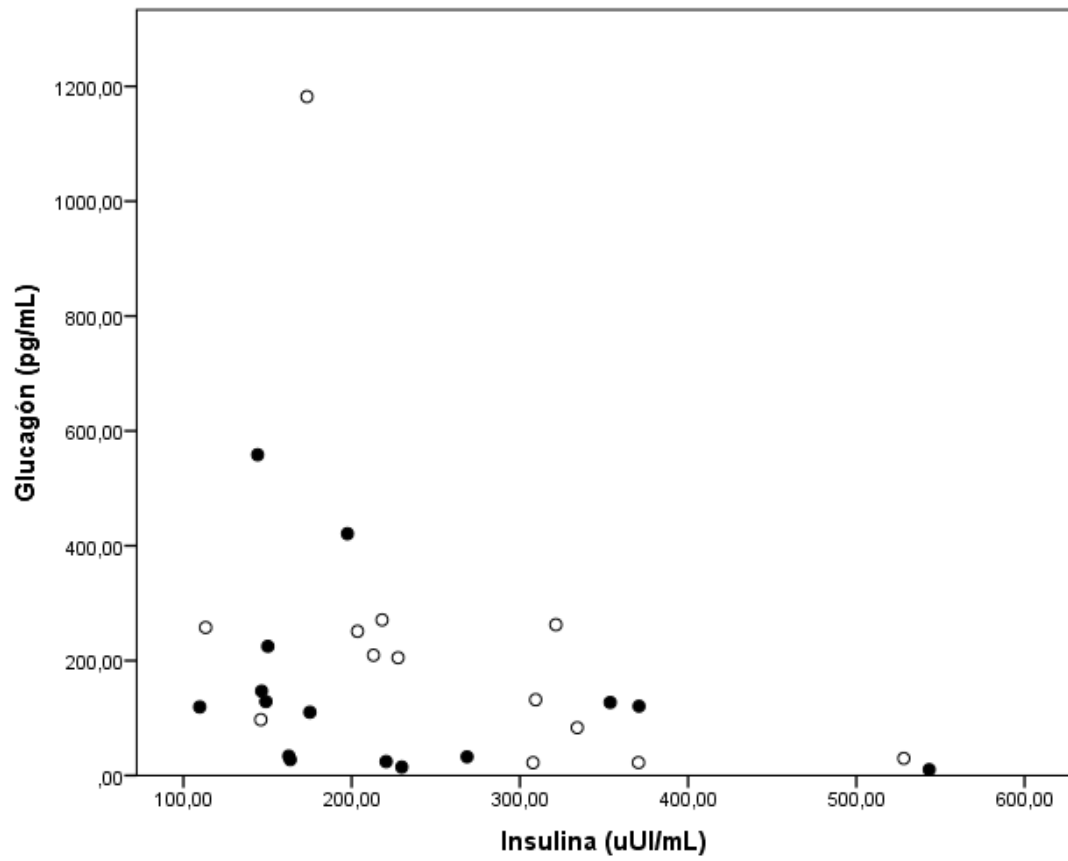


Figura 15: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la concentración plasmática de insulina alcanzada tras la infusión de insulina al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

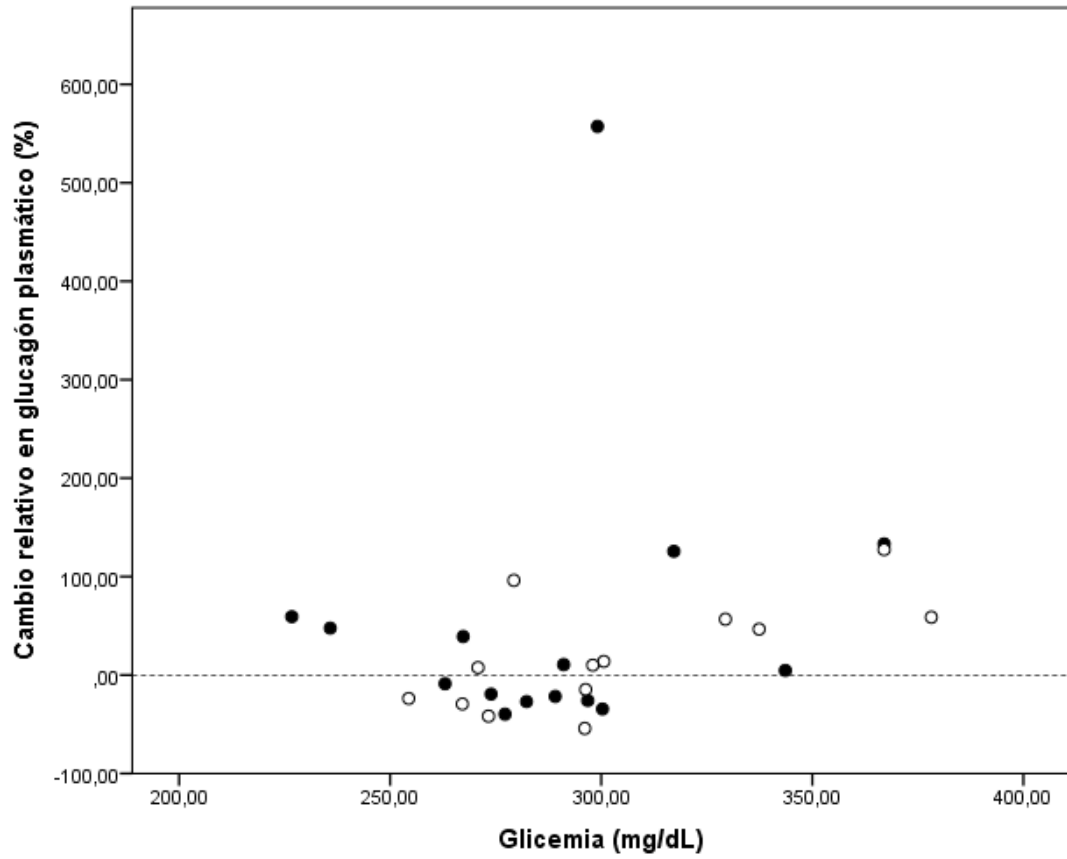


Figura 16: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa en función de la glicemia alcanzada tras la infusión de glucosa al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

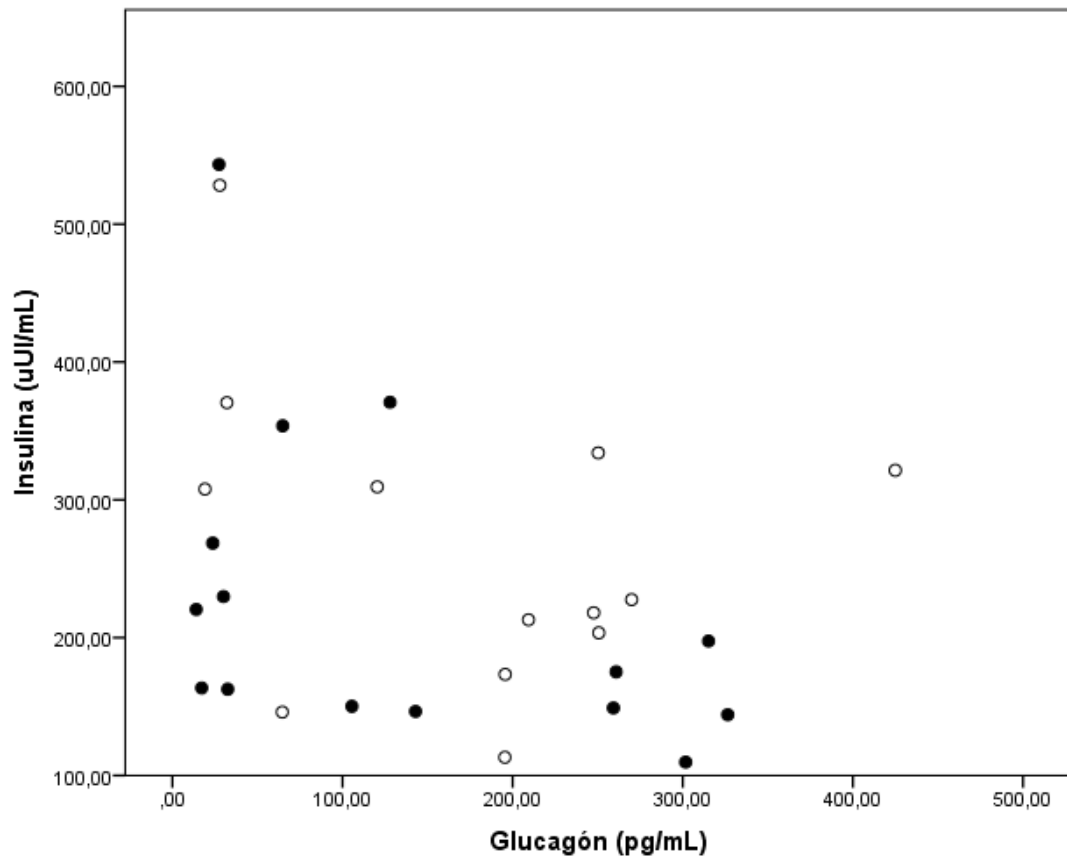


Figura 17: Concentración plasmática de insulina alcanzada tras la infusión de insulina en función de la concentración plasmática de glucagón alcanzada tras la infusión de glucosa al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

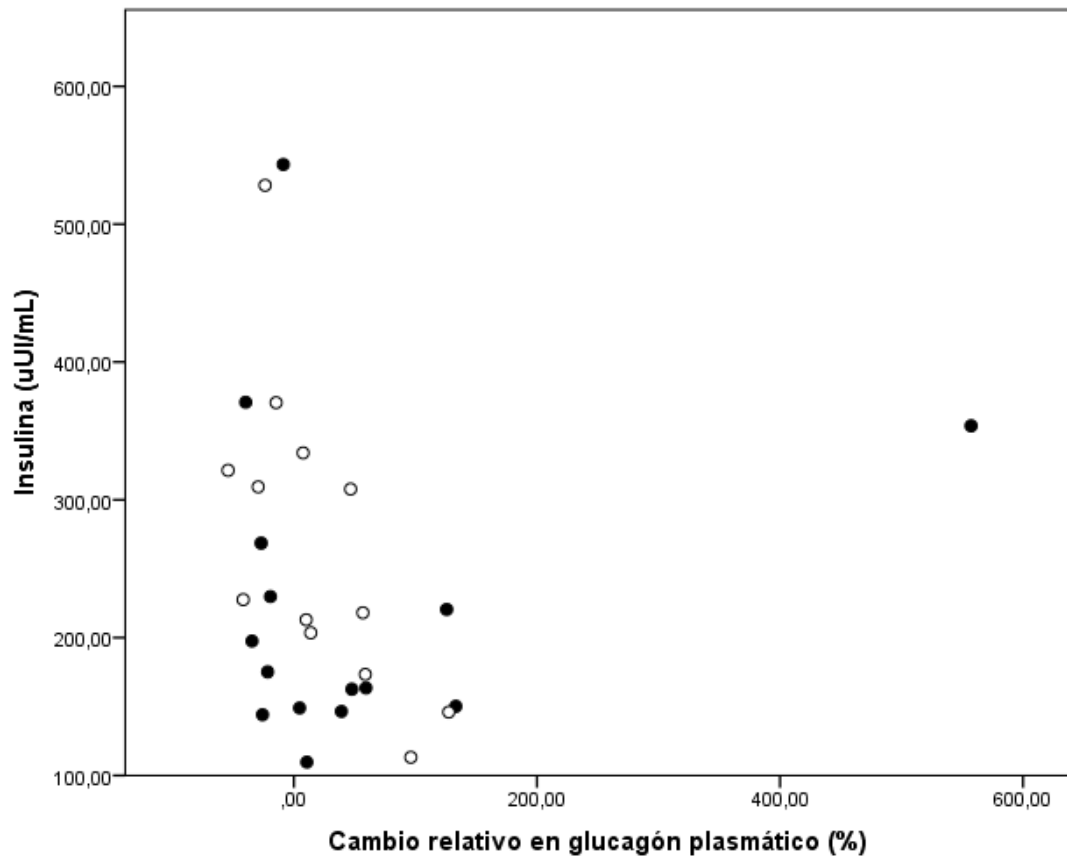


Figura 18: Concentración plasmática de insulina alcanzada tras la infusión de insulina en función del cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

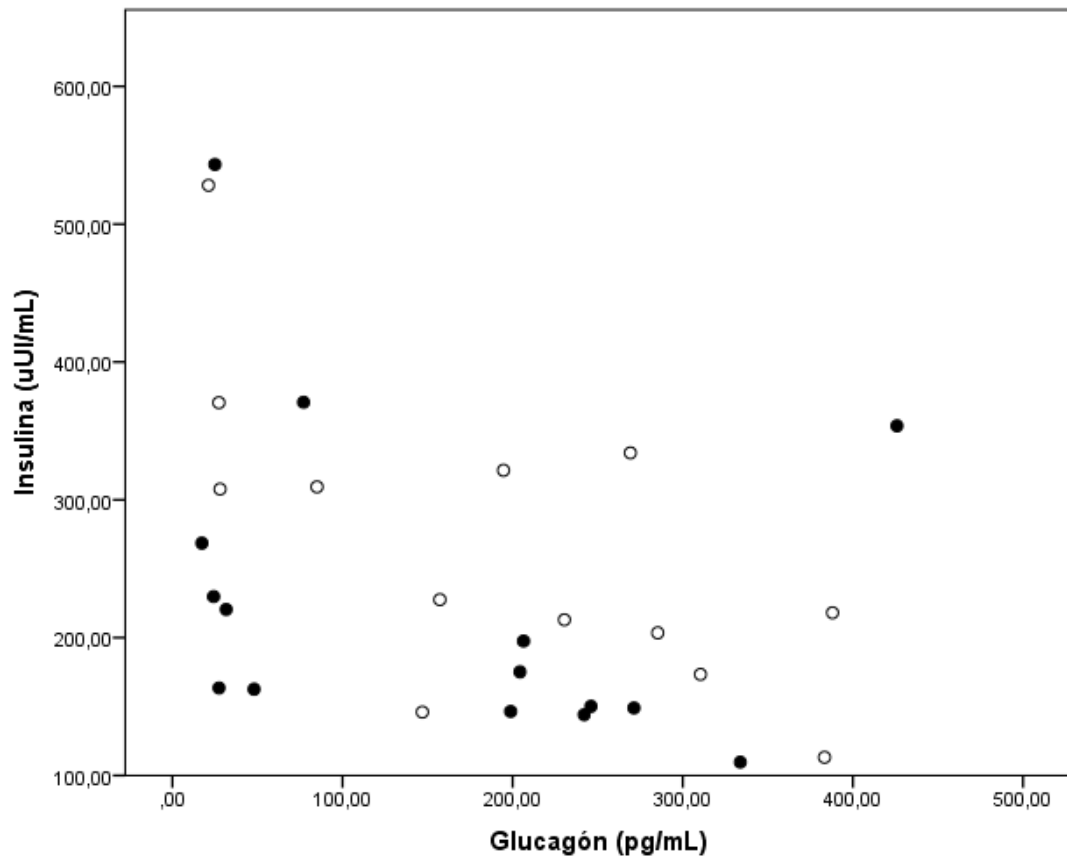


Figura 19: Concentración plasmática de insulina alcanzada tras la infusión de insulina en función de la concentración plasmática de glucagón en ayunas al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

Las asociaciones observadas entre la expresión relativa de *ZNT-8* y la glicemia y la concentración plasmática de insulina y glucagón, tanto al ingreso como luego del periodo de suplementación, se presentan en la Tabla 13. Como se puede apreciar, sólo se presentaron correlaciones estadísticamente significativas luego del término del periodo de suplementación, presentándose una marcada asociación inversa entre la expresión de *ZNT-8* y la concentración plasmática de insulina tras la infusión de glucosa en ambos grupos (ver Figura 20). Además, se presentó también una marcada asociación entre la expresión de *ZNT-8* y la disminución en la supresión de la secreción de glucagón tras la infusión de glucosa, aunque en este caso sólo en el grupo control (ver Figura 21).

Respecto de la asociación entre la expresión de *ZNT-8* y la concentración plasmática de insulina tras la infusión de glucosa, los resultados fueron contrarios a lo esperado, considerando que se ha descrito que la disminución de la expresión de *ZNT-8* en células  $\beta$  pancreáticas produce una disminución en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (Fu *et al.* 2009, Pound *et al.* 2009). Una posible explicación es que el aumento en la expresión de *ZNT-8* produjera un aumento en la concentración de Zn al interior de las vesículas de secreción de insulina, el cual al ser liberado junto con la insulina tras la infusión de glucosa, podría ejercer un efecto de *feedback* negativo sobre la posterior secreción de insulina. En este sentido, se ha descrito que el Zn tienen un efecto inhibitor sobre la secreción de insulina, el cual estaría mediado entre otros por los canales de  $K^+$ <sub>ATP</sub> y canales VGCC (Li 2014). Sin embargo, estos resultados igualmente deben de interpretarse con precaución, dado que como se mencionó anteriormente, la expresión de *ZNT-8* en células PBMC no necesariamente refleja la expresión de éste en células  $\beta$  pancreáticas. Además, el número de sujetos evaluados fue pequeño, considerando que sólo la mitad de los sujetos expresaron *ZNT-8* en células PBMC. Finalmente, esta asociación se presentó tanto en el grupo placebo como en el grupo suplementado de manera similar, sugiriendo que la suplementación con Zn no tuvo impacto sobre esta asociación.

En el caso de la asociación observada entre la expresión relativa de *ZNT-8* y la menor supresión de la secreción de glucagón (ver Figura 21), esto podría atribuirse a la menor concentración plasmática de insulina alcanzada luego de la infusión de glucosa en el caso de los individuos que presentaron una mayor expresión de *ZNT-8*, disminuyendo por tanto el efecto supresor que esta hormona ejerce sobre la célula  $\alpha$ . La pérdida de la significancia estadística observada en el grupo suplementado podría ser consecuencia de una mayor liberación de Zn junto con la secreción de insulina, el cual podría contribuir a una mayor supresión de la secreción de glucagón mediante sus propiedades insulino-miméticas.



Tabla 13 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) al ingreso y término del periodo de suplementación entre expresión de *ZNT-8* y glicemia, concentración de insulina plasmática y concentración de glucagón plasmático durante la curva de tolerancia a la glucosa intravenosa modificada (FSIVGTT).

	Expresión de <i>ZNT-8</i>		
	Ingreso	Post-suplementación	
	Total N = 17	Placebo N = 9	Suplemento N = 6
Glucosa basal (mg/dL)	0,210	0,393	0,200
Glucosa post glucosa (mg/dL)	0,258	0,393	0,257
Glucosa post insulina (mg/dL)	-0,049	0,259	0,429
Insulina basal ( $\mu$ UI/mL)	-0,034	0,109	0,143
Insulina post glucosa ( $\mu$ UI /mL)	-0,073	-0,720 *	-0,829 *
Insulina post insulina ( $\mu$ UI /mL)	0,072	-0,126	0,029
Glucagón basal (pg/mL)	-0,266	-0,243	-0,543
Glucagón post glucosa (pg/mL)	-0,245	0,527	0,200
Glucagón post insulina (pg/mL)	-0,278	-0,100	0,143
$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%)	-0,080	0,703 *	0,429
$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%)	-0,192	-0,569	-0,429

\*  $P < 0,05$ .

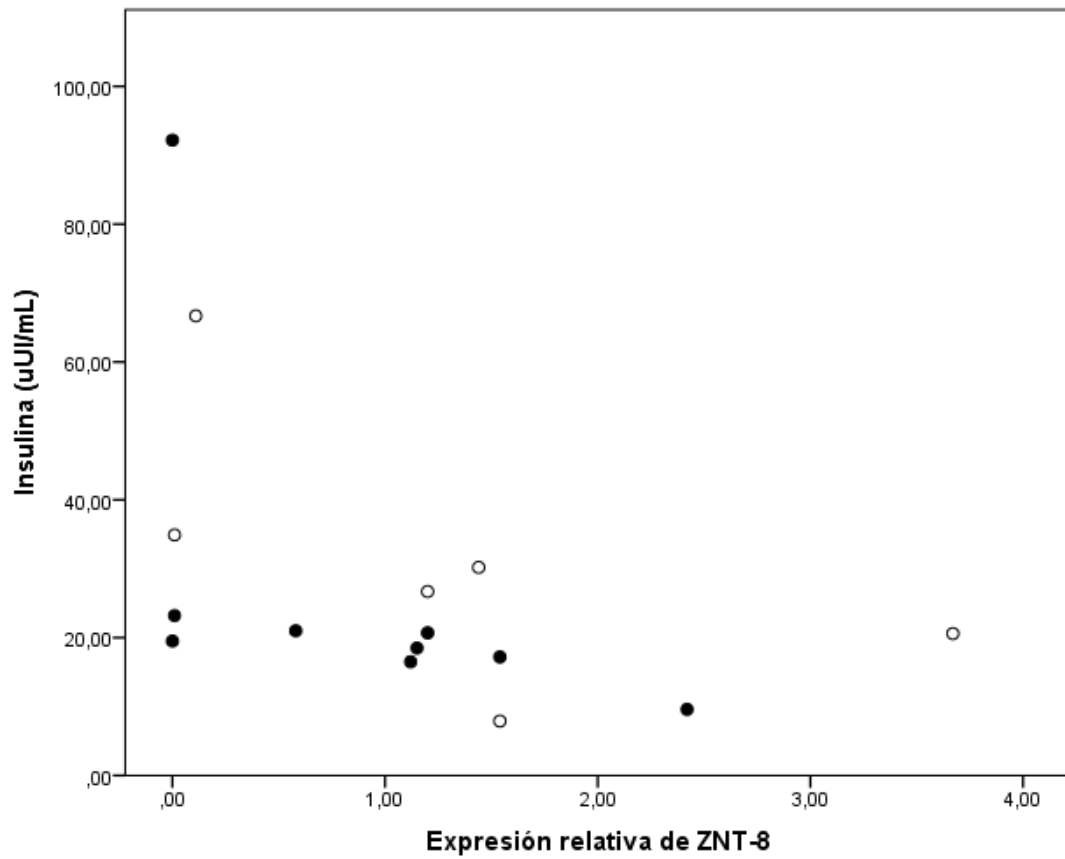


Figura 20: Concentración plasmática de insulina alcanzada tras la infusión de glucosa en función de la expresión relativa de *ZNT-8* al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

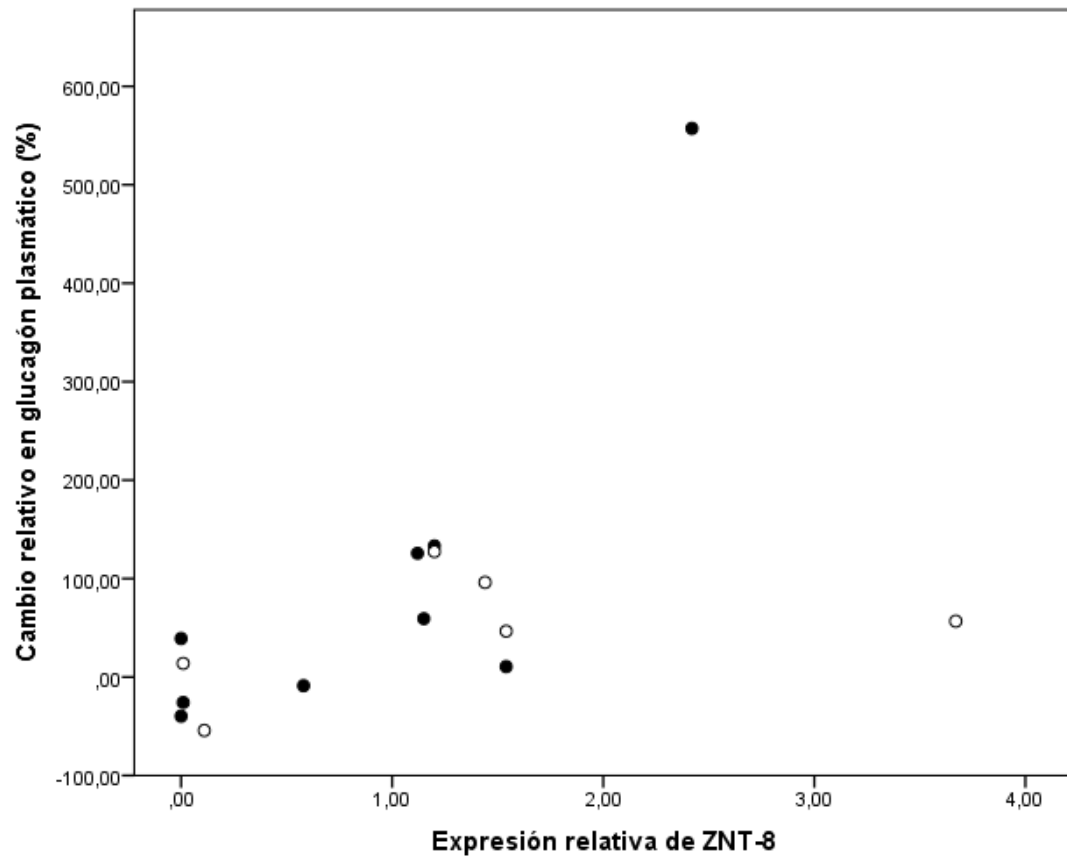


Figura 21: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa en función de la expresión relativa de *ZNT-8* al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

El modelo mínimo de Bergman corresponde a un modelo matemático no lineal que permite describir a través de una serie de parámetros el modo mediante el cual la glucosa y la insulina controlan la producción y la utilización de la glucosa (Boston *et al.* 2003). Entre estos parámetros se pueden mencionar (Bergman *et al.* 1979, Boston *et al.* 2003, Nittala *et al.* 2006):

- Eficacia de la glucosa (*Glucose effectiveness*, Sg): Corresponde al incremento cuantificable en la desaparición de la glucosa en función del aumento en la glicemia.
- Sensibilidad a la insulina (*Insulin sensitivity*, Si): Corresponde a la influencia cuantificable que ejerce la insulina en el aumento de la desaparición de la glucosa.
- Eficacia de la glucosa en ausencia de insulina (*Glucose effectiveness at zero insulin*, GEZI): Exactamente igual a la eficacia de la glucosa pero considerando una condición de ausencia de insulina.
- Respuesta insulínica aguda a la glucosa (*Acute insulin response to glucose*, AIRg): Corresponde a la insulina liberada durante la primera fase de secreción de insulina
- Índice de Disposición (DI): Corresponde al producto de la sensibilidad a la insulina (Si) y la respuesta insulínica aguda a la glucosa (AIRg), es adimensional y ha sido descrito como un buen predictor de la predisposición a desarrollar DM2 en indios Pima (Nittala *et al.* 2006).

Además de los parámetros antes mencionados, el modelo mínimo de Bergman permite estimar la resistencia a la insulina (IR) y la función de las células  $\beta$  en función del HOMA u *Homeostasis Model Assessment* (Boston *et al.* 2003).

Los valores de los parámetros del modelo mínimo se presentan en la Tabla 14. Como se puede apreciar, al ingreso se observó una función de las células  $\beta$  pancreáticas significativamente más alta junto con una mayor resistencia a la insulina en el grupo posteriormente suplementado, lo cual posiblemente se explique por el mayor IMC y mayor CC de este grupo. Al término del periodo de intervención el único parámetro que presentó diferencias significativas entre ambos grupos fue la sensibilidad a la insulina, la cual fue significativamente mayor en el grupo placebo. Al igual que al ingreso, esto posiblemente responde a las diferencias en IMC y CC. Finalmente, no hubo diferencias significativas entre los grupos en cuanto al cambio observado entre el ingreso y el término de la intervención respecto de ninguno de los parámetros evaluados.

Respecto de las asociaciones observadas entre los parámetros del modelo mínimo con la concentración plasmática de glucagón, mientras que al ingreso no se observaron asociaciones significativas (ver Tabla 15), al término de la intervención sí se observó una correlación positiva entre la resistencia a la insulina y la concentración de glucagón plasmático luego de la infusión de insulina sólo en el grupo control (ver Tabla 16, Tabla 17 y Figura 22). En el caso del grupo suplementado esta correlación fue inexistente, lo cual sugiere que la suplementación con Zn modifica la respuesta de la célula  $\alpha$  a la

insulina, lo que si bien no tuvo impacto en la magnitud de la secreción de glucagón, si permite especular que la suplementación con Zn podría ser una alternativa en condiciones en las cuales la resistencia a la insulina sea más elevada. En este sentido es necesario considerar que todos los pacientes reclutados se encontraban en excelente estado de control de la DM2, con bajos niveles de glicemia en ayunas y HbA1c, además de presentar niveles suficientes de Zn evaluado mediante Zn plasmático. De esta manera, la suplementación con Zn podría tener un mayor impacto en sujetos con déficit franco de Zn (Ruz *et al.* 2016) o en aquellos sujetos que presenten mayor deterioro en la homeostasis de la glucosa.

En el caso del grupo suplementado se observó una correlación positiva entre la eficacia de la glucosa (Sg) y el cambio relativo en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de ésta, la cual no se observó en el grupo control (ver Tabla 16, Tabla 17 y Figura 23). Sin embargo, la eficacia de la glucosa también presentó una correlación significativa con el cambio absoluto en la glicemia luego de la infusión de glucosa ( $r = 0,741$ ,  $N = 13$ ,  $p = 0,004$ ), presentando esta última una mayor correlación con el cambio en la concentración plasmática de glucagón tras la infusión de glucosa ( $r = 0,651$ ,  $N = 13$ ,  $p = 0,016$ ) que la eficacia de la glucosa. De este modo, la correlación observada entre el cambio en la concentración de glucagón plasmático con la eficacia de la glucosa posiblemente no es más que el reflejo de la asociación entre el primero y el cambio absoluto en la glicemia tras la infusión de glucosa. Esto plantea las mismas interrogantes enunciadas anteriormente respecto de si mayores incrementos en la glicemia responden a un mayor aporte de la producción de glucosa endógena asociado a concentraciones de glucagón plasmáticas más elevadas o si son los aumentos de la glicemia los que generan aumentos en la secreción de glucagón de manera paradójica.

Finalmente, en cuanto a la asociación observada entre la eficacia de la glucosa y el cambio absoluto en la glicemia tras la infusión de glucosa, ésta responde a que mayores aumentos en la glicemia producen también un aumento en la captación de la glucosa como consecuencia de la mayor disponibilidad de sustrato (Ader *et al.* 1997).

En base a lo anterior, es posible concluir que aunque la suplementación con Zn no modificó mayormente la asociación entre la concentración plasmática de insulina y la glicemia con la secreción o supresión de la secreción de glucagón, la suplementación con Zn modificó la respuesta de la célula  $\alpha$  a la insulina, lo que se manifestó como la pérdida de la correlación entre la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de insulina con la resistencia a la insulina. Aunque con la información disponible no es posible reconocer el mecanismo mediante el cual el Zn ejerció este efecto, este concuerda con la hipótesis de que el Zn es capaz de modular la respuesta de las células  $\alpha$  mediante su efecto insulino-mimético en presencia de resistencia a la insulina en este tipo celular.

Tabla 14 - Parámetros de Modelo Mínimo de Bergman al ingreso y al término del periodo de suplementación. Los datos se presentan como mediana [Q1 – Q3].

	Ingreso			Post-suplementación			P ( $\Delta$ ingreso-término)
	Placebo	Suplemento	P	Placebo	Suplemento	P	
N	20	16		15	13		
AIRg (mU·L <sup>-1</sup> ·min)	35,75 [6,50 – 98,73]	64,05 [26,55 – 177,60]	0,161	54,40 [6,60 – 148,80]	118,50 [72,65 – 208,75]	0,160	0,504
DI	54,30 [3,25 – 198,20]	115,90 [64,00 – 228,58]	0,417	206,56 [37,55 – 434,94]	192,00 [12,49 – 399,83]	0,982	0,908
Si (mU/L) <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	2,00 [1,05 – 2,50]	1,55 [1,20 – 1,98]	0,300	2,50 [1,50 – 3,30]	1,30 [0,80 – 2,15]	0,020	0,712
Sg (min <sup>-1</sup> )	0,020 [0,010 – 0,020]	0,010 [0,010 – 0,020]	0,132	0,020 [0,010 – 0,020]	0,010 [0,010 – 0,025]	0,903	0,260 <sup>1</sup>
GEZI (min <sup>-1</sup> )	0,010 [0,010 – 0,020]	0,010 [0,010 – 0,010]	0,131	0,010 [0,010 – 0,020]	0,010 [0,000 – 0,025]	0,788	0,665
Función célula $\beta$ (mU/mM)	49,10 [31,83 – 70,85]	73,95 [46,60 – 115,65]	0,045	68,19 [46,98 – 111,70]	84,31 [58,50 – 226,93]	0,345	0,534
IR (mM·mU/L <sup>-2</sup> )	1,95 [1,15 – 2,95]	2,30 [1,90 – 4,10]	0,048	2,78 [1,76 – 3,60]	3,20 [2,25 – 4,48]	0,504	0,902 <sup>1</sup>

Diferencias entre tratamientos placebo/suplemento fueron evaluadas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney mientras que diferencias entre tiempos ingreso/término fueron evaluadas mediante la prueba de los Rangos con Signo de Wilcoxon. <sup>1</sup> Prueba de t para muestras independientes.

Tabla 15 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón y parámetros del modelo mínimo al ingreso (N = 36).

	Glucagón basal (pg/mL)	Glucagón post glucosa (pg/mL)	Glucagón post insulina (pg/mL)	$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%) <sup>1</sup>	$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%) <sup>2</sup>
AIRg (mU·L <sup>-1</sup> ·min)	$\rho = 0,218$	$\rho = 0,178$	$\rho = 0,113$	$\rho = -0,065$	$\rho = -0,154$
DI	$\rho = 0,160$	$\rho = 0,132$	$\rho = 0,048$	$\rho = -0,092$	$\rho = -0,195$
Si ((mU/L) <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	$\rho = -0,195$	$\rho = -0,223$	$\rho = -0,256$	$\rho = -0,155$	$\rho = -0,094$
Sg (min <sup>-1</sup> )	$\rho = 0,019$	$\rho = 0,117$	$\rho = 0,098$	$\rho = 0,143$	$\rho = -0,042$
GEZI (min <sup>-1</sup> )	$\rho = -0,035$	$\rho = 0,036$	$\rho = 0,049$	$\rho = 0,103$	$\rho = 0,054$
Función célula $\beta$ (mU/mM)	$\rho = 0,201$	$\rho = 0,106$	$\rho = 0,167$	$\rho = -0,158$	$\rho = -0,041$
IR (mM·mU/L <sup>-2</sup> )	$\rho = 0,147$	$\rho = 0,084$	$\rho = 0,221$	$\rho = -0,136$	$\rho = 0,126$

<sup>1</sup> N = 35<sup>2</sup> N = 31

Tabla 16 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) al término del periodo de suplementación entre glucagón, y parámetros del modelo mínimo para el grupo control (N = 15).

	Glucagón basal (pg/mL)	Glucagón post glucosa (pg/mL)	Glucagón post insulina (pg/mL)	$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%)	$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%)
AIRg ( $\text{mU}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$ )	$\rho = -0,171$	$\rho = -0,164$	$\rho = -0,089$	$\rho = 0,057$	$\rho = 0,061$
DI	$\rho = -0,079$	$\rho = -0,004$	$\rho = 0,014$	$\rho = 0,136$	$\rho = 0,121$
Si ( $(\text{mU/L})^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$\rho = 0,338$	$\rho = 0,317$	$\rho = 0,386$	$\rho = 0,168$	$\rho = 0,261$
Sg ( $\text{min}^{-1}$ )	$\rho = -0,217$	$\rho = -0,178$	$\rho = -0,219$	$\rho = 0,117$	$\rho = -0,039$
GEZI ( $\text{min}^{-1}$ )	$\rho = -0,274$	$\rho = -0,166$	$\rho = -0,346$	$\rho = 0,233$	$\rho = -0,235$
Función célula $\beta$ (mU/mM)	$\rho = 0,018$	$\rho = -0,018$	$\rho = 0,093$	$\rho = -0,046$	$\rho = 0,282$
IR ( $\text{mM}\cdot\text{mU/L}^{-2}$ )	$\rho = 0,393$	$\rho = 0,436$	$\rho = 0,536 *$	$\rho = -0,229$	$\rho = 0,225$

\* P < 0,05.



Tabla 17 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) al término del periodo de suplementación entre glucagón y parámetros del modelo mínimo para el grupo suplementado (N = 13).

	Glucagón basal (pg/mL)	Glucagón post glucosa (pg/mL)	Glucagón post insulina (pg/mL)	$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%)	$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%)
AIRg ( $\text{mU}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$ )	$\rho = 0,011$	$\rho = -0,082$	$\rho = -0,033$	$\rho = -0,269$	$\rho = -0,011$
DI	$\rho = 0,253$	$\rho = 0,132$	$\rho = 0,137$	$\rho = -0,352$	$\rho = -0,060$
Si ( $(\text{mU/L})^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$\rho = 0,534$	$\rho = 0,430$	$\rho = 0,204$	$\rho = -0,154$	$\rho = -0,452$
Sg ( $\text{min}^{-1}$ )	$\rho = -0,168$	$\rho = 0,314$	$\rho = 0,160$	$\rho = 0,576 *$	$\rho = -0,334$
GEZI ( $\text{min}^{-1}$ )	$\rho = -0,267$	$\rho = 0,164$	$\rho = -0,009$	$\rho = 0,551$	$\rho = -0,215$
Función célula $\beta$ (mU/mM)	$\rho = -0,275$	$\rho = -0,154$	$\rho = 0,176$	$\rho = -0,104$	$\rho = 0,505$
IR ( $\text{mM}\cdot\text{mU/L}^{-2}$ )	$\rho = -0,305$	$\rho = -0,327$	$\rho = 0,085$	$\rho = -0,127$	$\rho = 0,550$

\* P < 0,05.

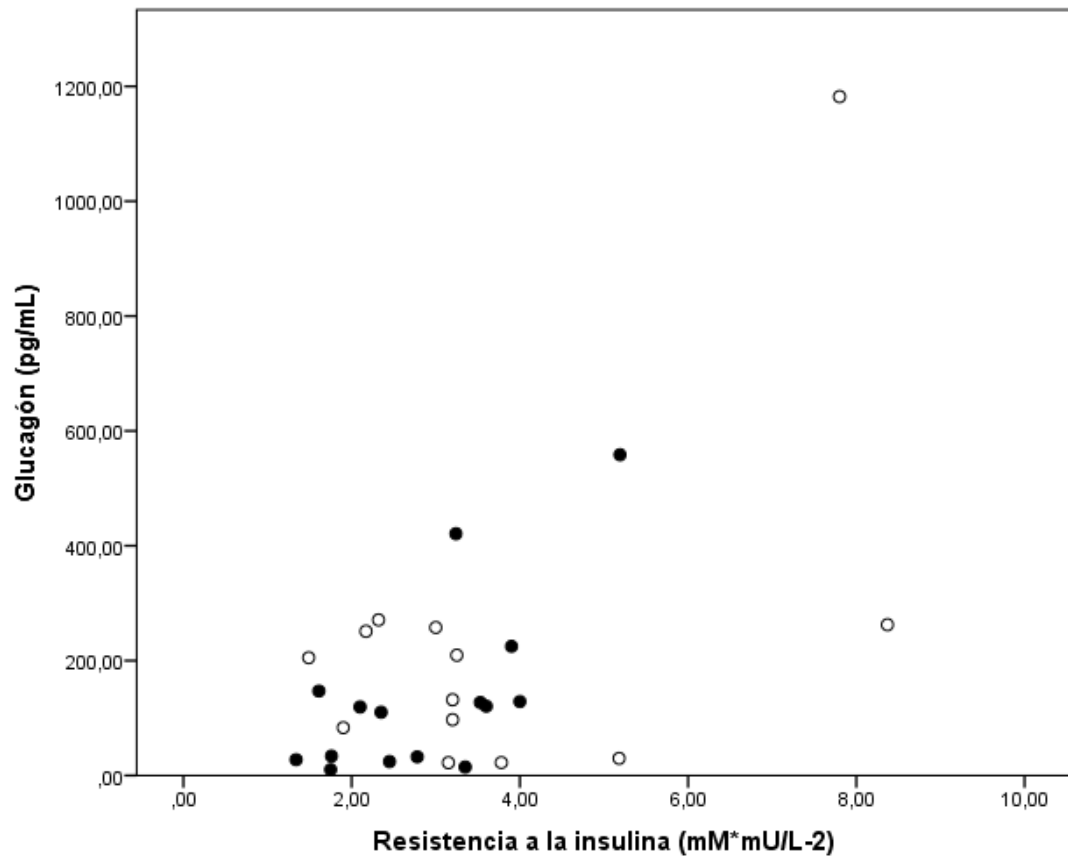


Figura 22: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la resistencia a la insulina al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

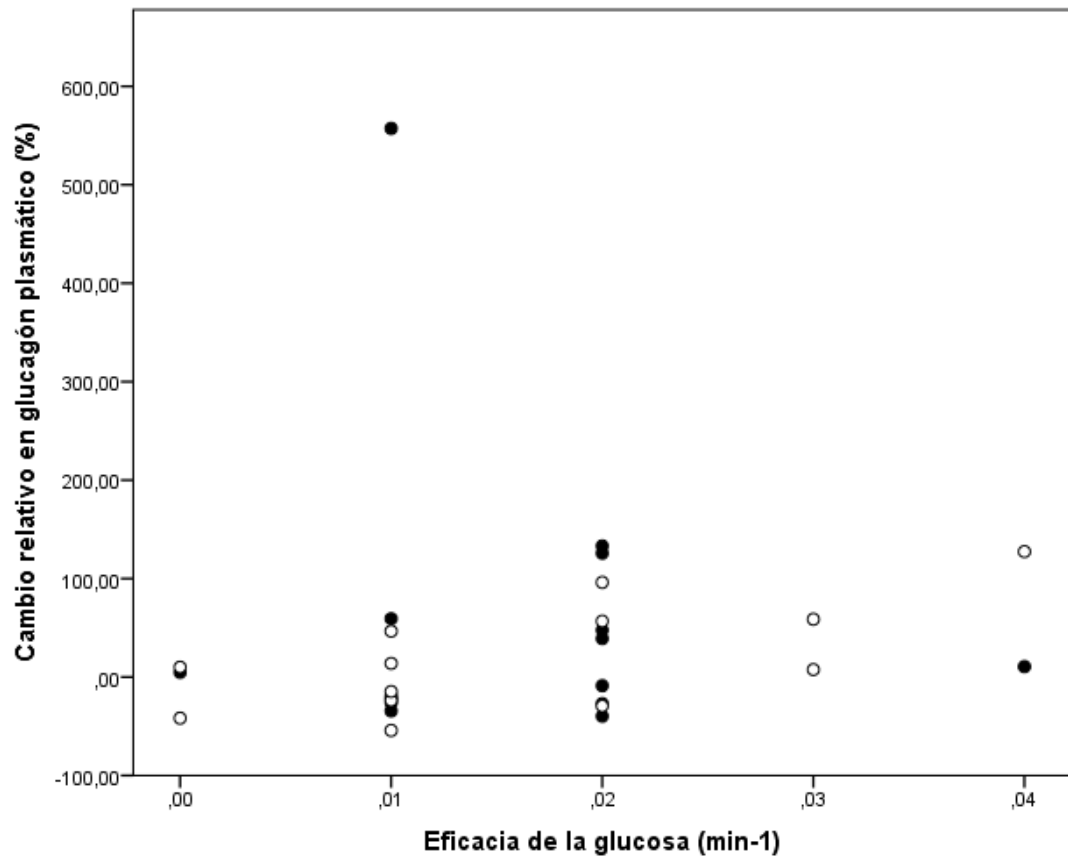


Figura 23: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa en función de la eficacia de la glucosa al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

### *Efecto del sobrepeso/obesidad sobre la secreción de glucagón y su relación con el Zn*

Como se mencionó anteriormente, la obesidad es uno de los principales factores de riesgo de desarrollar DM2, proponiéndose entre otros a la producción aumentada de citoquinas y adipocinas proinflamatorias, al depósito ectópico de lípidos, y a la disfunción mitocondrial, como posibles mecanismos responsables de inducir resistencia a la insulina y finalmente DM2 (Eckel *et al.* 2011). Sin embargo, poco se ha investigado respecto de la relación existente entre la obesidad y la secreción de glucagón, pudiendo ésta ser un potencial vínculo entre ambas patologías.

De distintos estudios que han evaluado la relación entre la obesidad y la secreción de glucagón, sólo algunos han observado un aumento en la secreción de éste en respuesta a la obesidad (Borghesi *et al.* 1984, Larsson y Ahren 1996, Knop *et al.* 2012), mientras que otros no han observado efecto alguno (Reaven *et al.* 1987, Inokuchi *et al.* 1989, Gastaldelli *et al.* 2000, Carroll *et al.* 2007). Weiss *et al.* observaron una menor concentración plasmática de glucagón en ayuno y una menor área bajo la curva para la concentración plasmática de glucagón durante un clamp euglicémico hiperinsulinémico en individuos normopeso y obesos con tolerancia normal a la glucosa respecto de individuos obesos con resistencia a la insulina o intolerancia a la glucosa (Weiss *et al.* 2011). De forma similar, en un estudio llevado a cabo en sujetos obesos metabólicamente sanos comparados con sujetos obesos metabólicamente en riesgo, Calanna *et al.* observaron menores niveles de glucagón en ayunas en los individuos obesos metabólicamente sanos (de acuerdo a HOMA-IR), así como una mayor reducción de la concentración de glucagón a los 30 minutos post-carga durante un OGTT (Calanna *et al.* 2013).

Estudios morfológicos de páncreas de animales obesos también han mostrado diferencias respecto de individuos normopesos. En ese sentido, Guardado-Mendoza *et al.* han descrito cambios morfológicos en el páncreas de babuinos que incluyen un aumento relativo en el volumen de células  $\alpha$  respecto del tamaño del páncreas en función de la duración y de la severidad de la obesidad, sugiriendo la presencia de adaptaciones morfológicas asociadas con una mayor secreción de glucagón. Sin embargo, estos aumentos disminuyeron progresivamente en la medida que aumentó la duración o la severidad de la obesidad por sobre el nivel asociado con el peak de incremento en el volumen relativo de células  $\alpha$  (Guardado-Mendoza *et al.* 2013). En ratones alimentados con una dieta alta en grasa durante 12 semanas y con tolerancia normal a la glucosa, Merino *et al.* observaron una hipoglucagonemia en ayunas y post-ingesta asociada con una disminución en el contenido y capacidad de secreción de glucagón en respuesta a la glucosa, así como una disminución de la masa de células  $\alpha$ . Sin embargo, a las 24 semanas del consumo de dieta alta en grasa, la disminución de la masa de células  $\alpha$  desapareció, observándose incluso un leve aumento, al igual que desapareció la hipoglucagonemia (Merino *et al.* 2015). A diferencia de lo descrito en animales, en el caso de estudios en humanos Inaishi *et al.* no observaron efectos atribuibles a la obesidad sobre la masa de células  $\alpha$ , aunque cabe considerar que este estudio se realizó

en trozos sanos de páncreas obtenidos de resecciones pancreáticas asociadas en su gran mayoría a neoplasias (Inaishi *et al.* 2016).

Distintos estudios han observado que individuos obesos presentan un estado nutricional de Zn disminuido en relación con individuos normopeso (Chen *et al.* 1997, Marreiro *et al.* 2002, Ozata *et al.* 2002, Torkanlou *et al.* 2016). Si se considera que una de las principales alteraciones presentes en la obesidad es la inflamación crónica de bajo grado (Gregor y Hotamisligil 2011), que esta es considerada uno de los principales mecanismos mediante los cuales la obesidad induce la resistencia a la insulina y favorece el desarrollo de la DM2 (Xu *et al.* 2003, Kwon y Pessin 2013, Kohlgruber y Lynch 2015), que el Zn potencialmente modula la inflamación y tiene efectos insulino-miméticos (ver *Rol del Zinc en la Regulación de la Secreción de Glucagón y Relación entre el Zn y la Diabetes Mellitus tipo 2*) y que éste se encuentra disminuido en los sujetos obesos, es posible especular que la suplementación con Zn puede tener algún impacto también en el efecto que la obesidad tiene sobre la secreción de glucagón.

En base a lo anterior, considerando que en los últimos años ha resurgido el interés en la relación entre obesidad y glucagón debido al posible efecto de este último sobre el gasto energético y que la mayoría de los estudios desarrollados a este respecto han evaluado el potencial terapéutico del glucagón respecto de la obesidad mediante la administración de agonistas (Habegger *et al.* 2010, Cho *et al.* 2012), sin profundizar mayormente respecto de los posibles vínculos de la obesidad con la secreción de glucagón, en este estudio se evaluó la asociación entre dos indicadores antropométricos de obesidad ligados al riesgo de desarrollar problemas metabólicos como son el IMC y la CC (Lee *et al.* 2008, Bhowmik *et al.* 2013) con la secreción y la supresión de la secreción de glucagón en las distintas condiciones evaluadas, las cuales se presentan en la Tabla 18 y Tabla 19 para las correlaciones observadas al ingreso y al término del periodo de suplementación, respectivamente.

Mientras que al ingreso sólo se observó una pequeña correlación inversa entre el IMC y el cambio relativo en la concentración plasmática de glucagón tras la infusión de glucosa (ver Figura 24), al año se observó en el grupo placebo una correlación positiva del IMC con la concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina y con el cambio relativo en la concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina, a la vez que se observó una correlación inversa entre el IMC y el cambio relativo en la concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de glucosa (ver Figura 25, Figura 26 y Figura 27).

En cuanto a lo observado con la circunferencia de cintura, mientras al ingreso ésta no mostró asociaciones significativas con la secreción o supresión de la secreción de glucagón, al año ésta se observó positivamente correlacionada con la concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina y con el cambio relativo en la concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina sólo en el grupo placebo (ver Figura 28 y Figura 29).

Las asociaciones observadas entre IMC y CC con la concentración y supresión de la secreción de glucagón tras la infusión de insulina sugieren que la suplementación con Zn modifica el efecto de la resistencia a la insulina en la respuesta de las células  $\alpha$ , hipótesis que es reforzada por el hecho de que pese a que al año la CC se correlaciona positivamente con la resistencia a la insulina en el ambos grupos ( $\rho = 0,638$ ,  $N = 15$ ,  $p = 0,010$  vs  $\rho = 0,775$ ,  $N = 13$ ,  $p = 0,002$ , para los grupos control y suplemento respectivamente), en el caso del IMC este se correlaciona positivamente con la resistencia a la insulina sólo en el grupo control, perdiéndose la asociación en el grupo suplementado ( $\rho = 0,613$ ,  $N = 15$ ,  $p = 0,015$  vs  $\rho = 0,341$ ,  $N = 13$ ,  $p = 0,254$ , para los grupos control y suplemento respectivamente).

En el caso de la débil correlación negativa observada al ingreso entre el IMC y la supresión de la secreción de glucagón tras la infusión de glucosa, esta es difícil de explicar, especialmente a la luz de los resultados observados al término de la intervención. Considerando que los pacientes al ingreso presentaron un patrón de secreción y supresión de la secreción de glucagón diferente, más cercano a lo esperado en un individuo sano, es posible que las alteraciones iniciales en el metabolismo hayan desencadenado mecanismos adaptativos similares a los descritos por Merino *et al.* en ratas, destinados a la mantención de la homeostasis de la glucosa, en las cuales la pérdida del efecto supresor de la insulina es compensado con una mayor respuesta de las células  $\alpha$  al efecto intrínseco de la glucosa. Sin embargo, también es posible que la ausencia de resultados significativos responda a una baja sensibilidad del kit utilizado en la determinación de la concentración plasmática de glucagón.

En síntesis, la concentración plasmática de glucagón en individuos con DM2 se asoció positivamente con el sobrepeso/obesidad en el grupo control, posiblemente relacionado con el efecto de la resistencia a la insulina. Aunque la suplementación con Zn suprimió esta asociación en el grupo que recibió el suplemento, esto no se tradujo en una reducción significativa de la concentración plasmática de glucagón.

Tabla 18 – Coeficientes de Correlación de Pearson (r) o Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón e Índice de Masa Corporal (IMC) y Circunferencia de Cintura (CC) al ingreso.

	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	CC (cm)
Glucagón basal (pg/mL)	r = -0,130	r = -0,094
Glucagón post glucosa (pg/mL)	r = -0,259	r = -0,150
Glucagón post insulina (pg/mL)	r = -0,209	r = -0,099
$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%) <sup>1</sup>	r = -0,345 *	r = -0,106
$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%) <sup>2</sup>	$\rho$ = 0,073	$\rho$ = 0,156

N = 36, \* P < 0,05.

<sup>1</sup> N = 35

<sup>2</sup> N = 31

Tabla 19 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón e Índice de Masa Corporal (IMC) y Circunferencia de Cintura (CC) al término del periodo de suplementación.

	IMC (kg/m <sup>2</sup> )		CC (cm)	
	Placebo	Suplemento	Placebo	Suplemento
Glucagón basal (pg/mL)	$\rho = 0,356$	$\rho = 0,302$	$\rho = 0,168$	$\rho = -0,127$
Glucagón post glucosa (pg/mL)	$\rho = 0,088$	$\rho = 0,286$	$\rho = 0,077$	$\rho = -0,144$
Glucagón post insulina (pg/mL)	$\rho = 0,569 *$	$\rho = 0,341$	$\rho = 0,542 *$	$\rho = 0,116$
$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%)	$\rho = -0,520 *$	$\rho = 0,093$	$\rho = -0,324$	$\rho = -0,050$
$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%)	$\rho = 0,674 **$	$\rho = 0,011$	$\rho = 0,683 **$	$\rho = 0,409$

N = 15/13 para los grupos placebo/suplemento, respectivamente. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01.



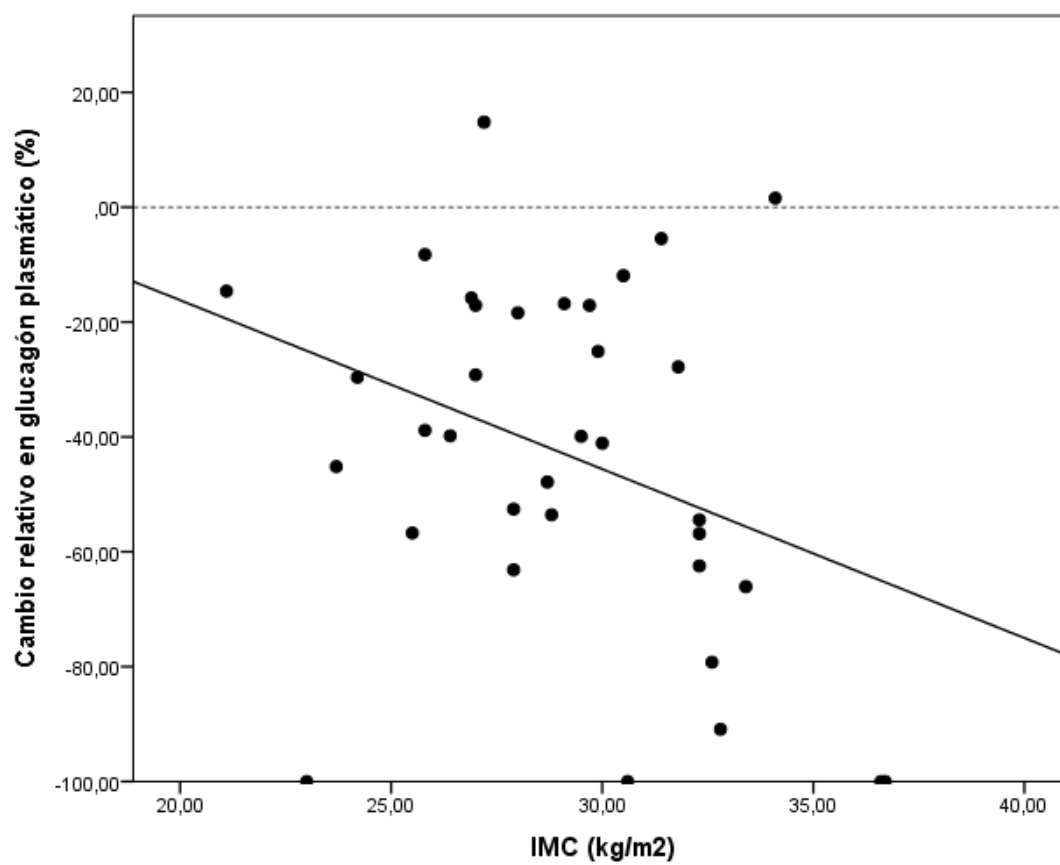


Figura 24: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa en función del IMC al ingreso.

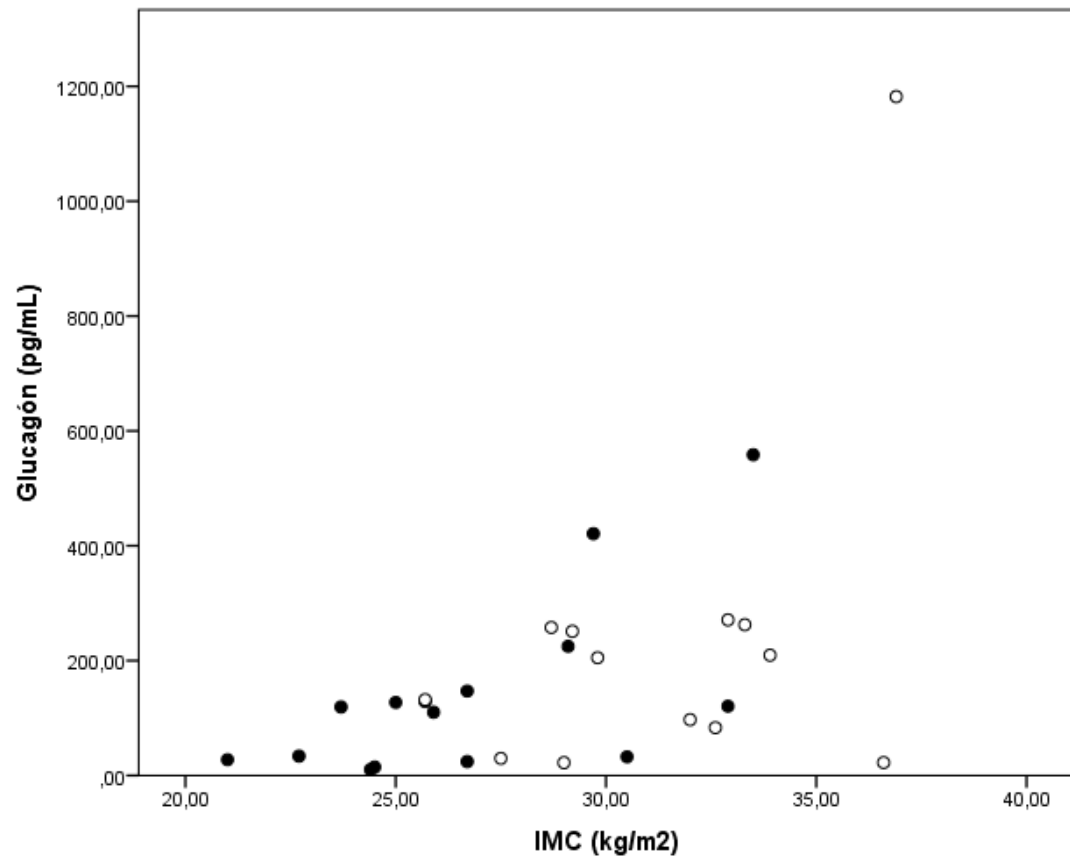


Figura 25: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función del IMC al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

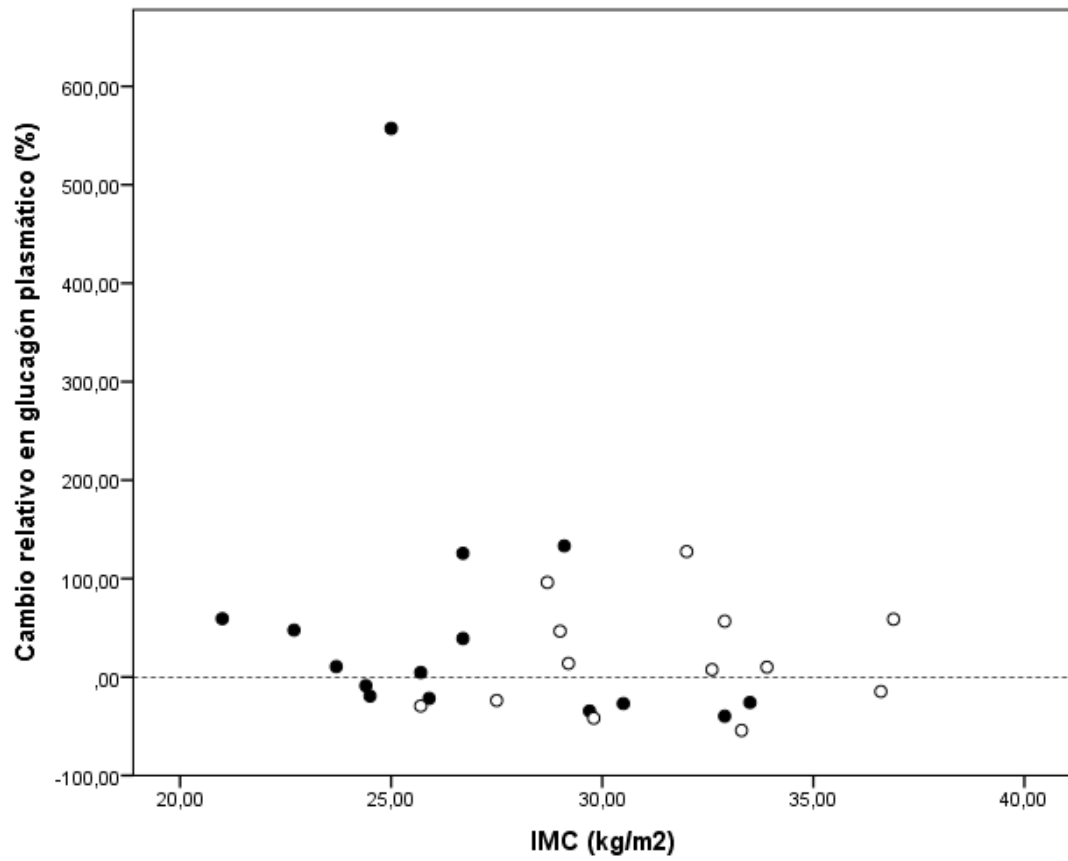


Figura 26: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa en función del IMC al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

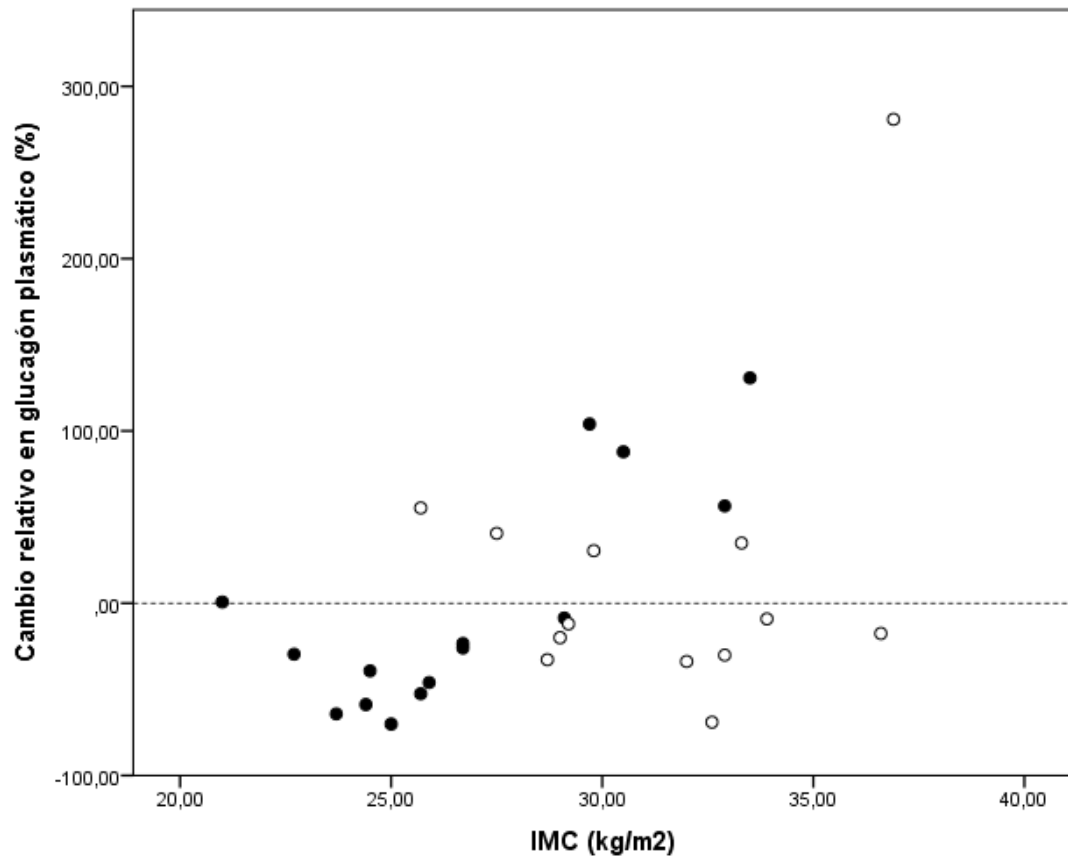


Figura 27: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de insulina en función del IMC al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

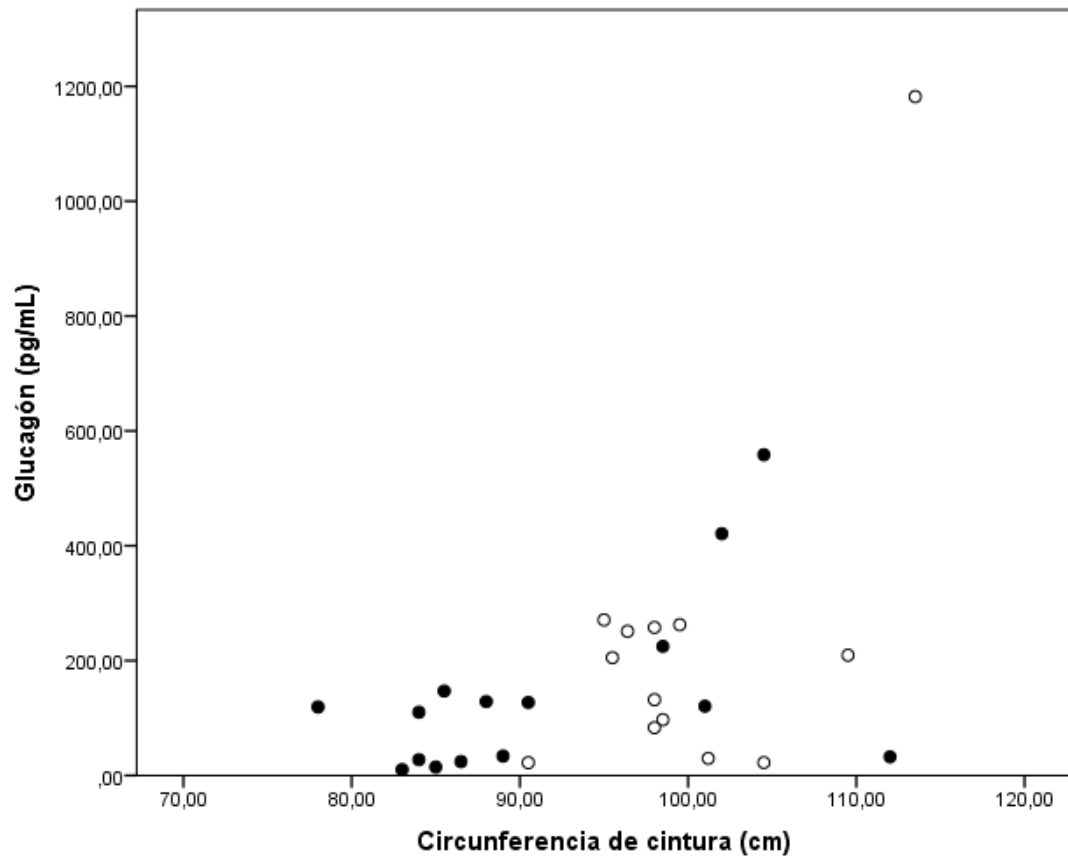


Figura 28: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la circunferencia de cintura al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

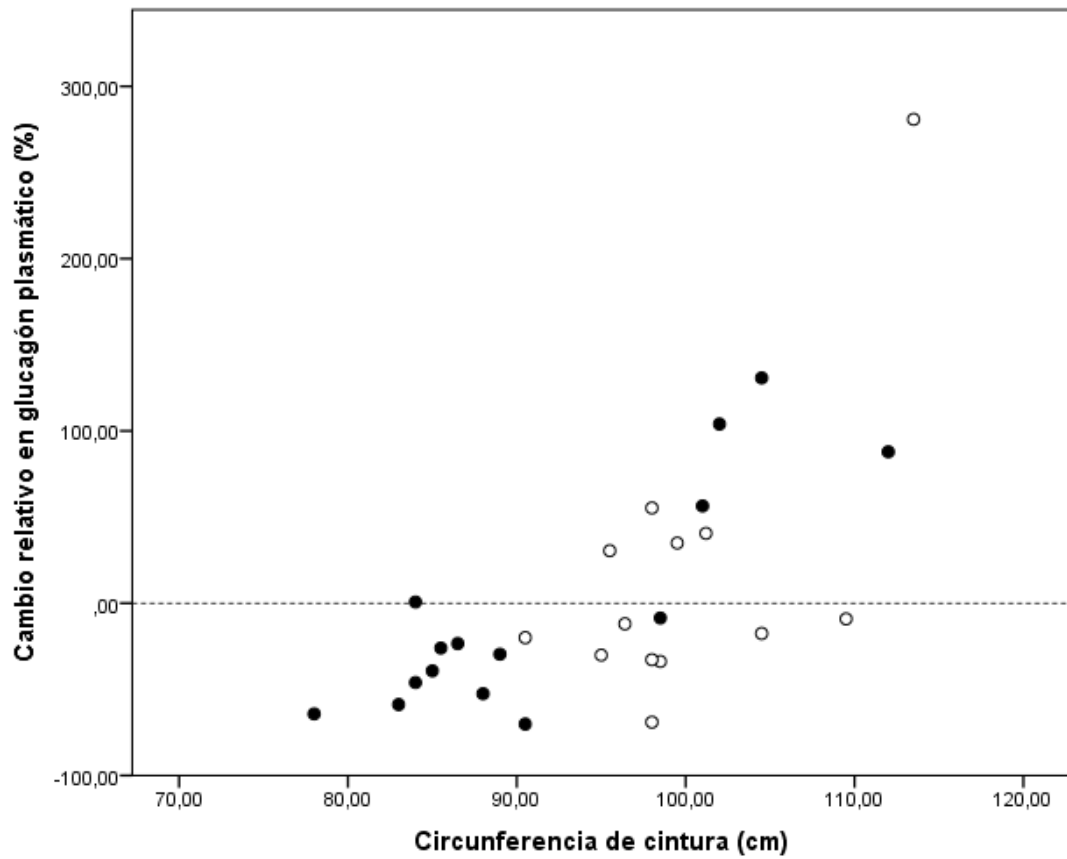


Figura 29: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de insulina en función de la circunferencia de cintura al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

### *Glucagón y lípidos plasmáticos: Efecto de la suplementación con Zn*

La dislipidemia se puede definir como un trastorno en la producción y remoción de lipoproteínas desde el plasma, encontrándose fuertemente asociada con la DM2. En ésta, la manifestación característica incluye la presencia de hipertrigliceridemia, disminución del colesterol HDL y transformación de las partículas de colesterol LDL en partículas más pequeñas y densas (Goldberg 2001, Mooradian 2009). Pese a que su fisiopatología no es del todo clara aún, la dislipidemia de la DM2 se ha vinculado principalmente con el efecto de la resistencia a la insulina, estando asociada con el aumento en el flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado, los cuales a su vez promueven la liberación de triglicéridos a la circulación (Goldberg 2001, Mooradian 2009). Adicionalmente, se ha descrito que la resistencia a la insulina podría inducir alteraciones en la producción y secreción de ciertas apolipoproteínas, en la regulación de la lipoproteína lipasa (LpL) y en la regulación de la transferasa de ésteres de colesterol (*Cholesterol Ester Transfer Protein*, CETP) (Goldberg 2001).

Distintos estudios que han investigado el efecto del glucagón sobre el metabolismo lipídico han observado que éste disminuye la concentración de colesterol y triglicéridos a nivel de diferentes lipoproteínas (Habegger *et al.* 2010). Sin embargo, no existe información respecto del efecto que la dislipidemia tiene a nivel de la regulación de la secreción de glucagón. Estudios *in vitro* han mostrado que la exposición por corto tiempo de las células  $\alpha$  a distintos ácidos grasos estimula la secreción de glucagón, siendo este efecto dependiente, entre otros factores, de la longitud de la cadena y del grado de insaturación de éstos (Hong *et al.* 2005). También se ha descrito, como se mencionó anteriormente, que la exposición por periodos prolongados de células  $\alpha$  a palmitato induce en éstas el desarrollo de resistencia a la insulina, modificando la expresión, síntesis y secreción de glucagón (Piro *et al.* 2010). Considerando que el flujo aumentado de ácidos grasos libres hacia el hígado es parte de la fisiopatología de la dislipidemia, es posible que éstos ácidos grasos también produzcan algún efecto a nivel de las células  $\alpha$ .

Dado que el Zn es capaz de disminuir el colesterol total y el colesterol LDL e inducir aumentos en el colesterol HDL en pacientes con DM2 (ver página 20) y que es posible que los lípidos plasmáticos tengan algún efecto sobre la secreción de glucagón, es posible también que el Zn tenga efectos en como los lípidos plasmáticos se relacionan con la secreción de glucagón, por lo que se evaluaron las posibles correlaciones existentes entre los niveles de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, relación entre colesterol total y colesterol HDL y triglicéridos plasmáticos con la secreción y supresión de la secreción de glucagón tanto al ingreso como al término del periodo de intervención. Estos valores se presentan en la Tabla 20, Tabla 21 y Tabla 22.

Aunque al ingreso no se observaron correlaciones significativas entre los lípidos plasmáticos y la concentración plasmática de glucagón, al término de la intervención sí se observaron correlaciones positivas significativas entre la concentración de colesterol

total y colesterol LDL con la concentración plasmática de glucagón en ayunas y luego de la infusión de insulina (ver Figura 30 y Figura 31), aunque sólo en el grupo que recibió el placebo. Considerando la alta correlación observada entre el colesterol total y el colesterol LDL ( $r = 0,928$ ,  $N = 15$ ,  $p < 0,001$  para el grupo placebo; ver Figura 32) es probable que la asociación observada entre la concentración plasmática de glucagón en ayunas y luego de la infusión de insulina con el colesterol total tan sólo sea un reflejo de la relación existente con el colesterol LDL.

Como se mencionó anteriormente, no existe información disponible respecto de como la dislipidemia afecta la regulación de la secreción de glucagón. Siendo la dislipidemia de la DM2 atribuida principalmente al efecto producido por la resistencia a la insulina, lo más probable es que las correlaciones observadas entre la concentración plasmática de glucagón en ayunas y tras la infusión de insulina con el colesterol LDL respondan a esta misma condición, encontrándose una correlación significativa entre el colesterol LDL al año y la resistencia a la insulina calculada durante el FSIVGTT ( $r = 0,520$ ,  $N = 15$ ,  $P = 0,047$ ). La ausencia de correlaciones en el grupo suplementado se encuentra en línea con lo propuesto anteriormente en cuanto a que la suplementación con Zn afecta la respuesta de las células  $\alpha$  a la insulina, posiblemente atenuando la resistencia a la insulina de éstas.



Tabla 20 – Coeficientes de Correlación de Pearson (r) o Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón y lípidos plasmáticos al ingreso.

	Glucagón basal (pg/mL)	Glucagón post glucosa (pg/mL)	Glucagón post insulina (pg/mL)	$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%) <sup>1</sup>	$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%) <sup>2</sup>
Colesterol total (mg/dL)	r = -0,144	r = -0,055	r = 0,008	r = 0,010	$\rho$ = -0,065
Colesterol HDL (mg/dL)	$\rho$ = 0,022	$\rho$ = 0,073	$\rho$ = 0,124	$\rho$ = 0,095	$\rho$ = 0,046
Colesterol LDL (mg/dL)	r = -0,243	r = -0,158	r = -0,099	r = -0,036	$\rho$ = -0,030
Colesterol VLDL (mg/dL)	r = 0,279	r = 0,246	r = 0,231	r = -0,020	$\rho$ = -0,161
Relación Col. total/HDL (mg/dL)	$\rho$ = -0,124	$\rho$ = -0,140	$\rho$ = -0,110	$\rho$ = -0,135	$\rho$ = -0,009
Triglicéridos plasmáticos (mg/dL)	r = 0,279	r = 0,246	r = 0,232	r = -0,020	$\rho$ = -0,159

N = 36.

<sup>1</sup> N = 35<sup>2</sup> N = 31

Tabla 21 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) al término del periodo de suplementación entre glucagón y lípidos plasmáticos al año para el grupo control.

	Glucagón basal (pg/mL)	Glucagón post glucosa (pg/mL)	Glucagón post insulina (pg/mL)	$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%)	$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%)
Colesterol total (mg/dL)	$\rho = 0,529 *$	$\rho = 0,218$	$\rho = 0,600 *$	$\rho = -0,354$	$\rho = 0,404$
Colesterol HDL (mg/dL)	$\rho = -0,179$	$\rho = -0,148$	$\rho = 0,023$	$\rho = 0,331$	$\rho = 0,138$
Colesterol LDL (mg/dL)	$\rho = 0,650 **$	$\rho = 0,414$	$\rho = 0,704 **$	$\rho = -0,346$	$\rho = 0,321$
Colesterol VLDL (mg/dL)	$\rho = -0,109$	$\rho = -0,386$	$\rho = -0,243$	$\rho = -0,440$	$\rho = 0,077$
Relación Col. total/HDL (mg/dL)	$\rho = 0,511$	$\rho = 0,389$	$\rho = 0,383$	$\rho = -0,472$	$\rho = 0,065$
Triglicéridos plasmáticos (mg/dL)	$\rho = 0,121$	$\rho = -0,400$	$\rho = -0,246$	$\rho = -0,436$	$\rho = 0,086$

N = 15. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01.

Tabla 22 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) al término del periodo de suplementación entre glucagón y lípidos plasmáticos al año para el grupo suplementado

	Glucagón basal (pg/mL)	Glucagón post glucosa (pg/mL)	Glucagón post insulina (pg/mL)	$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%)	$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%)
Colesterol total (mg/dL)	$\rho = -0,291$	$\rho = -0,115$	$\rho = -0,093$	$\rho = 0,253$	$\rho = -0,159$
Colesterol HDL (mg/dL)	$\rho = 0,096$	$\rho = 0,539$	$\rho = 0,305$	$\rho = 0,498$	$\rho = -0,459$
Colesterol LDL (mg/dL)	$\rho = -0,324$	$\rho = -0,363$	$\rho = -0,286$	$\rho = 0,044$	$\rho = -0,055$
Colesterol VLDL (mg/dL)	$\rho = 0,181$	$\rho = 0,214$	$\rho = 0,385$	$\rho = 0,225$	$\rho = 0,297$
Relación Col. total/HDL (mg/dL)	$\rho = -0,170$	$\rho = -0,484$	$\rho = -0,236$	$\rho = -0,264$	$\rho = 0,385$
Triglicéridos plasmáticos (mg/dL)	$\rho = 0,181$	$\rho = 0,214$	$\rho = 0,385$	$\rho = 0,225$	$\rho = 0,297$

N = 13.

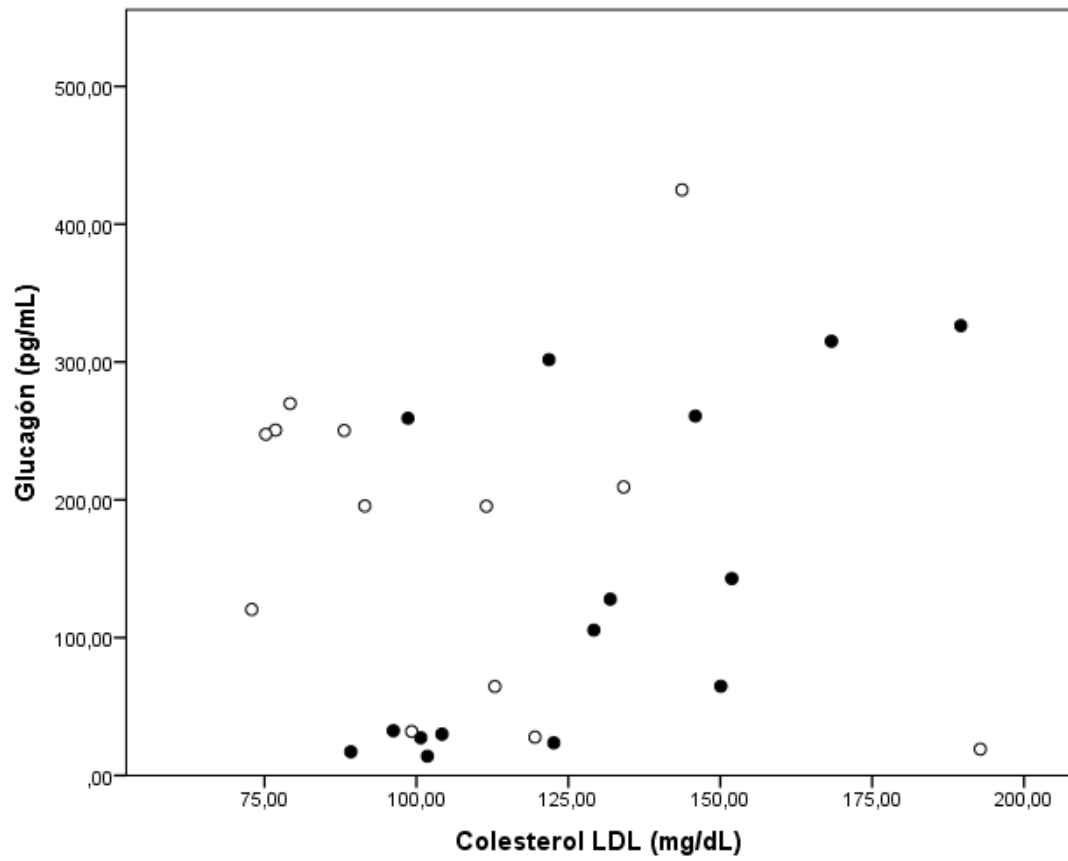


Figura 30: Concentración plasmática de glucagón en ayunas en función de la concentración plasmática de colesterol LDL al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

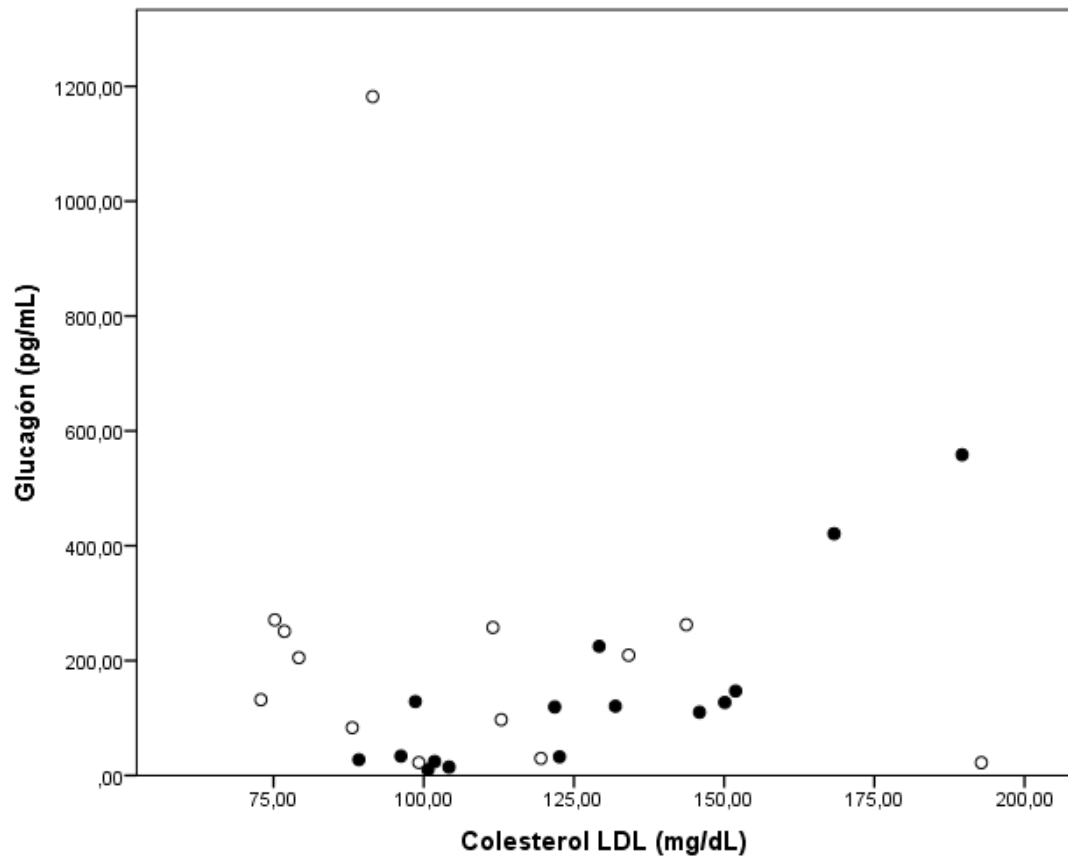


Figura 31: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la concentración plasmática de colesterol LDL al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

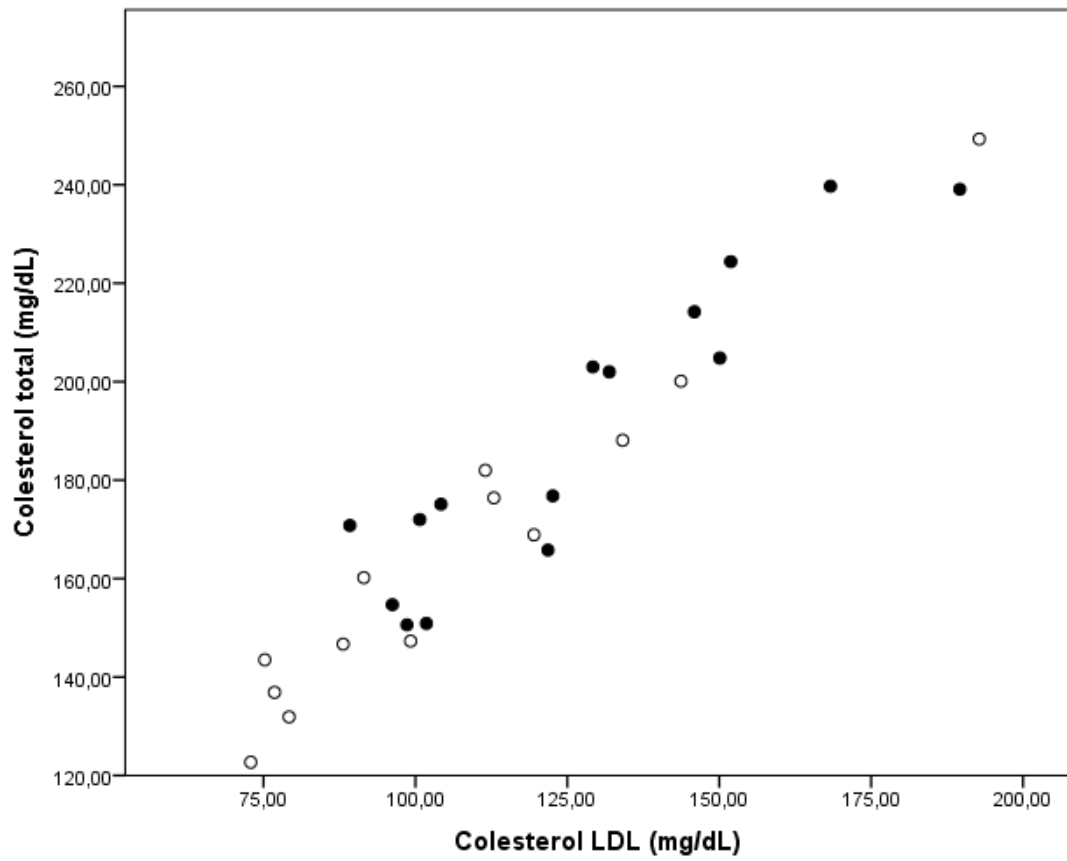


Figura 32: Concentración plasmática de colesterol total en función de la concentración plasmática de colesterol LDL al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

### *Efecto de la suplementación con Zn sobre la relación entre la secreción de glucagón y el estado inflamatorio*

Los resultados de PCRus se pueden observar en la Tabla 23. La PCR es una proteína de fase aguda producida y secretada por los hepatocitos frente a la acción de IL-6, efecto que es potenciado por la presencia de IL-1 $\beta$  (Zhang *et al.* 1996, Black *et al.* 2004). Esta proteína es capaz de unirse a múltiples ligandos presentes en bacterias o expuestos en la superficie de células dañadas o apoptóticas, lo cual desencadena una serie de respuestas entre las que se cuentan la activación del complemento y la estimulación de la fagocitosis (Black *et al.* 2004).

Al ser la inflamación crónica de bajo grado parte importante de la fisiopatología de la DM2, no es de extrañar que la PCR, junto con la IL-6, hayan sido descritas como buenos predictores de esta enfermedad (Wang *et al.* 2013). Sin embargo, existe poca información respecto del efecto que esta inflamación tiene sobre el funcionamiento de las células  $\alpha$ . Al respecto, se ha descrito que las células  $\alpha$  expresan el receptor de IL-6 y que ésta induce un aumento en la expresión y en la secreción de glucagón, a la vez que aumenta la proliferación de estas células y las protege de la glucolipotoxicidad (Ellingsgaard *et al.* 2008). Además, se ha descrito también que la IL-6 aumenta la producción y secreción de GLP-1 por parte de las células  $\alpha$  (Ellingsgaard *et al.* 2011).

Considerando el efecto del Zn sobre la producción y secreción de diversas citoquinas y sobre las vías de señalización de éstas, se evaluaron las correlaciones existentes entre la concentración de PCRus al ingreso y al término de la suplementación con la concentración plasmática y la supresión de la secreción de glucagón.

Como se puede ver en la Tabla 23, la determinación de los niveles de PCRus no mostró diferencias entre los grupos control y suplementado ni al ingreso ni al término del periodo de intervención. De igual forma, no se observaron diferencias entre ambos grupos en cuanto al cambio en la concentración de PCRus entre el ingreso y el término del estudio.

En cuanto a la asociación entre la PCRus y el glucagón, no se observaron correlaciones significativas entre la concentración plasmática de éste y la PCRus al ingreso, aunque al término del estudio el grupo placebo sí presentó una correlación positiva entre la concentración plasmática de PCRus y la concentración plasmática de glucagón en ayunas, mientras que ambos grupos presentaron una correlación positiva con la concentración plasmática de glucagón tras la infusión de insulina (ver Tabla 24, Figura 33 y Figura 34). La menor significancia estadística observada en las correlaciones presentadas por el grupo suplementado sugiere que la suplementación con Zn disminuye el efecto que la inflamación tiene sobre la secreción de glucagón, pese a que en este caso particular no fue capaz de suprimir ésta asociación completamente.

Es importante de considerar nuevamente que los pacientes reclutados se encontraban en un estado metabólico bien controlado, con niveles de inflamación relativamente bajos de

acuerdo a los niveles de PCRus observados. Por este motivo es posible que pacientes con un estado inflamatorio más severo puedan verse mayormente beneficiados de la suplementación con Zn. Respecto de las diferencias en las asociaciones observadas entre el ingreso y el término del estudio, es posible que la presencia de correlaciones entre la PCRus y la concentración plasmática de glucagón exclusivamente al final del estudio se deba a la progresión natural de la enfermedad. Debido a lo exigente de los criterios de inclusión y exclusión es posible que los pacientes al ingreso todavía no manifestaran una afectación metabólica tan severa como para presentar una desregulación en la secreción de glucagón asociada con el estado inflamatorio, presentándose ésta solamente al cabo de transcurrido un año desde el inicio. Sin embargo, no es posible descartar que el cambio en la técnica de determinación de glucagón tenga relación con los cambios observados en las correlaciones al término del periodo de suplementación.



Tabla 23 - Proteína C Reactiva ultrasensible al ingreso y al término del periodo de suplementación. Los valores se presentan como mediana [Q1 – Q3].

	Placebo	Suplemento	P
Proteína C Reactiva ultrasensible al ingreso (mg/L)	3,19 [1,88 – 6,64]	5,63 [2,94 – 9,02]	0,160
N	20	16	
Proteína C Reactiva ultrasensible al año (mg/L)	2,30 [1,30 – 3,00]	2,40 [1,55 – 4,90]	0,299
N	15	13	
$\Delta$ Proteína C Reactiva ultrasensible entre ingreso y año (mg/L)	-0,80 [-5,20 – 0,30]	-2,40 [-6,40 – 1,70]	0,712
N	15	13	

Diferencias entre tratamientos fueron evaluadas mediante prueba de la U de Mann Whitney.

Tabla 24 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón y PCR (mg/L) al ingreso y al término del periodo de suplementación.

	Ingreso (N = 36)	Post suplementación	
		Placebo (N = 15)	Suplemento (N = 13)
Glucagón basal (pg/mL)	$\rho = -0,323$	$\rho = 0,671^{**}$	$\rho = 0,143$
Glucagón post glucosa (pg/mL)	$\rho = -0,238$	$\rho = 0,401$	$\rho = 0,506$
Glucagón post insulina (pg/mL)	$\rho = -0,241$	$\rho = 0,704^{**}$	$\rho = 0,569^*$
$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%)	$\rho = -0,107^1$	$\rho = -0,485$	$\rho = 0,443$
$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%)	$\rho = -0,211^2$	$\rho = 0,489$	$\rho = -0,052$

\* P < 0,05; \*\* P < 0,01.

<sup>1</sup> N = 35

<sup>2</sup> N = 31

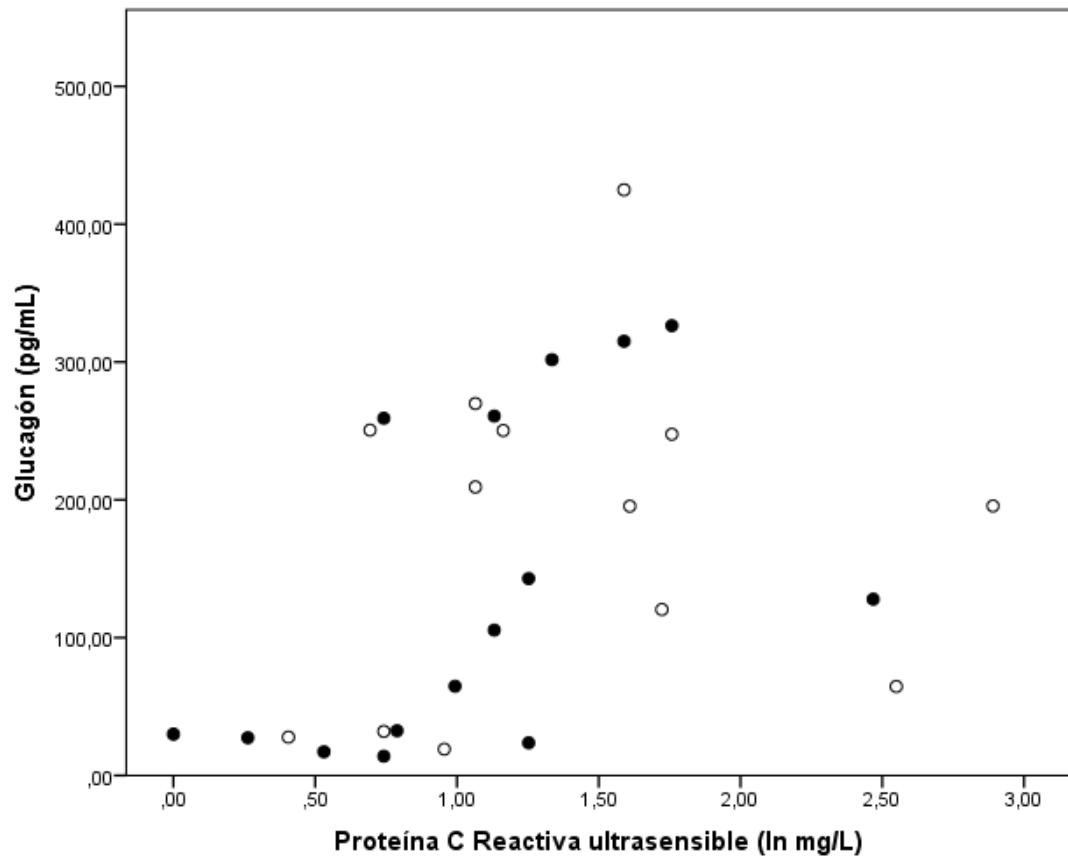


Figura 33: Concentración plasmática de glucagón en ayunas en función de la transformación logarítmica en base e de la concentración plasmática de Proteína C Reactiva ultrasensible al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

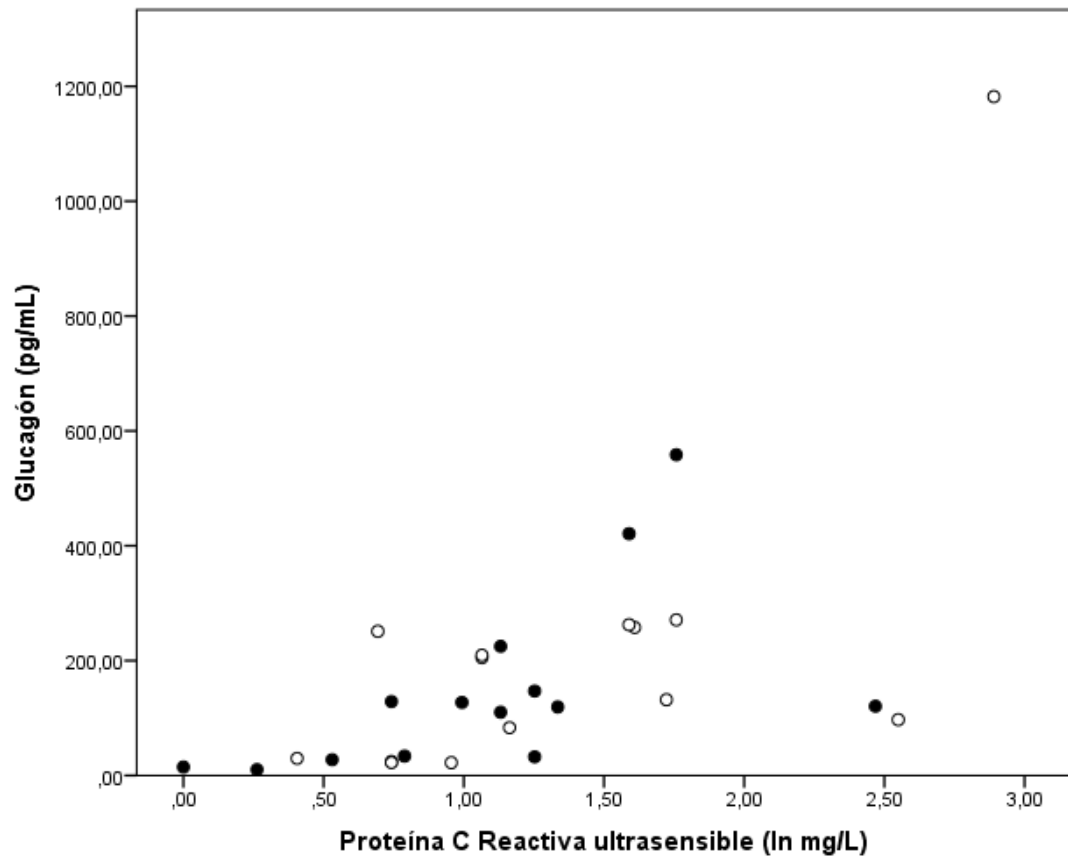


Figura 34: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la transformación logarítmica en base e de la concentración plasmática de Proteína C Reactiva ultrasensible al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

### *Impacto del estrés oxidativo sobre la secreción de glucagón y efecto de la suplementación con Zn*

Se puede definir al estrés oxidativo como el resultado del desequilibrio entre la producción de especies moleculares altamente reactivas y la capacidad del organismo para neutralizarlas (Rahal *et al.* 2014). Este desbalance puede ser consecuencia de una producción aumentada de especies reactivas, de una disminución de la capacidad antioxidante o de ambas, lo cual lleva a la generación de daño tisular debido a la oxidación de múltiples moléculas de importancia biológica incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Kohen y Nyska 2002, Rahal *et al.* 2014).

El estrés oxidativo ha sido implicado en la fisiopatología de múltiples enfermedades, incluyendo enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas, cardiovasculares y DM entre otras (Rahal *et al.* 2014), siendo el estrés oxidativo en esta última enfermedad la consecuencia del flujo incrementado de glucosa y de ácidos grasos libres. En el caso del flujo incrementado de glucosa, los mecanismos involucrados en la producción de estrés oxidativo estarían relacionados con 1) un aumento en la vía del sorbitol (o polirol), lo que llevaría a una reducción en la concentración de NADPH y una disminución en la síntesis de glutatión, 2) la generación de productos avanzados de glicosilación (*Advanced Glycation End Products*, AGE), los cuales mediante su interacción con el receptor de AGEs producirían un incremento en los ROS debido a la activación de la NADPH oxidasa, 3) la activación de la vía de DAG-PKC y la activación de NF- $\kappa$ B y 4) el aumento en la generación de ROS a nivel de la cadena transportadora de electrones (Rains y Jain 2011). En el caso de los ácidos grasos, sus efectos sobre el estrés oxidativo incluirían un aumento en el desacople de la fosforilación oxidativa y el aumento de la generación de ROS, la disminución del glutatión intracelular y la activación de PKC (Evans *et al.* 2003).

En el caso de la DM, el efecto del estrés oxidativo estaría mediado además de por el daño directo de las especies reactivas sobre las distintas macromoléculas, por su interacción con diferentes vías de señalización, incluyendo las vías de NF- $\kappa$ B, JNK/SAPK y p38 MAPK. La activación de estas quinasas como consecuencia de la exposición al ambiente prooxidante estaría vinculada con la generación de resistencia a la insulina producto de la fosforilación de distintos componentes de la cascada de la señalización de la insulina en residuos de serina, siendo particularmente importante la fosforilación de IRS (Rains y Jain 2011). Aparte del efecto sobre la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo en las células  $\beta$  llevaría a defectos en la secreción de insulina, pese a que niveles controlados de especies reactivas son necesarios para una adecuada secreción de ésta (Keane *et al.* 2015).

La información respecto del efecto del estrés oxidativo sobre la secreción de glucagón es escasa, siendo el único antecedente disponible lo reportado por Allister *et al.*, quienes observaron que la preincubación de islotes pancreáticos de ratón con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produjo un aumento en la secreción de glucagón frente a altas concentraciones de glucosa y una

disminución de la secreción de glucagón frente a concentraciones bajas (Allister *et al.* 2013).

Considerando la falta de información respecto del rol del estrés oxidativo en la regulación de la secreción de glucagón, además del reconocido efecto antioxidante del Zn, se evaluaron las asociaciones entre diferentes indicadores de estrés oxidativo y la concentración y secreción de glucagón al ingreso y al término de la suplementación, presentándose los datos de indicadores de estrés oxidativo en la Tabla 25, mientras que las correlaciones observadas entre los distintos indicadores de estrés oxidativo y la concentración plasmática de glucagón al ingreso y al término de la suplementación se presentan en la Tabla 26, Tabla 27 y Tabla 28.

Como se puede apreciar en la Tabla 25, la suplementación con Zn no mostró ningún efecto significativo sobre el comportamiento de los indicadores de estrés oxidativo. Sin embargo, al término del estudio se observaron correlaciones inversas entre la concentración plasmática de isoprostanos y las concentraciones plasmáticas de glucagón tras la infusión de glucosa y tras la infusión de insulina sólo en el grupo control (ver Figura 36 y Figura 37), mientras que el grupo suplementado mostró una correlación positiva entre la actividad de la glutatión peroxidasa y la concentración plasmática de glucagón basal. En cuanto a las correlaciones al ingreso, sólo se presentó una correlación negativa entre el TBARS y el cambio relativo en la concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de glucosa (ver Figura 35).

Las correlaciones observadas entre TBARS e isoprostanos con la concentración plasmática de glucagón y con la supresión de éste tras la infusión de glucosa difieren de los resultados observados *in vitro* por Allister *et al.* En este sentido, los resultados observados en este estudio sugieren que los aumentos en el estado oxidativo (al menos en los niveles aquí reportados) se asocian con una supresión y no con un aumento de la secreción de glucagón. Debe considerarse, sin embargo, que mientras que los resultados de Allister *et al.* fueron observados mediante la aplicación directa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de cultivo de células  $\alpha$ , los resultados de este estudio son consecuencia de la interacción de múltiples estímulos, siendo los niveles de TBARS e isoprostanos indicadores del estado oxidativo general de los individuos y no pudiendo ser extrapolados a la condición particular de un tipo celular. Pese a esto, los resultados sugieren que un mayor grado de stress oxidativo en los rangos aquí observados se asocia con una mayor supresión de la secreción de glucagón en respuesta a la glucosa y a la insulina.

Considerando que la DM se asocia con un aumento en el estrés oxidativo y con la presencia de hiperglucagonemia absoluta o relativa, resulta contradictorio que un aumento en el estrés oxidativo se correlacione negativamente con la concentración y supresión de glucagón. Una posible explicación sería que los niveles de estrés oxidativo presentes en estos pacientes están en el rango necesario para mantener niveles adecuados de especies reactivas a nivel de células  $\alpha$ , las cuales serían necesarias para llevar a cabo una correcta señalización intracelular. En ese sentido, si niveles controlados de especies reactivas son requeridos para llevar a cabo labores de señalización intracelular en células

$\beta$ , resulta razonable pensar que las especies reactivas puedan participar también de una adecuada regulación de la secreción de glucagón.

En el caso de los individuos que recibieron suplementación con Zn, al igual como se describió para el caso de las asociaciones observadas entre concentraciones plasmáticas de glucagón y mediciones antropométricas o concentraciones plasmáticas de glucagón y valores de colesterol plasmático, nuevamente se observa que frente a la suplementación con Zn las correlaciones presentes en el grupo control pierden significancia, pese a que esto no estuvo asociado con modificaciones significativas en la concentración plasmática de isoprostanos. Aunque esto podría reflejar un efecto específico del Zn a nivel de las células  $\alpha$ , es imposible afirmarlo con los datos obtenidos en este estudio.

Respecto de la asociación observada entre la concentración de glucagón en ayunas y la actividad de GPX en el grupo suplementado, esta relaciona una disminución de la capacidad antioxidante con una mayor concentración de glucagón plasmático en ayunas, característica propia de los pacientes con DM2. Sin embargo, por qué esta asociación se presenta sólo en los individuos suplementados y no en los pacientes controles resulta una incógnita.

Para concluir, para conocer por qué la suplementación con Zn disminuye la asociación entre la respuesta de la célula alfa a la glucosa e insulina y el nivel de estrés oxidativo de los pacientes con DM2 y cómo es que el Zn afecta la relación entre el glucagón en ayunas y la actividad de GPX se requiere de posteriores estudios, los cuales deben ir dirigidos específicamente a evaluar la respuesta de la célula  $\alpha$  al estrés oxidativo. De cualquier modo, los resultados de este estudio sugieren que la secreción de glucagón se ve afectado por el nivel de estrés oxidativo presente en los pacientes con DM2.

Tabla 25 - Estado oxidativo al ingreso y al término del periodo de suplementación.

	Ingreso			Post-suplementación			P ( $\Delta$ ingreso-término)
	Placebo	Suplemento	P	Placebo	Suplemento	P	
TBARS (mmol/mol)	1,11 [0,95 – 1,44]	1,28 [1,06 – 2,54]	0,356	1,19 [0,97 – 1,55]	1,47 [1,18 – 1,63]	0,222	1,000
N	20	16		15	13		
Glutación total (mM)	2,07 $\pm$ 0,69	2,18 $\pm$ 0,75	0,634 <sup>1</sup>	1,26 $\pm$ 0,60	1,22 $\pm$ 0,61	0,854 <sup>1</sup>	0,407 <sup>1</sup>
N	19	16		15	13		
Glutación reducido (mM)	0,077 [0,034 – 0,121]	0,076 [0,042 – 0,119]	0,643	0,078 [0,043 – 0,109]	0,034 [0,013 – 0,085]	0,080	0,259
N	19	16		15	13		
Glutación reducido/ Glutación total	0,036 [0,023 – 0,063]	0,052 [0,021 – 0,056]	0,667	0,065 [0,043 – 0,101]	0,026 [0,013 – 0,081]	0,134	0,069
N	19	16		15	13		
Glutación Peroxidasa (mU/mL)	3835 [2323 – 6533]	5664 [2843 – 7197]	0,246	5933 [3999 – 10838]	6039 [2157 – 31455]	0,926	0,758
N	19	16		12	11		
Isoprostanos (pg/mL)	16,10 [13,70 – 25,20]	14,72 [10,23 – 22,60]	0,562	13,80 [12,70 – 18,00]	18,10 [14,05 – 26,15]	0,056	0,887 <sup>1</sup>
N	19	16		15	13		

Los datos se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar o como mediana [Q1 – Q3]. Diferencias entre tratamientos fueron evaluadas utilizando la prueba de la U de Mann-Whitney.

<sup>1</sup> Prueba de t de Student para muestras independientes.



Tabla 26 – Coeficientes de Correlación de Pearson (r) o Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón e indicadores de estrés oxidativo al ingreso.

	Glucagón basal (pg/mL)	Glucagón post glucosa (pg/mL)	Glucagón post insulina (pg/mL)	$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%)	$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%)
TBARS (mmol/mol)	$\rho = -0,217$	$\rho = -0,293$	$\rho = -0,310$	$\rho = -0,423 *$	$\rho = -0,233$
N	36	36	36	35	31
Glutación total (mM)	$r = 0,033$	$r = -0,074$	$r = 0,031$	$r = -0,063$	$\rho = 0,073$
N	35	35	35	35	31
Glutación reducido (mM)	$\rho = -0,050$	$\rho = 0,123$	$\rho = 0,130$	$\rho = 0,277$	$\rho = -0,024$
N	35	35	35	35	31
Glutación reducido/ Glutación total	$\rho = -0,019$	$\rho = 0,136$	$\rho = 0,052$	$\rho = 0,258$	$\rho = -0,106$
N	35	35	35	35	31
Glutación Peroxidasa (mU/mL)	$r = 0,048$	$r = 0,068$	$r = 0,019$	$r = 0,139$	$\rho = -0,118$
N	35	35	35	35	31
Isoprostanos (pg/mL)	$\rho = 0,074$	$\rho = 0,045$	$\rho = 0,093$	$\rho = -0,096$	$\rho = 0,014$
N	35	35	35	35	31

\*  $P < 0,05$ .

Tabla 27 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón e indicadores de estrés oxidativo al término del periodo de suplementación para el grupo control.

	Glucagón basal (pg/mL)	Glucagón post glucosa (pg/mL)	Glucagón post insulina (pg/mL)	$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%)	$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%)
TBARS (mmol/mol)	$\rho = -0,032$	$\rho = 0,061$	$\rho = -0,154$	$\rho = -0,232$	$\rho = -0,121$
N	15	15	15	15	15
Glutación total (mM)	$\rho = 0,272$	$\rho = 0,214$	$\rho = 0,164$	$\rho = -0,270$	$\rho = -0,020$
N	15	15	15	15	15
Glutación reducido (mM)	$\rho = 0,179$	$\rho = 0,272$	$\rho = 0,341$	$\rho = -0,025$	$\rho = 0,034$
N	15	15	15	15	15
Glutación reducido/ Glutación total	$\rho = 0,182$	$\rho = 0,393$	$\rho = 0,418$	$\rho = 0,179$	$\rho = 0,043$
N	15	15	15	15	15
Glutación Peroxidasa (mU/mL)	$\rho = -0,077$	$\rho = 0,189$	$\rho = 0,168$	$\rho = 0,189$	$\rho = -0,049$
N	12	12	12	12	12
Isoprostanos (pg/mL)	$\rho = -0,479$	$\rho = -0,649^{**}$	$\rho = -0,617^{*}$	$\rho = -0,016$	$\rho = -0,147$
N	15	15	15	15	15

\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

Tabla 28 – Coeficientes de Correlación de Spearman ( $\rho$ ) entre glucagón e indicadores de estrés oxidativo al término del periodo de suplementación para el grupo suplementado.

	Glucagón basal (pg/mL)	Glucagón post glucosa (pg/mL)	Glucagón post insulina (pg/mL)	$\Delta$ Glucagón basal – post glucosa (%)	$\Delta$ Glucagón post glucosa – post insulina (%)
TBARS (mmol/mol)	$\rho = -0,424$	$\rho = -0,531$	$\rho = -0,248$	$\rho = -0,349$	$\rho = 0,553$
N	13	13	13	13	13
Glutación total (mM)	$\rho = -0,077$	$\rho = 0,451$	$\rho = 0,385$	$\rho = 0,571 *$	$\rho = -0,231$
N	13	13	13	13	13
Glutación reducido (mM)	$\rho = 0,297$	$\rho = 0,399$	$\rho = 0,484$	$\rho = 0,160$	$\rho = 0,000$
N	13	13	13	13	13
Glutación reducido/ Glutación total	$\rho = 0,297$	$\rho = 0,368$	$\rho = 0,440$	$\rho = 0,143$	$\rho = 0,049$
N	13	13	13	13	13
Glutación Peroxidasa (mU/mL)	$\rho = 0,718 *$	$\rho = 0,027$	$\rho = -0,036$	$\rho = -0,527$	$\rho = -0,073$
N	11	11	11	11	11
Isoprostanos (pg/mL)	$\rho = -0,231$	$\rho = -0,445$	$\rho = -0,302$	$\rho = -0,538$	$\rho = 0,390$
N	13	13	13	13	13

\*  $P < 0,05$ .

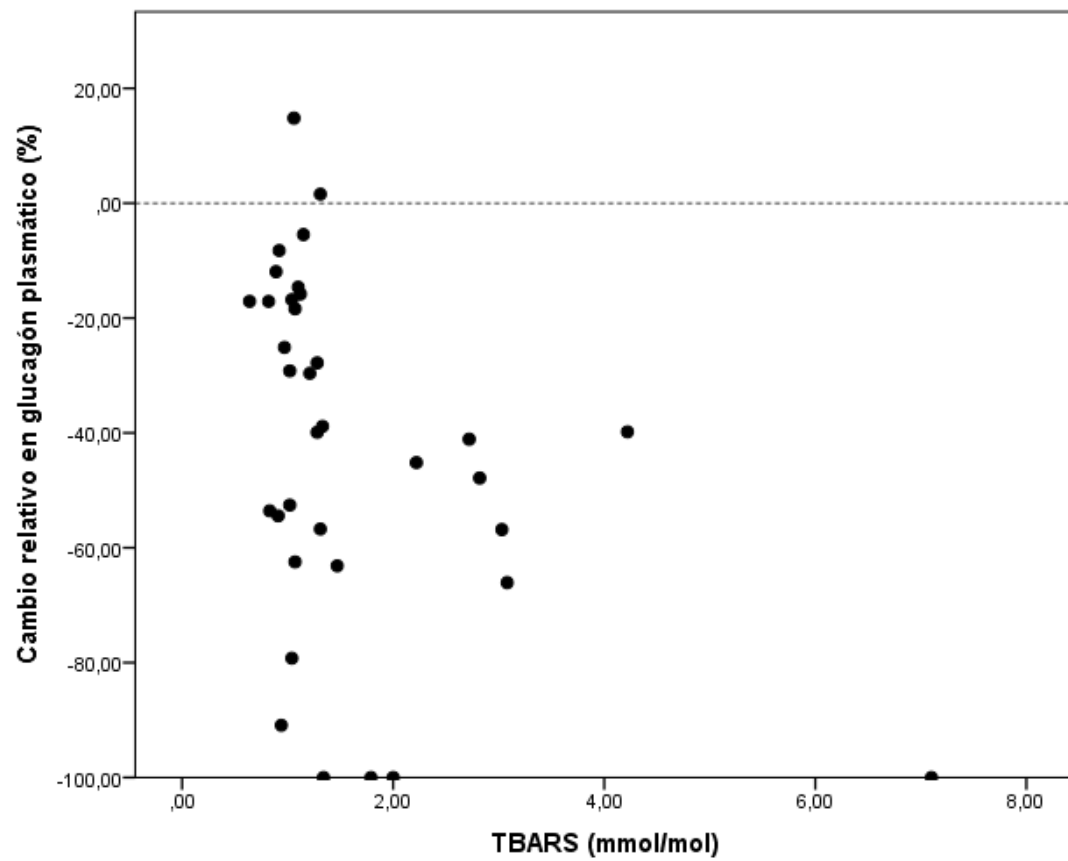


Figura 35: Cambio relativo (%) en la concentración de glucagón plasmático tras la infusión de glucosa en función de la concentración plasmática de TBARS al ingreso.

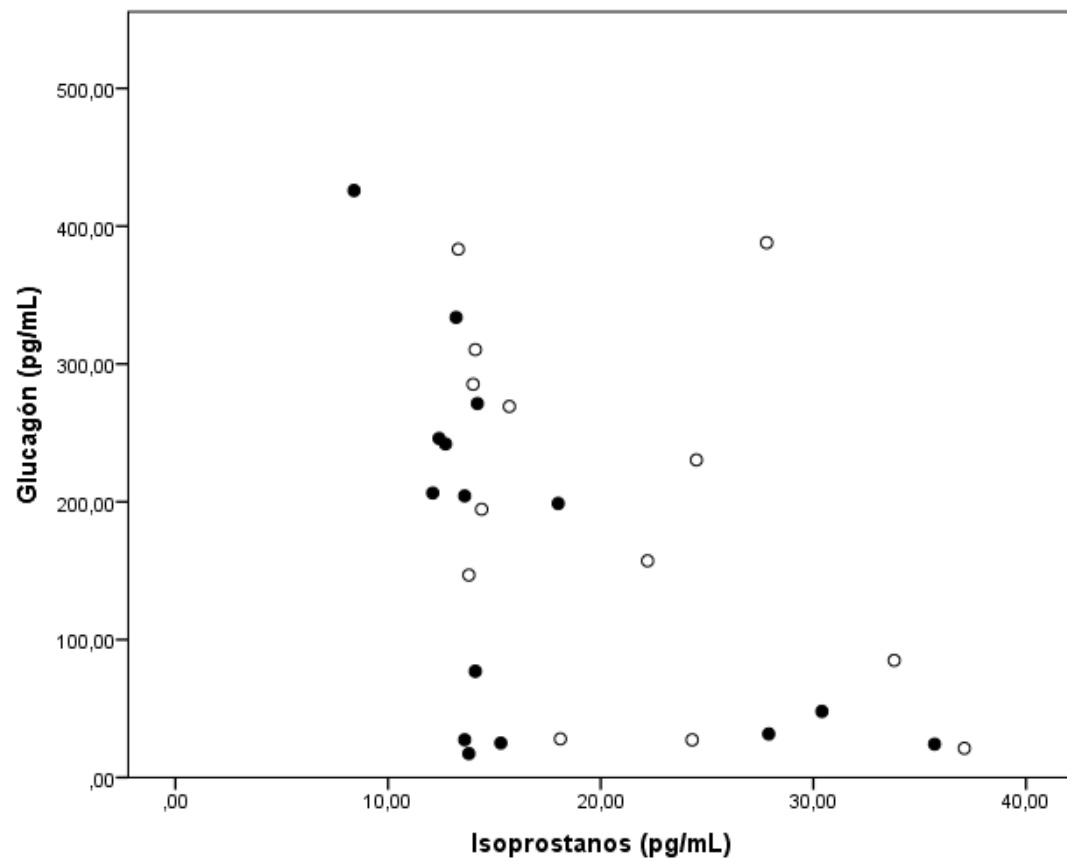


Figura 36: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de glucosa en función de la concentración plasmática de isoprostanos al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

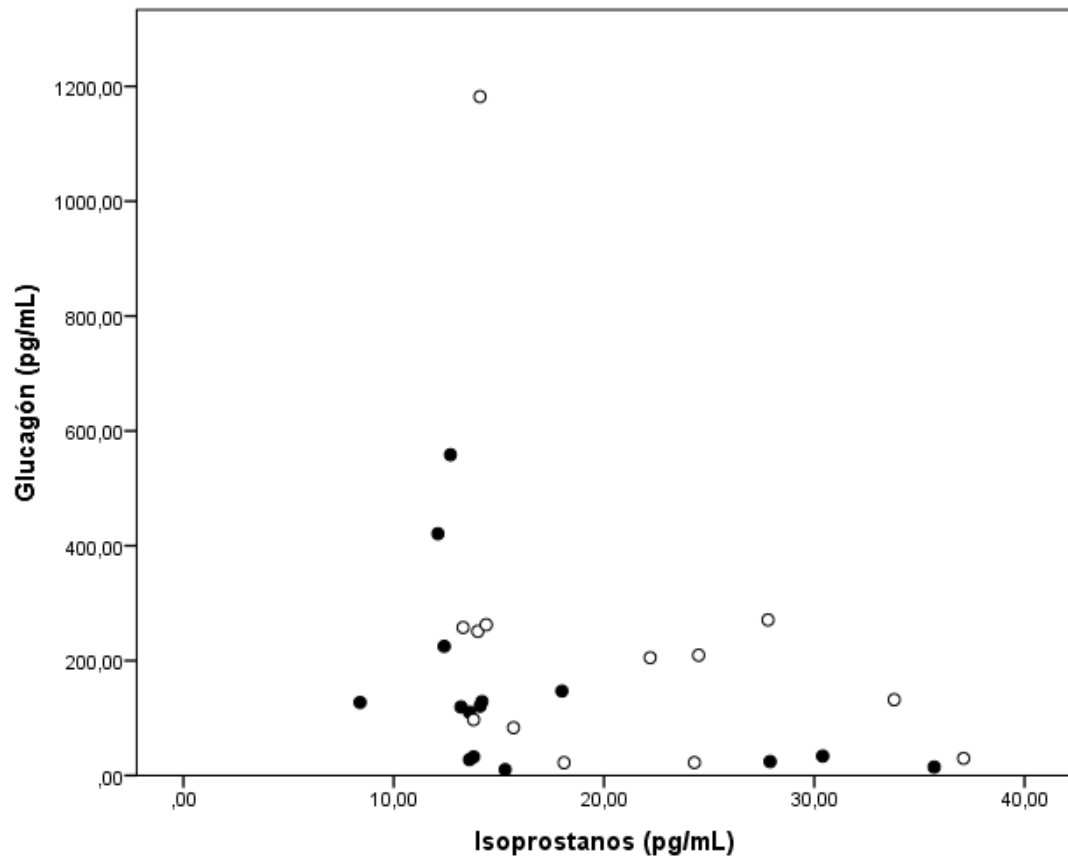


Figura 37: Concentración plasmática de glucagón luego de la infusión de insulina en función de la concentración plasmática de isoprostanos al término del periodo de suplementación. *Círculos negros, placebo; círculos blancos, suplemento.*

### *Modelo Integrado de Secreción de Glucagón*

Considerando los datos presentados en las secciones anteriores se evaluó un diseño integrado de secreción de glucagón post suplementación (N = 28) elaborado mediante regresión lineal múltiple para cada una de las condiciones analizadas (ayuno, post infusión de glucosa y post infusión de insulina). Las variables evaluadas fueron: Grupo (placebo vs suplemento), edad, tiempo de diagnóstico de DM2, IMC, colesterol total, triglicéridos plasmáticos, HbA1c, fase rápida de secreción de insulina (AIRg), sensibilidad a la insulina (Si), Índice de Disposición (DI), PCRus, Zn plasmático, EZP, glicemia e insulinemia para cada una de las condiciones. Los datos fueron analizados mediante el módulo “Regresión Lineal Automática” de SPSS 23.0 con preparación automática de los datos, considerando como resultado el diseño del modelo y valor de F como criterio de selección de variables. La incorporación de las variables se realizó mediante el procedimiento stepwise con incorporación ante  $p < 0,05$  y exclusión con  $p > 0,10$ .

Para el caso de glucagón basal, el único parámetro estadísticamente significativo fue Zn plasmático, con un coeficiente de regresión  $\beta = 6,978$ ,  $p = 0,001$  y un R2 ajustado para el modelo igual a 0,339. Si bien es posible que este bajo R2 y la ausencia de otras variables en el modelo se deban a un bajo poder de la prueba debido al pequeño tamaño muestral, es posible también que otras variables no incluidas en este estudio, como la regulación nerviosa, sean más relevantes en ayuno. En este sentido, la regulación a nivel de sistema nervioso autónomo de la secreción de glucagón frente a la hipoglicemia se encuentra bien descrita (Thorens 2011) (ver Figura 38).

En el caso de glucagón post infusión de glucosa los parámetros significativos fueron Zn plasmático ( $\beta = 7,366$ ,  $p < 0,001$ ), glicemia post infusión de glucosa ( $\beta = 1,479$ ,  $p = 0,004$ ) e Índice de Disposición ( $\beta = 0,134$ ,  $p = 0,008$ ) con un R2 ajustado = 0,542. Respecto de estos resultados, es posible que la asociación positiva entre el Índice de Disposición y la concentración de glucagón plasmático se relacione con un efecto compensatorio de la secreción de glucagón para evitar descensos potencialmente peligrosos de la glicemia frente a mayor sensibilidad o secreción de insulina. En cuanto a la relación potencial entre mayor glicemia y mayor concentración plasmática de glucagón, posiblemente responda a un orden equivocado de los factores siendo una mayor concentración plasmática de glucagón la responsable de mantener elevados los valores de glicemia.

Para el caso de glucagón post infusión de insulina y luego de la eliminación de un outlier (N = 27), los parámetros significativos fueron Zn plasmático ( $\beta = 8,635$ ,  $p < 0,001$ ) y PCRus ( $\beta = 13,872$ ,  $p = 0,044$ ) con un R2 ajustado = 0,519. En este caso, resulta interesante que frente a una infusión de insulina a niveles suprafisiológicos ante los cuales es posible especular que su efecto supresor sea máximo, sea el estado inflamatorio el que resulte determinante en la respuesta de la célula  $\alpha$ . En este mismo sentido se ha descrito que IL-6 estimula la secreción de glucagón, así como la expansión

de la masa de células  $\alpha$  al estimular su proliferación y prevenir su apoptosis (Ellingsgaard et al. 2008).

Finalmente, de acuerdo con los resultados encontrados la concentración plasmática de Zn afectó significativamente la concentración de glucagón plasmático en las tres condiciones evaluadas, siendo en todos los escenarios mayor la concentración plasmática de glucagón frente a mayores concentraciones de Zn plasmático. Si consideramos como parte de la fisiopatología de la DM2 la desregulación de la secreción de glucagón con presencia de hiperglucagonemia absoluta o relativa, mayores niveles de Zn plasmático resultarían indeseables. Futuros estudios deben apuntar a evaluar este efecto en el contexto del control glicémico en un mayor número de pacientes así como si este efecto persiste en condiciones de deficiencia de Zn.



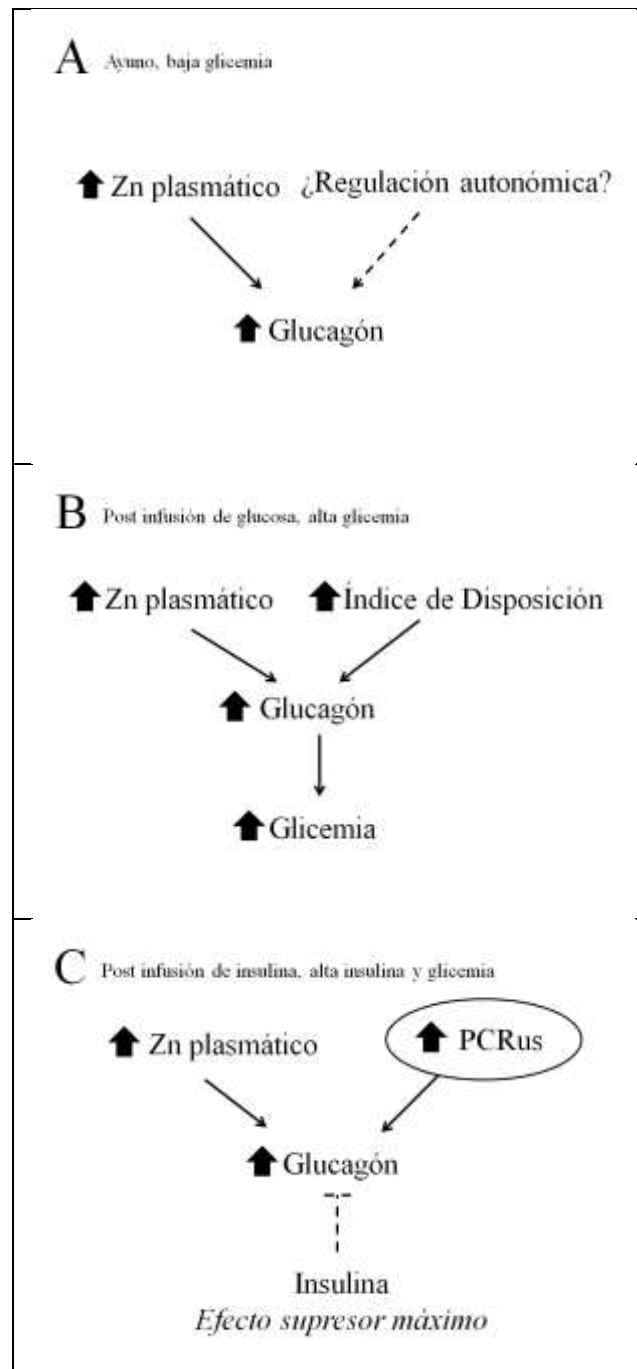


Figura 38: Modelo teórico de regulación de secreción de glucagón frente a distintas condiciones fisiológicas. A) Ayuno, B) Post-infusión de glucosa, C) Post-infusión de insulina. Líneas continuas indican efectos significativos hallados mediante regresión lineal múltiple, líneas discontinuas corresponden a efectos supuestos.

## CONCLUSIONES

Respecto de la hipótesis planteada originalmente en este estudio, la suplementación crónica con Zn a niveles fisiológicos en los pacientes evaluados no produjo una disminución significativa de la concentración plasmática de glucagón ni aumentó significativamente la expresión de *ZNT-8*, la secreción de insulina o la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, los resultados de este estudio sugieren que la suplementación con Zn modifica la respuesta de las células  $\alpha$  a la insulina mediante cambios en su nivel de resistencia a esta hormona. En este sentido, la suplementación con Zn atenuó o suprimió las asociaciones observadas en el grupo control entre la concentración plasmática de glucagón en respuesta a la insulina y el IMC, la CC, el colesterol LDL y la PCRus, todos parámetros relacionados con una mayor insulino-resistencia. De este modo, la suplementación con Zn podría ser particularmente relevante en estados de severa resistencia a la insulina o en pacientes con un pobre control metabólico, aunque su impacto en pacientes bien controlados como los participantes de este estudio no sea significativo.

Por otro lado, aunque la determinación de glucagón en puntos específicos de la FSIVGTT demostró ser una técnica adecuada para evaluar la respuesta de las células  $\alpha$  frente a estímulos como la glucosa y la insulina, proveyendo además de todos los parámetros del modelo mínimo, estudios destinados a evaluar específicamente la respuesta de las células  $\alpha$  como la estimulación de la secreción de glucagón mediante infusión de arginina o el uso del clamp euglicémico hiperinsulinémico podrían dar mayores luces respecto de cómo la suplementación con Zn puede afectar el comportamiento de estas células en pacientes con DM2.

Respecto de la evaluación de los indicadores de estado nutricional de Zn, éstos presentaron una baja sensibilidad a los cambios que se produjeron en la ingesta. En ese sentido, tan sólo el EZP presentó diferencias significativas al término del estudio entre el grupo control y el grupo que recibió suplementación, aunque menos del 50% del cambio en este indicador al año fue explicado por la suplementación misma, además de no presentar correlación alguna con la ingesta. Pese a esto, se observó que una mayor concentración de Zn plasmático podría determinar una mayor concentración de glucagón plasmático en ayunas, post infusión de glucosa y post infusión de insulina, lo cual sería perjudicial frente a desregulaciones de la secreción de glucagón con presencia de hiperglucagonemia. En este sentido, sería recomendable evaluar estos datos con un mayor número de sujetos y en un contexto de peor control metabólico así como en estados de deficiencia nutricional de Zn.

En relación con el efecto de la expresión de *ZNT-8* sobre la regulación de la glicemia y la secreción de insulina y glucagón, las asociaciones observadas en este estudio sugieren que la expresión de este transportador es capaz de modular la secreción de ambas hormonas, posiblemente mediante su efecto sobre la acumulación de Zn en las vesículas de secreción de insulina y, por lo tanto, sobre la liberación de Zn que acompaña la secreción de ésta. Sin embargo, la imposibilidad de abordar la expresión de *ZNT-8* y la concentración y la liberación de Zn en células  $\beta$  pancreáticas directamente impide confirmar esta hipótesis.

En cuanto a las correlaciones observadas entre los indicadores de estrés oxidativo y la concentración plasmática de glucagón, pese a no tener una explicación a éstas, la presencia de correlaciones estadísticamente significativas propone nuevas alternativas de investigación respecto de los mecanismos de regulación de la secreción de glucagón.

Entre las debilidades de este estudio se pueden señalar dos, una es la falta de individuos controles sanos y otra la modificación de la técnica de determinación de glucagón plasmático utilizada entre el ingreso y el término del estudio. En el primer caso, el buen control de la enfermedad de los pacientes reclutados y la falta de individuos sanos impide afirmar que los pacientes evaluados hayan presentado al ingreso defectos en la secreción de glucagón. Pese a que esto no impide evaluar el efecto de la suplementación con Zn o la presencia de asociaciones entre la suplementación con Zn u otros con la secreción o supresión de la secreción de glucagón, es posible que la falta de efectos observados tenga relación con un bajo nivel de compromiso inicial de las células  $\alpha$ . En el segundo caso, las diferencias en las concentraciones plasmáticas de glucagón y en las respuestas observadas a diferentes estímulos aportan un factor de confusión a la interpretación de los resultados, dificultando la realización de comparaciones entre los valores obtenidos al ingreso y los observados al término del estudio.

Finalmente, la suplementación con Zn en este estudio se asoció con un leve aunque significativo aumento en la concentración de HbA1c, así como con una disminución de la concentración de colesterol HDL, situación que en el caso del colesterol HDL ya había sido descrita anteriormente en individuos sanos. En este sentido y considerando la falta de beneficios observados en estos pacientes en cuanto al control de la glicemia, resulta aconsejable evaluar la incorporación de la suplementación con Zn en pacientes cuya enfermedad se encuentre en estados más avanzados o que presenten deficiencia franca de Zn, contexto en el cual las propiedades insulino-miméticas, antiinflamatorias y antioxidantes de este mineral podrían ser de mayor beneficio, mientras que no se justificaría su inclusión frente a un adecuado control metabólico.

## BIBLIOGRAFÍA

Ader, M., Ni, T. C. and Bergman, R. N. 1997. Glucose effectiveness assessed under dynamic and steady state conditions. Comparability of uptake versus production components. *J Clin Invest* 99(6):1187-99.

Alexandraki, K., Piperi, C., Kalofoutis, C., Singh, J., Alaveras, A. and Kalofoutis, A. 2006. Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 1084:89-117.

Allister, E. M., Robson-Doucette, C. A., Prentice, K. J., Hardy, A. B., Sultan, S., Gaisano, H. Y., Kong, D., Gilon, P., Herrera, P. L., Lowell, B. B. and Wheeler, M. B. 2013. UCP2 regulates the glucagon response to fasting and starvation. *Diabetes* 62(5):1623-33.

American Diabetes Association. 2013. Economic costs of diabetes in the U.S. in 2012. *Diabetes Care* 36(4):1033-46.

American Diabetes Association. 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 Suppl 1:S81-90.

American Diabetes Association. 2016. Classification and Diagnosis of Diabetes. Sec. 2. *Diabetes Care* 39 Suppl 1:S13-22.

Authier, F. and Desbuquois, B. 2008. Glucagon receptors. *Cell Mol Life Sci* 65(12):1880-99.

Bak, M. J., Albrechtsen, N. W., Pedersen, J., Hartmann, B., Christensen, M., Vilsboll, T., Knop, F. K., Deacon, C. F., Dragsted, L. O. and Holst, J. J. 2014. Specificity and sensitivity of commercially available assays for glucagon and oxyntomodulin measurement in humans. *Eur J Endocrinol* 170(4):529-38.

Balage, M. and Grizard, J. 1986. Relationship between plasma glucagon disappearance and tissue uptake in rats. *Reprod Nutr Dev* 26(1A):31-8.

Bancila, V., Cens, T., Monnier, D., Chanson, F., Faure, C., Dunant, Y. and Bloc, A. 2005. Two SUR1-specific histidine residues mandatory for zinc-induced activation of the rat KATP channel. *J Biol Chem* 280(10):8793-9.

Bansal, P. and Wang, Q. 2008. Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(4):E751-61.

- Barthel, A., Ostrakhovitch, E. A., Walter, P. L., Kampkotter, A. and Klotz, L. O. 2007. Stimulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling by copper and zinc ions: mechanisms and consequences. *Arch Biochem Biophys* 463(2):175-82.
- Bergman, R. N., Ider, Y. Z., Bowden, C. R. and Cobelli, C. 1979. Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol* 236(6):E667-77.
- Bhowmik, B., Munir, S. B., Diep, L. M., Siddiquee, T., Habib, S. H., Samad, M. A., Azad Khan, A. K. and Hussain, A. 2013. Anthropometric indicators of obesity for identifying cardiometabolic risk factors in a rural Bangladeshi population. *J Diabetes Investig* 4(4):361-8.
- Black, S., Kushner, I. and Samols, D. 2004. C-reactive Protein. *J Biol Chem* 279(47):48487-90.
- Bokvist, K., Olsen, H. L., Hoy, M., Gotfredsen, C. F., Holmes, W. F., Buschard, K., Rorsman, P. and Gromada, J. 1999. Characterisation of sulphonylurea and ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in rat pancreatic A-cells. *Pflugers Arch* 438(4):428-36.
- Borghi, V. C., Wajchenberg, B. L. and Cesar, F. P. 1984. Plasma glucagon suppressibility after oral glucose in obese subjects with normal and impaired glucose tolerance. *Metabolism* 33(12):1068-74.
- Boston, R. C., Stefanovski, D., Moate, P. J., Sumner, A. E., Watanabe, R. M. and Bergman, R. N. 2003. MINMOD Millennium: a computer program to calculate glucose effectiveness and insulin sensitivity from the frequently sampled intravenous glucose tolerance test. *Diabetes Technol Ther* 5(6):1003-15.
- Braun, M., Wendt, A., Birnir, B., Broman, J., Eliasson, L., Galvanovskis, J., Gromada, J., Mulder, H. and Rorsman, P. 2004. Regulated exocytosis of GABA-containing synaptic-like microvesicles in pancreatic beta-cells. *J Gen Physiol* 123(3):191-204.
- Brown, R. J., Sinaii, N. and Rother, K. I. 2008. Too much glucagon, too little insulin: time course of pancreatic islet dysfunction in new-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care* 31(7):1403-4.
- Calanna, S., Piro, S., Di Pino, A., Maria Zagami, R., Urbano, F., Purrello, F. and Maria Rabuazzo, A. 2013. Beta and alpha cell function in metabolically healthy but obese subjects: relationship with entero-insular axis. *Obesity (Silver Spring)* 21(2):320-5.
- Calanna, S., Scicali, R., Di Pino, A., Knop, F. K., Piro, S., Rabuazzo, A. M. and Purrello, F. 2014. Alpha- and beta-cell abnormalities in haemoglobin A1c-defined prediabetes and type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 51(4):567-75.

- Campbell, J. E. and Drucker, D. J. 2015. Islet alpha cells and glucagon--critical regulators of energy homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 11(6):329-38.
- Capdor, J., Foster, M., Petocz, P. and Samman, S. 2013. Zinc and glycemic control: a meta-analysis of randomised placebo controlled supplementation trials in humans. *J Trace Elem Med Biol* 27(2):137-42.
- Carroll, J. F., Kaiser, K. A., Franks, S. F., Deere, C. and Caffrey, J. L. 2007. Influence of BMI and gender on postprandial hormone responses. *Obesity (Silver Spring)* 15(12):2974-83.
- Cryer, P. E. 2012. Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes. *Endocrinology* 153(3):1039-48.
- Chausmer, A. B. 1998. Zinc, insulin and diabetes. *J Am Coll Nutr* 17(2):109-15.
- Chen, M. D., Lin, P. Y. and Sheu, W. H. 1997. Zinc status in plasma of obese individuals during glucose administration. *Biol Trace Elem Res* 60(1-2):123-9.
- Chile. Ministerio de Salud. 2011. Encuesta Nacional de Salud ENS Chile, 2009 - 2010.
- Chimienti, F., Devergnas, S., Favier, A. and Seve, M. 2004. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 53(9):2330-7.
- Cho, Y. M., Merchant, C. E. and Kieffer, T. J. 2012. Targeting the glucagon receptor family for diabetes and obesity therapy. *Pharmacol Ther* 135(3):247-78.
- D'Alessio, D. 2011. The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1:126-32.
- de Benoist, B., Darnton-Hill, I., Davidsson, L., Fontaine, O. and Hotz, C. 2007. Conclusions of the Joint WHO/UNICEF/IAEA/IZiNCG Interagency Meeting on Zinc Status Indicators. *Food Nutr Bull* 28(3 Suppl):S480-4.
- Dinarello, C. A., Donath, M. Y. and Mandrup-Poulsen, T. 2010. Role of IL-1beta in type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17(4):314-21.
- Dolgin, M. and New York Heart Association Criteria Committee. 1994. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels. 9th ed. Little Brown, Boston.
- Donath, M. Y. and Shoelson, S. E. 2011. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 11(2):98-107.

Drobinskaya, I., Neumaier, F., Pereverzev, A., Hescheler, J. and Schneider, T. 2015. Diethyldithiocarbamate-mediated zinc ion chelation reveals role of Cav2.3 channels in glucagon secretion. *Biochim Biophys Acta* 1853(5):953-64.

Duckworth, W. C., Bennett, R. G. and Hamel, F. G. 1998. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* 19(5):608-24.

Dunn, M. F. 2005. Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review. *Biometals* 18(4):295-303.

Dunning, B. E. and Gerich, J. E. 2007. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev* 28(3):253-83.

Eckel, R. H., Kahn, S. E., Ferrannini, E., Goldfine, A. B., Nathan, D. M., Schwartz, M. W., Smith, R. J. and Smith, S. R. 2011. Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? *J Clin Endocrinol Metab* 96(6):1654-63.

Ellingsgaard, H., Ehses, J. A., Hammar, E. B., Van Lommel, L., Quintens, R., Martens, G., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Berney, T., Pipeleers, D., Halban, P. A., Schuit, F. C. and Donath, M. Y. 2008. Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35):13163-8.

Ellingsgaard, H., Hauselmann, I., Schuler, B., Habib, A. M., Baggio, L. L., Meier, D. T., Eppler, E., Bouzakri, K., Wueest, S., Muller, Y. D., Hansen, A. M., Reinecke, M., Konrad, D., Gassmann, M., Reimann, F., Halban, P. A., Gromada, J., Drucker, D. J., Gribble, F. M., Ehses, J. A. and Donath, M. Y. 2011. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med* 17(11):1481-9.

Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A. and Grodsky, G. M. 2003. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52(1):1-8.

Foster, M., Petocz, P. and Samman, S. 2010. Effects of zinc on plasma lipoprotein cholesterol concentrations in humans: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Atherosclerosis* 210(2):344-52.

Foster, M., Hancock, D., Petocz, P. and Samman, S. 2011. Zinc transporter genes are coordinately expressed in men and women independently of dietary or plasma zinc. *J Nutr* 141(6):1195-201.

Foster, M., Petocz, P. and Samman, S. 2013. Inflammation markers predict zinc transporter gene expression in women with type 2 diabetes mellitus. *J Nutr Biochem* 24(9):1655-61.

- Foster, M. C., Leapman, R. D., Li, M. X. and Atwater, I. 1993. Elemental composition of secretory granules in pancreatic islets of Langerhans. *Biophys J* 64(2):525-32.
- Franklin, I., Gromada, J., Gjinovci, A., Theander, S. and Wollheim, C. B. 2005. Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes* 54(6):1808-15.
- Franklin, I. K. and Wollheim, C. B. 2004. GABA in the endocrine pancreas: its putative role as an islet cell paracrine-signalling molecule. *J Gen Physiol* 123(3):185-90.
- Fredheim, S., Andersen, M. L., Porksen, S., Nielsen, L. B., Pipper, C., Hansen, L., Holst, J. J., Thomsen, J., Johannesen, J., Mortensen, H. B. and Svensson, J. 2015. The influence of glucagon on postprandial hyperglycaemia in children 5 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetologia* 58(4):828-34.
- Fu, Y., Tian, W., Pratt, E. B., Dirling, L. B., Shyng, S. L., Meshul, C. K. and Cohen, D. M. 2009. Down-regulation of ZnT8 expression in INS-1 rat pancreatic beta cells reduces insulin content and glucose-inducible insulin secretion. *PLoS One* 4(5):e5679.
- Gaisano, H. Y., Macdonald, P. E. and Vranic, M. 2012. Glucagon secretion and signaling in the development of diabetes. *Front Physiol* 3:349.
- Gastaldelli, A., Baldi, S., Pettiti, M., Toschi, E., Camastra, S., Natali, A., Landau, B. R. and Ferrannini, E. 2000. Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study. *Diabetes* 49(8):1367-73.
- Gibson, R. S., Hess, S. Y., Hotz, C. and Brown, K. H. 2008. Indicators of zinc status at the population level: a review of the evidence. *Br J Nutr* 99 Suppl 3:S14-23.
- Goldberg, I. J. 2001. Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *J Clin Endocrinol Metab* 86(3):965-71.
- Gonzalez, M., Boer, U., Dickel, C., Quentin, T., Cierny, I., Oetjen, E. and Knepel, W. 2008. Loss of insulin-induced inhibition of glucagon gene transcription in hamster pancreatic islet alpha cells by long-term insulin exposure. *Diabetologia* 51(11):2012-21.
- Gregor, M. F. and Hotamisligil, G. S. 2011. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 29:415-45.
- Gromada, J., Ma, X., Hoy, M., Bokvist, K., Salehi, A., Berggren, P. O. and Rorsman, P. 2004. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent regulation of glucagon release and electrical activity by glucose in wild-type and SUR1<sup>-/-</sup> mouse alpha-cells. *Diabetes* 53 Suppl 3:S181-9.



Gromada, J., Franklin, I. and Wollheim, C. B. 2007. Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* 28(1):84-116.

Guardado-Mendoza, R., Jimenez-Ceja, L., Majluf-Cruz, A., Kamath, S., Fiorentino, T. V., Casiraghi, F., Velazquez, A. O., DeFronzo, R. A., Dick, E., Davalli, A. and Folli, F. 2013. Impact of obesity severity and duration on pancreatic beta- and alpha-cell dynamics in normoglycemic non-human primates. *Int J Obes (Lond)* 37(8):1071-8.

Gylfe, E. 2013. Glucose control of glucagon secretion: there is more to it than KATP channels. *Diabetes* 62(5):1391-3.

Gylfe, E. 2016. Glucose control of glucagon secretion-'There's a brand-new gimmick every year'. *Ups J Med Sci* 121(2):120-32.

Haase, H. and Maret, W. 2003. Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Exp Cell Res* 291(2):289-98.

Habegger, K. M., Heppner, K. M., Geary, N., Bartness, T. J., DiMarchi, R. and Tschop, M. H. 2010. The metabolic actions of glucagon revisited. *Nat Rev Endocrinol* 6(12):689-97.

Hauge-Evans, A. C., King, A. J., Carmignac, D., Richardson, C. C., Robinson, I. C., Low, M. J., Christie, M. R., Persaud, S. J. and Jones, P. M. 2009. Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes* 58(2):403-11.

Ho, Y., Samarasinghe, R., Knoch, M. E., Lewis, M., Aizenman, E. and DeFranco, D. B. 2008. Selective inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphatases by zinc accounts for extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent oxidative neuronal cell death. *Mol Pharmacol* 74(4):1141-51.

Hong, J., Abudula, R., Chen, J., Jeppesen, P. B., Dyrskog, S. E., Xiao, J., Colombo, M. and Hermansen, K. 2005. The short-term effect of fatty acids on glucagon secretion is influenced by their chain length, spatial configuration, and degree of unsaturation: studies in vitro. *Metabolism* 54(10):1329-36.

Hotamisligil, G. S., Murray, D. L., Choy, L. N. and Spiegelman, B. M. 1994. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11):4854-8.

Inaishi, J., Saisho, Y., Sato, S., Kou, K., Murakami, R., Watanabe, Y., Kitago, M., Kitagawa, Y., Yamada, T. and Itoh, H. 2016. Effects of Obesity and Diabetes on alpha- and beta-Cell Mass in Surgically Resected Human Pancreas. *J Clin Endocrinol Metab* 101(7):2874-82.

- Inokuchi, T., Kameyama, H., Orita, M., Kasai, T. and Isogai, S. 1989. Elevated pancreatic glucagon in moderately obese patients: relationship of fatty liver and hypertriglyceridemia. *Jpn J Med* 28(3):355-61.
- Ishihara, H., Maechler, P., Gjinovci, A., Herrera, P. L. and Wollheim, C. B. 2003. Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. *Nat Cell Biol* 5(4):330-5.
- Jansen, J., Karges, W. and Rink, L. 2009. Zinc and diabetes--clinical links and molecular mechanisms. *J Nutr Biochem* 20(6):399-417.
- Jayawardena, R., Ranasinghe, P., Galappaththy, P., Malkanthi, R., Constantine, G. and Katulanda, P. 2012. Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr* 4(1):13.
- Jiang, G. and Zhang, B. B. 2003. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(4):E671-8.
- Jin, T. 2008. Mechanisms underlying proglucagon gene expression. *J Endocrinol* 198(1):17-28.
- Jo, C. and Ahn, D. U. 1998. Fluorometric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. *Poult Sci* 77(3):475-80.
- Keane, K. N., Cruzat, V. F., Carlessi, R., de Bittencourt, P. I., Jr. and Newsholme, P. 2015. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and beta-Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* 2015:181643.
- Kelleher, S. L., McCormick, N. H., Velasquez, V. and Lopez, V. 2011. Zinc in specialized secretory tissues: roles in the pancreas, prostate, and mammary gland. *Adv Nutr* 2(2):101-11.
- Kimball, C. P. and Murlin, J. R. 1923. Aqueous extracts of pancreas: III. Some precipitation reactions of insulin. *J Biol Chem* 58(1):337-346.
- King, J. C. 1990. Assessment of zinc status. *J Nutr* 120 Suppl 11:1474-9.
- King, J. C. 2011. Zinc: an essential but elusive nutrient. *Am J Clin Nutr* 94(2):679S-84S.
- King, J. C., Brown, K. H., Gibson, R. S., Krebs, N. F., Lowe, N. M., Siekmann, J. H. and Raiten, D. J. 2016. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)-Zinc Review. *J Nutr* 146(Suppl):858S-85S.

Kitabayashi, C., Fukada, T., Kanamoto, M., Ohashi, W., Hojyo, S., Atsumi, T., Ueda, N., Azuma, I., Hirota, H., Murakami, M. and Hirano, T. 2010. Zinc suppresses Th17 development via inhibition of STAT3 activation. *Int Immunol* 22(5):375-86.

Klein, C., Creach, K., Irintcheva, V., Hughes, K. J., Blackwell, P. L., Corbett, J. A. and Baldassare, J. J. 2006. Zinc induces ERK-dependent cell death through a specific Ras isoform. *Apoptosis* 11(11):1933-44.

Knop, F. K., Aaboe, K., Vilsboll, T., Volund, A., Holst, J. J., Krarup, T. and Madsbad, S. 2012. Impaired incretin effect and fasting hyperglucagonaemia characterizing type 2 diabetic subjects are early signs of dysmetabolism in obesity. *Diabetes Obes Metab* 14(6):500-10.

Kohen, R. and Nyska, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30(6):620-50.

Kohlgruber, A. and Lynch, L. 2015. Adipose tissue inflammation in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 15(11):92.

Kristiansen, L. H., Rungby, J., Sondergaard, L. G., Stoltenberg, M. and Danscher, G. 2001. Autometallography allows ultrastructural monitoring of zinc in the endocrine pancreas. *Histochem Cell Biol* 115(2):125-9.

Kwon, H. and Pessin, J. E. 2013. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:71.

Larsson, H. and Ahren, B. 1996. Islet dysfunction in obese women with impaired glucose tolerance. *Metabolism* 45(4):502-9.

Lee, K., Song, Y. M. and Sung, J. 2008. Which obesity indicators are better predictors of metabolic risk?: healthy twin study. *Obesity (Silver Spring)* 16(4):834-40.

Lee, S., Chanoit, G., McIntosh, R., Zvara, D. A. and Xu, Z. 2009. Molecular mechanism underlying Akt activation in zinc-induced cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(2):H569-75.

Lee, Y., Berglund, E. D., Wang, M. Y., Fu, X., Yu, X., Charron, M. J., Burgess, S. C. and Unger, R. H. 2012. Metabolic manifestations of insulin deficiency do not occur without glucagon action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(37):14972-6.

Lefebvre, B., Vandewalle, B., Balavoine, A. S., Queniat, G., Moerman, E., Vantyghem, M. C., Le Bacquer, O., Gmyr, V., Pawlowski, V., Kerr-Conte, J. and Pattou, F. 2012. Regulation and functional effects of ZNT8 in human pancreatic islets. *J Endocrinol* 214(2):225-32.

- Leung, Y. M., Ahmed, I., Sheu, L., Gao, X., Hara, M., Tsushima, R. G., Diamant, N. E. and Gaisano, H. Y. 2006. Insulin regulates islet alpha-cell function by reducing KATP channel sensitivity to adenosine 5'-triphosphate inhibition. *Endocrinology* 147(5):2155-62.
- Levey, A. S., Coresh, J., Greene, T., Stevens, L. A., Zhang, Y. L., Hendriksen, S., Kusek, J. W. and Van Lente, F. 2006. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 145(4):247-54.
- Li, X. C., Liao, T. D. and Zhuo, J. L. 2008. Long-term hyperglucagonaemia induces early metabolic and renal phenotypes of Type 2 diabetes in mice. *Clin Sci (Lond)* 114(9):591-601.
- Li, X. C. and Zhuo, J. L. 2013. Current insights and new perspectives on the roles of hyperglucagonemia in non-insulin-dependent type 2 diabetes. *Curr Hypertens Rep* 15(5):522-30.
- Li, Y. V. 2014. Zinc and insulin in pancreatic beta-cells. *Endocrine* 45(2):178-89.
- Lin, Y. F. and Chai, Y. 2008. Functional modulation of the ATP-sensitive potassium channel by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Neuroscience* 152(2):371-80.
- Lowe, N. M., Fekete, K. and Decsi, T. 2009. Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 89(6):2040S-2051S.
- Lowe, N. M. 2016. Assessing zinc in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*.
- Lund, A., Bagger, J. I., Wewer Albrechtsen, N. J., Christensen, M., Grondahl, M., Hartmann, B., Mathiesen, E. R., Hansen, C. P., Storkholm, J. H., van Hall, G., Rehfeld, J. F., Hornburg, D., Meissner, F., Mann, M., Larsen, S., Holst, J. J., Vilsboll, T. and Knop, F. K. 2016. Evidence of Extrapancreatic Glucagon Secretion in Man. *Diabetes* 65(3):585-97.
- Maret, W. 2013. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv Nutr* 4(1):82-91.
- Marreiro, D. N., Fisberg, M. and Cozzolino, S. M. 2002. Zinc nutritional status in obese children and adolescents. *Biol Trace Elem Res* 86(2):107-22.
- McTaggart, J. S., Clark, R. H. and Ashcroft, F. M. 2010. The role of the KATP channel in glucose homeostasis in health and disease: more than meets the islet. *J Physiol* 588(Pt 17):3201-9.

Merino, B., Alonso-Magdalena, P., Lluesma, M., Neco, P., Gonzalez, A., Marroqui, L., Garcia-Arevalo, M., Nadal, A. and Quesada, I. 2015. Pancreatic alpha-cells from female mice undergo morphofunctional changes during compensatory adaptations of the endocrine pancreas to diet-induced obesity. *Sci Rep* 5:11622.

Miki, T., Nagashima, K. and Seino, S. 1999. The structure and function of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in insulin-secreting pancreatic beta-cells. *J Mol Endocrinol* 22(2):113-23.

Miller, L. V., Hambidge, K. M., Naake, V. L., Hong, Z., Westcott, J. L. and Fennessey, P. V. 1994. Size of the zinc pools that exchange rapidly with plasma zinc in humans: alternative techniques for measuring and relation to dietary zinc intake. *J Nutr* 124(2):268-76.

Miranda, E. R. and Dey, C. S. 2004. Effect of chromium and zinc on insulin signaling in skeletal muscle cells. *Biol Trace Elem Res* 101(1):19-36.

Mooradian, A. D. 2009. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 5(3):150-9.

Muller, W. A., Girardier, L., Seydoux, J., Berger, M., Renold, A. E. and Vranic, M. 1978. Extrapancreatic glucagon and glucagonlike immunoreactivity in depancreatized dogs. A quantitative assessment of secretion rates and anatomical delineation of sources. *J Clin Invest* 62(1):124-32.

Murgia, C., Devirgiliis, C., Mancini, E., Donadel, G., Zalewski, P. and Perozzi, G. 2009. Diabetes-linked zinc transporter ZnT8 is a homodimeric protein expressed by distinct rodent endocrine cell types in the pancreas and other glands. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19(6):431-9.

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). 2002. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106(25):3143-421.

Nittala, A., Ghosh, S., Stefanovski, D., Bergman, R. and Wang, X. 2006. Dimensional analysis of MINMOD leads to definition of the disposition index of glucose regulation and improved simulation algorithm. *Biomed Eng Online* 5:44.

Nygaard, S. B., Larsen, A., Knuhtsen, A., Rungby, J. and Smidt, K. 2014. Effects of zinc supplementation and zinc chelation on in vitro beta-cell function in INS-1E cells. *BMC Res Notes* 7:84.

Olivares, M., Pizarro, F., de Pablo, S., Araya, M. and Uauy, R. 2004. Iron, zinc, and copper: contents in common Chilean foods and daily intakes in Santiago, Chile. *Nutrition* 20(2):205-12.

Olsen, H. L., Theander, S., Bokvist, K., Buschard, K., Wollheim, C. B. and Gromada, J. 2005. Glucose stimulates glucagon release in single rat alpha-cells by mechanisms that mirror the stimulus-secretion coupling in beta-cells. *Endocrinology* 146(11):4861-70.

Ortis, F., Miani, M., Colli, M. L., Cunha, D. A., Gurzov, E. N., Allagnat, F., Chariot, A. and Eizirik, D. L. 2012. Differential usage of NF-kappaB activating signals by IL-1beta and TNF-alpha in pancreatic beta cells. *FEBS Lett* 586(7):984-9.

Ozata, M., Mergen, M., Oktenli, C., Aydin, A., Sanisoglu, S. Y., Bolu, E., Yilmaz, M. I., Sayal, A., Isimer, A. and Ozdemir, I. C. 2002. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem* 35(8):627-31.

Philippe, J. 1989. Glucagon gene transcription is negatively regulated by insulin in a hamster islet cell line. *J Clin Invest* 84(2):672-7.

Philipsen, A., Jorgensen, M. E., Vistisen, D., Sandbaek, A., Almdal, T. P., Christiansen, J. S., Lauritzen, T. and Witte, D. R. 2015. Associations between ultrasound measures of abdominal fat distribution and indices of glucose metabolism in a population at high risk of type 2 diabetes: the ADDITION-PRO study. *PLoS One* 10(4):e0123062.

Pickup, J. C. and Crook, M. A. 1998. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41(10):1241-8.

Piro, S., Maniscalchi, E. T., Monello, A., Pandini, G., Mascali, L. G., Rabuazzo, A. M. and Purrello, F. 2010. Palmitate affects insulin receptor phosphorylation and intracellular insulin signal in a pancreatic alpha-cell line. *Endocrinology* 151(9):4197-206.

Polonsky, K. S., Given, B. D. and Van Cauter, E. 1988. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 81(2):442-8.

Pound, L. D., Sarkar, S. A., Benninger, R. K., Wang, Y., Suwanichkul, A., Shadoan, M. K., Printz, R. L., Oeser, J. K., Lee, C. E., Piston, D. W., McGuinness, O. P., Hutton, J. C., Powell, D. R. and O'Brien, R. M. 2009. Deletion of the mouse *Slc30a8* gene encoding zinc transporter-8 results in impaired insulin secretion. *Biochem J* 421(3):371-6.

Prasad, A. S. 2014. Zinc is an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Its Role in Human Health. *Front Nutr* 1:14.

Prost, A. L., Bloc, A., Hussy, N., Derand, R. and Vivaudou, M. 2004. Zinc is both an intracellular and extracellular regulator of KATP channel function. *J Physiol* 559(Pt 1):157-67.

Qian, W. J., Gee, K. R. and Kennedy, R. T. 2003. Imaging of Zn<sup>2+</sup> release from pancreatic beta-cells at the level of single exocytotic events. *Anal Chem* 75(14):3468-75.

Quesada, I., Tuduri, E., Ripoll, C. and Nadal, A. 2008. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* 199(1):5-19.

Quoix, N., Cheng-Xue, R., Mattart, L., Zeinoun, Z., Guiot, Y., Beauvois, M. C., Henquin, J. C. and Gilon, P. 2009. Glucose and pharmacological modulators of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels control [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> by different mechanisms in isolated mouse alpha-cells. *Diabetes* 58(2):412-21.

Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S. and Dhama, K. 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int* 2014:761264.

Rahman, I., Kode, A. and Biswas, S. K. 2006. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* 1(6):3159-65.

Rains, J. L. and Jain, S. K. 2011. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 50(5):567-75.

Ranasinghe, P., Wathurapatha, W. S., Ishara, M. H., Jayawardana, R., Galappaththy, P., Katulanda, P. and Constantine, G. R. 2015. Effects of Zinc supplementation on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Metab (Lond)* 12:26.

Ravier, M. A. and Rutter, G. A. 2005. Glucose or insulin, but not zinc ions, inhibit glucagon secretion from mouse pancreatic alpha-cells. *Diabetes* 54(6):1789-97.

Reaven, G. M., Chen, Y. D., Golay, A., Swislocki, A. L. and Jaspan, J. B. 1987. Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 64(1):106-10.

Rorsman, P., Salehi, S. A., Abdulkader, F., Braun, M. and MacDonald, P. E. 2008. K(ATP)-channels and glucose-regulated glucagon secretion. *Trends Endocrinol Metab* 19(8):277-84.

Rorsman, P., Ramracheya, R., Rorsman, N. J. and Zhang, Q. 2014. ATP-regulated potassium channels and voltage-gated calcium channels in pancreatic alpha and beta cells: similar functions but reciprocal effects on secretion. *Diabetologia* 57(9):1749-61.

Ruz, M., Carrasco, F., Rojas, P., Codoceo, J., Inostroza, J., Basfi-fer, K., Csendes, A., Papapietro, K., Pizarro, F., Olivares, M., Sian, L., Westcott, J. L., Miller, L. V., Hambidge, K. M. and Krebs, N. F. 2011. Zinc absorption and zinc status are reduced after Roux-en-Y gastric bypass: a randomized study using 2 supplements. *Am J Clin Nutr* 94(4):1004-11.

Ruz, M., Carrasco, F., Sanchez, A., Perez, A. and Rojas, P. 2016. Does Zinc Really "Metal" with Diabetes? The Epidemiologic Evidence. *Curr Diab Rep* 16(11):111.

Salehi, A., Vieira, E. and Gylfe, E. 2006. Paradoxical stimulation of glucagon secretion by high glucose concentrations. *Diabetes* 55(8):2318-23.

Scott, L. J., Mohlke, K. L., Bonnycastle, L. L., Willer, C. J., Li, Y., Duren, W. L., Erdos, M. R., Stringham, H. M., Chines, P. S., Jackson, A. U., Prokunina-Olsson, L., Ding, C. J., Swift, A. J., Narisu, N., Hu, T., Pruim, R., Xiao, R., Li, X. Y., Conneely, K. N., Riebow, N. L., Sprau, A. G., Tong, M., White, P. P., Hetrick, K. N., Barnhart, M. W., Bark, C. W., Goldstein, J. L., Watkins, L., Xiang, F., Saramies, J., Buchanan, T. A., Watanabe, R. M., Valle, T. T., Kinnunen, L., Abecasis, G. R., Pugh, E. W., Doheny, K. F., Bergman, R. N., Tuomilehto, J., Collins, F. S. and Boehnke, M. 2007. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316(5829):1341-5.

Schinner, S., Barthel, A., Dellas, C., Grzeskowiak, R., Sharma, S. K., Oetjen, E., Blume, R. and Knepel, W. 2005. Protein kinase B activity is sufficient to mimic the effect of insulin on glucagon gene transcription. *J Biol Chem* 280(8):7369-76.

Seino, S. 1999. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol* 61:337-62.

Sharma, U., Pal, D. and Prasad, R. 2014. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian J Clin Biochem* 29(3):269-78.

Shaw, J. E., Sicree, R. A. and Zimmet, P. Z. 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 87(1):4-14.

Sherr, J., Tsalikian, E., Fox, L., Buckingham, B., Weinzimer, S., Tamborlane, W. V., White, N. H., Arbelaez, A. M., Kollman, C., Ruedy, K. J., Cheng, P. and Beck, R. W. 2014. Evolution of abnormal plasma glucagon responses to mixed-meal feedings in youth with type 1 diabetes during the first 2 years after diagnosis. *Diabetes Care* 37(6):1741-4.



Siafarikas, A., Johnston, R. J., Bulsara, M. K., O'Leary, P., Jones, T. W. and Davis, E. A. 2012. Early loss of the glucagon response to hypoglycemia in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 35(8):1757-62.

Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Dina, C., Shen, L., Serre, D., Boutin, P., Vincent, D., Belisle, A., Hadjadj, S., Balkau, B., Heude, B., Charpentier, G., Hudson, T. J., Montpetit, A., Pshezhetsky, A. V., Prentki, M., Posner, B. I., Balding, D. J., Meyre, D., Polychronakos, C. and Froguel, P. 2007. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445(7130):881-5.

Slucca, M., Harmon, J. S., Oseid, E. A., Bryan, J. and Robertson, R. P. 2010. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel mediates the zinc switch-off signal for glucagon response during glucose deprivation. *Diabetes* 59(1):128-34.

Smith, J. C., Jr., Butrimovitz, G. P. and Purdy, W. C. 1979. Direct measurement of zinc in plasma by atomic absorption spectroscopy. *Clin Chem* 25(8):1487-91.

Solomou, A., Meur, G., Bellomo, E., Hodson, D. J., Tomas, A., Li, S. M., Philippe, E., Herrera, P. L., Magnan, C. and Rutter, G. A. 2015. The Zinc Transporter Slc30a8/ZnT8 Is Required in a Subpopulation of Pancreatic alpha-Cells for Hypoglycemia-induced Glucagon Secretion. *J Biol Chem* 290(35):21432-42.

Solomou, A., Philippe, E., Chabosseau, P., Migrenne-Li, S., Gaitan, J., Lang, J., Magnan, C. and Rutter, G. A. 2016. Over-expression of Slc30a8/ZnT8 selectively in the mouse alpha cell impairs glucagon release and responses to hypoglycemia. *Nutr Metab (Lond)* 13:46.

Sutherland, E. W. and De Duve, C. 1948. Origin and distribution of the hyperglycemic-glycogenolytic factor of the pancreas. *J Biol Chem* 175(2):663-74.

Tarasov, A., Dusonchet, J. and Ashcroft, F. 2004. Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel: a pas de deux. *Diabetes* 53 Suppl 3:S113-22.

Thomsen, J., Kristiansen, K., Brunfeldt, K. and Sundby, F. 1972. The amino acid sequence of human glucagon. *FEBS Lett* 21(3):315-319.

Thorens, B. 2011. Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1:82-8.

Torkanlou, K., Bibak, B., Abbaspour, A., Abdi, H., Saleh Moghaddam, M., Tayefi, M., Mohammadzadeh, E., Safarian Bana, H., Aghasizade, M., Ferns, G. A., Avan, A. and Ghayour Mobarhan, M. 2016. Reduced Serum Levels of Zinc and Superoxide Dismutase in Obese Individuals. *Ann Nutr Metab* 69(3-4):232-236.

Tsuchiyama, N., Takamura, T., Ando, H., Sakurai, M., Shimizu, A., Kato, K., Kurita, S. and Kaneko, S. 2007. Possible role of alpha-cell insulin resistance in exaggerated glucagon responses to arginine in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30(10):2583-7.

Unger, R. H. and Orci, L. 1975. The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet* 1(7897):14-6.

Unger, R. H. and Orci, L. 2010. Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(37):16009-12.

Unger, R. H. and Cherrington, A. D. 2012. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest* 122(1):4-12.

Vardatsikos, G., Pandey, N. R. and Srivastava, A. K. 2013. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of zinc. *J Inorg Biochem* 120:8-17.

Walker, J. N., Ramracheya, R., Zhang, Q., Johnson, P. R., Braun, M. and Rorsman, P. 2011. Regulation of glucagon secretion by glucose: paracrine, intrinsic or both? *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1:95-105.

Wang, X., Bao, W., Liu, J., Ouyang, Y. Y., Wang, D., Rong, S., Xiao, X., Shan, Z. L., Zhang, Y., Yao, P. and Liu, L. G. 2013. Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 36(1):166-75.

Weiss, R., D'Adamo, E., Santoro, N., Hershkop, K. and Caprio, S. 2011. Basal alpha-cell up-regulation in obese insulin-resistant adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 96(1):91-7.

Wenzlau, J. M., Juhl, K., Yu, L., Moua, O., Sarkar, S. A., Gottlieb, P., Rewers, M., Eisenbarth, G. S., Jensen, J., Davidson, H. W. and Hutton, J. C. 2007. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(43):17040-5.

Wewer Albrechtsen, N. J., Hartmann, B., Veedfald, S., Windelov, J. A., Plamboeck, A., Bojsen-Moller, K. N., Idorn, T., Feldt-Rasmussen, B., Knop, F. K., Vilsboll, T., Madsbad, S., Deacon, C. F. and Holst, J. J. 2014. Hyperglucagonaemia analysed by glucagon sandwich ELISA: nonspecific interference or truly elevated levels? *Diabetologia* 57(9):1919-26.

Wewer Albrechtsen, N. J., Veedfald, S., Plamboeck, A., Deacon, C. F., Hartmann, B., Knop, F. K., Vilsboll, T. and Holst, J. J. 2016. Inability of Some Commercial Assays to Measure Suppression of Glucagon Secretion. *J Diabetes Res* 2016:8352957.

Wijesekara, N., Dai, F. F., Hardy, A. B., Giglou, P. R., Bhattacharjee, A., Koshkin, V., Chimienti, F., Gaisano, H. Y., Rutter, G. A. and Wheeler, M. B. 2010. Beta cell-specific

Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion. *Diabetologia* 53(8):1656-68.

Witt, S. H., Sommer, W. H., Hansson, A. C., Sticht, C., Rietschel, M. and Witt, C. C. 2013. Comparison of gene expression profiles in the blood, hippocampus and prefrontal cortex of rats. *In Silico Pharmacol* 1:15.

Wood, R. J. 2000. Assessment of marginal zinc status in humans. *J Nutr* 130(5S Suppl):1350S-4S.

World Medical Association. 2013. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 310(20):2191-4.

Wunderlich, C. M., Hovelmeyer, N. and Wunderlich, F. T. 2013. Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. *JAKSTAT* 2(2):e23878.

Xu, E., Kumar, M., Zhang, Y., Ju, W., Obata, T., Zhang, N., Liu, S., Wendt, A., Deng, S., Ebina, Y., Wheeler, M. B., Braun, M. and Wang, Q. 2006. Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system. *Cell Metab* 3(1):47-58.

Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A. and Chen, H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112(12):1821-30.

Yoshida, D., Toyomura, K., Fukumoto, J., Ueda, N., Ohnaka, K., Adachi, M., Takayanagi, R. and Kono, S. 2009. Waist circumference and cardiovascular risk factors in Japanese men and women. *J Atheroscler Thromb* 16(4):431-41.

Zeggini, E., Weedon, M. N., Lindgren, C. M., Frayling, T. M., Elliott, K. S., Lango, H., Timpson, N. J., Perry, J. R., Rayner, N. W., Freathy, R. M., Barrett, J. C., Shields, B., Morris, A. P., Ellard, S., Groves, C. J., Harries, L. W., Marchini, J. L., Owen, K. R., Knight, B., Cardon, L. R., Walker, M., Hitman, G. A., Morris, A. D., Doney, A. S., McCarthy, M. I. and Hattersley, A. T. 2007. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316(5829):1336-41.

Zhang, D., Sun, M., Samols, D. and Kushner, I. 1996. STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. *J Biol Chem* 271(16):9503-9.

Zhong, M. L., Chi, Z. H., Shan, Z. Y., Teng, W. P. and Wang, Z. Y. 2012. Widespread expression of zinc transporter ZnT (SLC30) family members in mouse endocrine cells. *Histochem Cell Biol* 138(4):605-16.

Zhou, H., Zhang, T., Harmon, J. S., Bryan, J. and Robertson, R. P. 2007. Zinc, not insulin, regulates the rat alpha-cell response to hypoglycemia in vivo. *Diabetes* 56(4):1107-12.

Zimmet, P., Alberti, K. G. and Shaw, J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414(6865):782-7.

## ANEXO N°1

### Artículos

Pérez A, Rojas P, Carrasco F, Basfi-fer K, Pérez-Bravo F, Codoceo J, Inostroza J, Ruz M. 2017. Zinc supplementation does not affect glucagon response to intravenous glucose and insulin infusion in patients with well-controlled type 2 diabetes. *Biol Trace Elem Res* (enviado).

Pérez A, Rojas P, Carrasco F, Basfi-fer K, Pérez-Bravo F, Codoceo J, Insotroza J, Galgani J, Gilmore A, Ruz M. 2017. Association between zinc nutritional status and glycemic control in individuals with well-controlled type 2 diabetes. *J Trace Elem Med Biol* (enviado).