

Artículo Original

Efecto del estímulo con zinc sobre la liberación de insulina en el modelo celular min-6

Rodrigo Valenzuela B.¹, Francisco Pérez B.² y Manuel Ruz O.²

Effects of zinc on insulin release by pancreatic min-6 cells

¹Escuela de Nutrición y Dietética.
Facultad de Medicina.
Universidad de Chile.
²Departamento de Nutrición.
Facultad de Medicina.
Universidad de Chile.

Correspondencia:
Rodrigo Valenzuela B.
Casilla 1227. Independencia,
Santiago, Chile.
Fono: 56-2-9786014
Fax: 56-2-9786182
E-mail: rvalenzuelab@med.uchile.cl

Recibido: 07 de Agosto de 2012
Aceptado: 31 de Agosto de 2012

Background: Zinc (Zn) supplementation in humans is associated with improved glycemic control in both type 1 (DM1) and type 2 diabetes (DM2). Furthermore, Zn has an important role in the metabolism of insulin, and possibly the prevention, development and evolution of DM2. **Aim:** To assess whether the stimulation of Zn in a pancreatic cell line (MIN-6) increases insulin release. **Material and Methods:** MIN-6 pancreatic cells were stimulated with Zn (ZnSO₄) at different concentrations (0, 0.25, 0.5 and 1 μ M) and timing (0, 6, 12 and 24 hours). After the stimulus, cells were incubated with 2.8mM glucose for 30 min and insulin release was measured in triplicate by ELISA. **Results:** Cell viability was maintained after stimulation with Zn at different times and concentrations. Only the stimulus with 0,25 μ M Zn at 6 hours, produced a significant increase in insulin levels ($p < 0.05$; Kruskal-Wallis test, comparing between all groups). **Conclusions:** Zn stimulation of a pancreatic cell line MIN-6 at six hours led to increased insulin release.

Key words: Zinc, insulin release, MIN-6 cell model.

Introducción

El zinc (Zn) es un micronutriente esencial y fundamental para el ser humano y otros organismos, donde este tiene una importante participación en el metabolismo del ADN (síntesis y transcripción), estabilización de proteínas, y en la actividad de más de 300 enzimas vinculadas directamente a procesos celulares tales como la división celular y la apoptosis^{1,2}. Además, el Zn es relevante para la mantención de un adecuado: i) estado redox intracelular; ii) respuesta inmunológica; iii) señalización celular; iv) función endo y exocrina pancreática y v) reparación de tejidos³. Siendo el Zn un micronutriente relevante en el metabolismo, cualquier alteración en su homeostasis puede generar diversas alteraciones y/o el desarrollo de diversas patologías entre las que destaca la diabetes. En este sentido, en 1938 se reportó por primera vez que los niveles de Zn en cadáveres de pacientes diabéticos eran un 50% menores en comparación a los cadáveres pacientes no diabéticos, sugiriendo una asociación entre la concentración de Zn y la diabetes tipo 1 y 2⁴. Además, en pacientes con diabetes el Zn en orina aumenta significativamente⁵⁻⁷. En la diabetes tipo 2, también se ha observado una disminución significativa en los niveles plasmáticos de

Zn^{8,9}, lo que puede indicar un deterioro en los niveles de Zn asociados directamente a la enfermedad. A diferencia de la diabetes tipo 2, en la diabetes tipo 1 el Zn plasmático tiende a aumentar, probablemente como resultado de la destrucción de las células β -pancreáticas, produciéndose un incremento en el aporte de Zn a la sangre^{10,11}. La diabetes tipo 2 es una compleja patología que puede presentar: i) resistencia a la insulina y/o ii) una disminución en la secreción de insulina, donde el Zn participaría principalmente en la preservación de la capacidad de liberar insulina. El Zn se encuentra en importantes concentraciones en los islotes pancreáticos y participa en la conversión de proinsulina en insulina y en la cristalización de insulina para su posterior liberación, lo que demuestra claramente la importancia del Zn en el metabolismo de esta hormona^{12,13}. Por otra parte, la insulina en presencia de Zn se puede asociar en hexámeros, estructuras más estables que facilitan su liberación al torrente sanguíneo, indicando la importancia del Zn para un correcto procesamiento, almacenamiento y liberación de la insulina¹⁴.

El Zn se secreta en forma conjunta con la insulina, y de hecho la hipersecreción de insulina puede agotar las reservas de Zn en las células β -pancreáticas¹⁵. Pero las funciones del Zn en el páncreas no sólo se limitan a las células β -pancreáticas,

dado que la suplementación con Zn en ratones *db/db* permitió reducir los niveles de glucosa e insulina en ayuna¹⁶. En ratas diabéticas suplementadas con Zn se observó una disminución significativa en el deterioro generado en la retina por el estrés oxidativo característico de la diabetes¹⁷. Además, en ratas tratadas previamente con aloxano o dithiozone (agentes tóxicos a nivel pancreático) se observó que la suplementación con Zn permitió prevenir la hiperglicemia y la destrucción de los islotes pancreáticos¹⁸. El Zn es un micronutriente fundamental para múltiples procesos en el organismo, además de presentar una serie de efectos beneficiosos frente a la diabetes, sin embargo, los mecanismos asociados a estos efectos aún son desconocidos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del estímulo con Zn sobre la liberación de insulina en el modelo celular MIN-6.

Material y Método

Cultivo celular y estímulo con Zn

Las células de la línea celular pancreática MIN-6 (ATCC™, University Boulevard, Virginia, U.S.A.) fueron mantenidas en un medio Eagle modificado Dulbecco's (DMEM, Life Technologies) el cual contenía glucosa (2,8 mM) suplementada con solución de suero fetal bovino al 15%, β-mercaptoetanol (5 μL/L), penicilina (100 unidades/mL), y estreptomycin (100 μg/mL) a 37°C en una atmósfera con 95% aire y 5% CO₂. Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 3 x 10⁵ células/mL, creciendo durante la noche a un 80% de confluencia. Previo al estímulo con Zn se realizaron pruebas de viabilidad celular determinando las dosis máximas posibles de utilizar. Las células fueron lavadas con buffer fosfato salino e incubados por 0, 6, 12 y 24 horas a 37°C en 0,5 mL de un medio que contenía sulfato de Zn (ZnSO₄) en diferentes (0; 0,25; 0,5 y 1 μM), utilizándose como control para determinar niveles basales de insulina un medio que no contenía Zn (ZnSO₄).

Medición de los niveles de insulina

Después del estímulo con Zn las células MIN-6 fueron incubadas por 30 minutos en una solución con glucosa (2,8 mM) más un de buffer de BSA KRBH al 0,5% (NaCl 129,4 mM; KCl 5,2 mM; CaCl₂ 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,3 mM; MgSO₄ 1,3 mM; NaHCO₃ 24,8 mM; y HEPES 10 mM a pH 7,4) y luego niveles de insulina (ng/mL) fueron determinados por triplicado en tres ensayos independientes mediante un kit ELISA ultrasensible (Mercodia, Carolina del Norte, USA).

Análisis estadístico

Los datos se presentan como el promedio ± desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con el test de mediana Kruskal-Wallis, seguido de comparación entre todos los grupos.

Resultados

En este modelo celular el estímulo con Zn (ZnSO₄) en los diferentes tiempos (0, 6, 12 y 24 horas) y concentraciones

Tabla 1. Niveles de insulina en el tiempo cero y a las 6, 12 y 24 posteriores al estímulo con Zn en la línea celular MIN-6

Zn (μM)	Insulina (ng/mL)			
	Tiempo de estímulo (horas)			
	0	6	12	24
0 (control)	3,40 ± 0,44	3,1 ± 0,33	3,50 ± 0,56	3,54 ± 0,84
0,25	3,21 ± 0,51	4,95 ± 0,56*	3,42 ± 0,83	2,86 ± 0,97
0,5	3,35 ± 0,28	3,33 ± 0,17	3,15 ± 0,07	3,17 ± 0,66
1	3,02 ± 0,36	3,12 ± 0,52	3,16 ± 0,06	3,09 ± 0,44

Los valores son promedios ± DS por triplicado en cada grupo experimental. Para establecer si existen diferencias entre los tratamientos (dosis de Zn y tiempo de estímulo) se realizó el test de Kruskal-Wallis seguido de comparación entre todos los grupos (p < 0,05). Se indica con un *cuando hay diferencias significativas entre los grupos.

nes utilizadas (0; 0,25; 0,5 y 1 μM) mantuvo la viabilidad de la línea celular pancreática MIN-6, donde en ninguno de los tiempos y concentraciones utilizadas se presentó una disminución significativa en los niveles basales de insulina (p > 0,05) (Tabla 1). Al evaluar el posible incremento en los niveles basales de insulina liberados por las células MIN-6 sólo el estímulo con Zn a las seis horas con una concentración de 0,25 μM generó un incremento significativo en los niveles de insulina (p < 0,05) en comparación con los otros grupos experimentales (tiempo y dosis) (Tabla 1).

Discusión

El páncreas es un órgano que tiene un importante contenido de Zn, el cual se ubica principalmente en los islotes pancreáticos, y modificaciones en los niveles intracelulares de Zn libre se producen en respuesta a estímulos externos, tales como un aumento en las concentraciones plasmáticas de glucosa¹⁹. En las células β-pancreáticas el Zn es esencial para el correcto procesamiento, almacenamiento y secreción de insulina²⁰ y la concentración de Zn aumenta considerablemente en los gránulos donde se almacena la insulina para su posterior secreción, permitiendo establecer que el Zn, está involucrado en el metabolismo, almacenamiento y tiempo de acción de la insulina²¹. Además el Zn actúa como un inhibidor de la secreción de glucagón, de hecho la secreción de Zn durante la hiperglicemia, parece ser una señal para las células α-pancreáticas supriman la secreción de glucagón²². En las células, el contenido de Zn además de estar estrictamente regulado, sus concentraciones varían significativamente, siendo la concentración intracelular de Zn libre del orden pico a nano molar, mientras que en plasma el contenido de Zn total es del orden micromolar. A nivel celular de Zn esta estrictamente regulado por dos familias de transportadores, la familia ZnT (SCL30A), donde su función es exportar Zn al espacio extra celular o incorporar Zn a determinados compartimentos celulares, reduciendo así los niveles citoplasmáticos de Zn²³. Y la familia ZIP (SLC39A), cuya función es importar Zn al intracelular o sacar Zn de determinados com-

Artículo Original

partimentos celulares, aumentando la concentración citoplasmática de Zn²⁴. En este sentido uno de los transportadores de Zn, específicamente el transportador SLC30A8 (ZnT8), el cual se expresa en monocitos y células pancreáticas²⁵ puede ver alterada su expresión tanto en la tanto en el caso de la diabetes tipo 1 como la tipo 2, situación atribuida a niveles elevados de citoquinas proinflamatorias, lo que además de repercutir en el metabolismo celular del Zn, alteraría la liberación de insulina, estableciendo la relevancia del Zn en el metabolismo de la insulina²⁶. Los resultados obtenidos en este estudio estimulan a la realización de nuevas investigaciones sobre el efecto del Zn sobre la liberación la insulina, considerando los cambios en i) los niveles intracelulares de Zn; ii) interacción entre el Zn con otros agentes o moléculas asociadas al metabolismo de la insulina; iii) modificaciones moleculares de los transportadores de Zn y iv) el potencial uso de la suplementación con Zn humanos como parte del tratamiento de la diabetes²⁷.

Agradecimientos

Este trabajo es parte de los productos generados con la adjudicación del Proyecto SOCHED 04-2010.

Referencias

- Kelleher SL, McCormick NH, Velásquez V, López V. 2011. Zinc in specialized secretory tissues: roles in the pancreas, prostate, and mammary gland. *Adv Nutr* 2:101-111.
- Sensi SL, Paoletti P, Koh JY, Aizenman E, Bush AI, Hershfinkel M. 2011. The neurophysiology and pathology of brain zinc. *J Neurosci* 31: 16076-16085.
- Ruz M. Zinc supplementation and growth. 2006. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9: 757-762.
- Scott DA, Fisher AM. 1938. The insulin and the zinc content of normal and diabetic pancreas. *J Clin Invest* 17: 725-728.
- McNair P, Kiilerich S, Christiansen C, Christensen MS, Madsbad S, Transbol I. 1981. Hyperzincuria in insulin treated diabetes mellitus-its relation to glucose homeostasis and insulin administration. *Clin Chim Acta.* 112: 343-348.
- Lau AL, Failla ML. 1984. Urinary excretion of zinc, copper and iron in the streptozotocin-diabetic rat. *J Nutr* 114: 224-233.
- Ripa S, Ripa R. 1995. Zinc and diabetes mellitus. *Minerva Med* 86: 415-21.
- Kinlaw WB, Levine AS, Morley JE, Silvis SE, Mc Clain CJ. 1983. Abnormal zinc metabolism in type II diabetes mellitus. *Am J Med.* 75: 273-77.
- Aguilar MV, Saavedra P, Arrieta FJ, Mateos CJ, Gonzalez MJ, Meseguer I, Martinez-Para MC. 2007. Plasma mineral content in type-2 diabetic patients and their association with the metabolic syndrome. *Ann Nutr Metab* 51: 402-06.
- Zargar AH, Bashir MI, Masoodi SR, Laway BA, Wani AI, Khan AR, et al. 2002. Copper, zinc and magnesium levels in type-1 diabetes mellitus. *Saudi Med J* 23: 539-42.
- Halim D, Khalifa K, Awadallah R, El-Dessoukey EA, Hafez T, El-Hawary Z. 1977. Serum mineral changes in alloxan diabetes before and after treatment with some hypoglycemic drugs. *Z Ernährungswiss Suppl* 16: 39-43.
- Zalewski PD, Millard SH, Forbes IJ, Kapaniris O, Slavotinek A, Betts WH, Ward AD, Lincoln SF, Mahadevan I. 1994. Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J Histochem Cytochem* 42: 877-884.
- Emdin SO, Dodson GG, Cutfield JM, Cutfield SM. 1980. Role of zinc in insulin biosynthesis. *Diabetologia* 19:174-82.
- Rutter GA. 2010. Think zinc: New roles for zinc in the control of insulin secretion. *Islets* 2: 49-50.
- Sprietsma JE, Schuitemaker GE. 1994. Diabetes can be prevented by reducing insulin production. *Med Hypotheses* 42: 15-23.
- Simon SF, Taylor CG. 2001. Dietary zinc supplementation attenuates hyperglycemia in db/db mice. *Exp Biol Med* 226: 43-51.
- Moustafa SA. 2004. Zinc might protect oxidative changes in the retina and pancreas at the early stage of diabetic rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 201: 149-155.
- Jansen J, Karges W, Rink L. 2009. Zinc and diabetes-clinical links and molecular mechanisms. *J Nutr Biochem* 20: 399-417.
- Liuzzi JP, Robert RJ. 2004. Cousins. *Mammalian zinc transporters.* *Annual Rev Nutrition* 24:151-172.
- Sherrill JW. 1938. Clinical experiences and experiments with protaimn-zinc insulin: The potential danger of hypoglycemia. *Cal West Med* 49: 13-20.
- Foster MC, Leapman RD, Li MX, Atwater I. 1993. Elemental composition of secretory granules in pancreatic islets of Langerhans. *Biophys J* 64: 525-532.
- Gyulkhandanyan AV, Lu H, Lee SC, Bhattacharjee A, Wijesekara N, Fox JE, MacDonald PE, Chimienti F, Dai FF, Wheeler MB. 2008. Investigation of transport mechanisms and regulation of intracellular Zn²⁺ in pancreatic alpha-cells. *J Biol Chem* 283: 10184-10187.
- Liuzzi JP, Babo JA, Lichten LA, Samuelson DA, Cousins RJ. 2004. Responsive transporter genes within the murine intestinal-pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14355-14360.
- Valentine RA, Jackson KA, Christie GR, Mathers JC, Taylor PM, Ford D. 2007. ZnT5 variant B is a bidirectional zinc transporter and mediates zinc uptake in human intestinal Caco-2 cells. *J Bio Chem* 282: 14389-14393.
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. 2007. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445: 881-885
- Chimienti F, Devergnas S, Pattou F, Schuit F, Garcia-Cuenca R, Vandewalle B, Kerr-Conte J, Van Lommel L, Grunwald D, Favier A, Seve M. 2006. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J. Cell Sci* 119: 4199-4106.
- Valenzuela R, Pérez F, Ruz M. 2012. Zinc y diabetes: un nutriente importante en su prevención y tratamiento. *Rev Chil Endocrinol Diabetes* 5: 76-81.