

EFFECTO DE LA CURCUMINA SOBRE EL PERFIL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN HÍGADO DE RATONES DIABÉTICOS *DB/DB*

Meléndez-Salcido, Cecilia Gabriela (1), Silva-Gaona, Oscar Gerardo (2), Ramírez-Emiliano, Joel (2), Pérez-Vázquez, Victoriano (2)

1 [Químico Bacteriólogo Parasitólogo, Universidad Autónoma de Chihuahua] | [a271718@uach.mx]

2 [Departamento de ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato] | [vpvazquez@ugto.mx]

Resumen

La diabetes es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia y resistencia a la insulina. La curcumina es un potencial agente antidiabético que regula la expresión genética de diferentes vías de señalización. Se pretende determinar el efecto de la curcumina sobre la expresión de proteínas en hígado de ratones diabéticos. Se utilizaron cuatro grupos de ratones ($n=3$): silvestres (WT), diabéticos (*db/db*) y WT y *db/db* tratados con 0.75% de curcumina en el alimento por 8 semanas. Las proteínas de hígado se separaron por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE). Los geles fueron analizados con el software Image Master 2D Platinum. Se detectaron 352 spots en cada grupo, al comparar el grupo *db/db* con el WT, se encontraron 21 diferencias significativas, de las cuales 5 proteínas disminuyeron su expresión, 13 proteínas aumentaron su expresión y 3 proteínas desaparecieron. Al comparar el grupo *db/db+C* con el grupo *db/db* se observó que la curcumina disminuyó la expresión de 4 proteínas, aumentó la expresión de 2 proteínas y desapareció la expresión de 3 proteínas. Se concluyó que la curcumina modifica la expresión de proteínas en hígado de ratones diabéticos.

Abstract

Diabetes is a metabolic disease characterized by hyperglycemia and insulin resistance. Curcumin is a potential antidiabetic agent which regulates gene expression and different signaling pathways. The objective was to determine the effect of curcumin on the expression of proteins in liver of diabetic mice. It was used four groups of mice ($n = 3$): Wild type (WT), diabetic (*db/db*) and WT and *db/db* treated with 0.75% of curcumin in diet for 8 weeks. The liver proteins were separated on two-dimensional electrophoresis polyacrylamide gel (2D-PAGE). Gels were analyzed in the Image Master 2D Platinum software. Three hundred and fifty-two spots on each groups were present. When comparing the *db/db* group with WT, 21 significant differences were found, of which 5 proteins decreased their expression, 13 proteins increased their expression and 3 proteins disappeared. Comparing the *db/db+C* group with *db/db*, it was observed that curcumin decreased expression of 4 proteins, increased expression of 2 proteins and disappeared 3 proteins. It was concluded that curcumin modifies the expression of proteins in liver of diabetic mice.

Palabras Clave

Curcumina, Diabetes mellitus, Hígado, Proteómica.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la cual se caracteriza por resistencia a la insulina y la presencia de hiperglucemia. La hiperglucemia crónica conlleva complicaciones en diferentes órganos, entre ellos el hígado, donde se altera la homeostasis de la glucosa, la gluconeogénesis y la oxidación de ácidos grasos [1,2].

Los modelos animales han contribuido en gran medida a nuestra comprensión de la DM2 y al desarrollo de nuevas terapias. Un modelo comúnmente usado es el ratón db/db que tiene una mutación en el gen que codifica el receptor de la leptina; este modelo de DM2 ha sido bien caracterizado y se ha observado que la enfermedad se desarrolla de manera similar a los humanos, incluyendo hiperfagia, hiperglicemia, resistencia a la insulina y la obesidad [3].

La obesidad y la DM2 están asociadas con inflamación crónica de bajo grado, debido, en parte, a la activación del factor nuclear kappa de los linfocitos B (NF-κB). A su vez, NF-κB desregula la actividad de otras vías de señalización metabólicas donde participa la Sirtuina 1 (SIRT1) y la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), proteínas reguladoras de ciertas rutas intracelulares como la captación de glucosa en el músculo esquelético y la oxidación hepática de los ácidos grasos [4].

A pesar de que es posible el control de la glucosa mediante ejercicio y dieta y que existen fármacos para el tratamiento de la DM2, esta enfermedad y sus complicaciones siguen siendo un problema grave de salud en todo el mundo. La curcumina, un componente activo de la *Curcuma longa*, ha sido utilizada durante siglos por habitantes de la India, principalmente como un condimento. Sin embargo, se han descrito varias propiedades farmacológicas debido a que tiene efectos antioxidantes, anti-inflamatorios e hipoglucemiantes [5].

Se ha sugerido que la Curcumina tiene actividad anti-inflamatoria a través de la modulación de una ruta de señalización inflamatoria u oxidativa que incluye al NF-κB, el factor relacionado con el factor nuclear E2 (Nrf2) y/o las rutas de señalización dependientes de AMPK [6].

La electroforesis en 2 dimensiones es una de las técnicas más utilizadas en proteómica, para la

identificación de nuevos blancos terapéuticos y biomarcadores que puedan ser utilizados en el diseño o evaluación de nuevos fármacos.

En este trabajo se estudió el efecto de la curcumina sobre la expresión de proteínas en hígado de ratones diabéticos obesos db/db, mediante un análisis proteómico comparativo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo animal

Se usaron ratones diabéticos *db/db* y no diabéticos de la cepa C57BL6J, de 5 semanas de edad, adquiridos de Laboratorios Harlan, Estados Unidos, siguiendo los lineamientos de la norma oficial mexicana “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” (NOM-062-ZOO-1999) y de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” del NIH.

Tratamiento con curcumina

Se dividieron los ratones en cuatro grupos, de tres ratones cada uno. No diabéticos o *wild type* (WT), no diabéticos con curcumina (WT+C), diabéticos (*db/db*) y diabéticos tratados con curcumina (*db/db*+C). La curcumina se administró en la dieta en una proporción 0.75% (p/p) de alimento, durante 8 semanas.

Determinación de peso corporal y glucosa en Sangre

Los ratones fueron pesados una vez finalizado el tratamiento y al momento del sacrificio se midió la concentración de glucosa sanguínea.

Obtención del hígado de los ratones

Al término del tratamiento se sacrificaron los ratones por dislocación cervical, y se obtuvo el hígado. Inmediatamente el hígado se lavó con buffer de lavado (20 mM TRIS/HCl, 10 mM EDTA, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7.8) para remover la sangre y se almacenó en el mismo buffer de lavado a -80 °C hasta su utilización.

Extracción de proteínas

Se homogenizó 1 g de hígado en tubo potter en 3 mL de buffer de extracción de proteína (Sacarosa 0.7 M, Tris 0.5 M, KCl 30 mM, EDTA 50 mM, 2- β -mercaptoetanol 2%, PVPP 12 mg/mL, a 4°C) con inhibidor de proteasas. Se añadió 3 mL de fenol saturado en agua y se incubó por 10 min a 4°C. El homogenizado se centrifugó a 10 000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, posteriormente se recuperó la fase fenólica y se re-extrajo con igual volumen de buffer de extracción. Se volvió a centrifugar (10,000 rpm/10 min/ 4°C), se recuperó la fase fenólica y se precipitó en 5 volúmenes de acetato de amonio 0.1 M en metanol frío (-20°C, toda la noche). Posteriormente, se lavó la pastilla tres veces con acetato de amonio 0.1 M en metanol (10 000 rpm/ 10 min/ 4°C) y una vez con acetona al 80%; la pastilla se secó y re suspendió en 300 μ L de buffer de lisis (Urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, TBP 2mM, anfolinas 2%, DTT 60mM).

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se determinó con un kit comercial (2-D Quant Kit, GE Healthcare Biosciences), basado en el método Lowry. La absorbancia se midió a 480 nm en un espectrofotómetro MultiskanGo usando agua destilada como blanco.

Perfil electroforético

Se realizó el perfil electroforético en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes. En cada carril se cargaron 15 μ g de proteína. Carril 1, marcador de peso molecular. Carriles 2-4, grupo WT. Carriles 5-7, WT+C. Carriles 8-10, *db/db*. Carriles 11 -13, *db/db*+C.

Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)

La primera dimensión de electroforesis (IEF) se realizó utilizando una unidad Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). Se hidrataron las tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG), con 750 μ g de proteína en buffer de lisis (Urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 40 mM, Anfolinas 2%), en el dispositivo Ettan IPG box, posteriormente se agregaron 2 mL de aceite mineral por cada tira, las tiras se dejaron hidratando 12 horas. Una vez hidratadas las tiras fueron colocadas en el Manifold con 108 mL de

aceite mineral. La separación en el Ettan IPGphor se realizó a un voltaje total de 57000 Vh.

Para la segunda dimensión se prepararon geles de poliacrilamida (12.5%) de 24 cm², las tiras del IEF fueron tratadas con solución de equilibrio-DTT (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M Urea, 30% v/v Glicerol, 2% SDS, 0.5% DTT y trazas de azul de bromofenol, 14 min), y solución de equilibrio-iodoacetamida (en lugar de DTT, 4.5% Iodoacetamida, 14 min), se colocaron las tiras sobre los geles de poliacrilamida. Se estableció un perfil de corrida de 5 Watts 45min, y 180 Watts hasta que la línea de corrida alcanzara 1 cm arriba de la base de los geles. Los geles se tiñeron con una solución de comassie coloidal durante 96 h. Los geles se destiñeron con varios lavados con solución de ácido acético, etanol y agua desionizada (1:4:5).

Análisis de los cambios de expresión de proteínas

Para encontrar los cambios de expresión diferencial de las proteínas, los geles se digitalizaron en el escáner ImageScanner III (GE Healthcare) y se analizaron con el software ImageMaster 2D Platinum ver. 7.0 (GE Healthcare) de acuerdo al manual de uso.

Análisis estadístico

El peso corporal y la glucosa sanguínea se reportan como la media \pm error estándar (EE) y se utilizó una prueba estadística no paramétrica. La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para encontrar diferencias significativas en los cambios de expresión de proteínas entre los grupos. Se aceptó como significativa una $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso final de los ratones *db/db* y *db/db*+C (48.98 y 45.93 respectivamente) fue mayor que el de los ratones WT y WT+C (27.56 y 25.03 respectivamente). Los ratones diabéticos pesaron más que los ratones sanos al inicio y al final del tratamiento (Fig. 1). Otros estudios han reportado en modelos murinos alimentados con dieta alta en grasa, en diabéticos y en humanos, que la suplementación con curcumina disminuye y/o previene la ganancia del peso corporal [7].

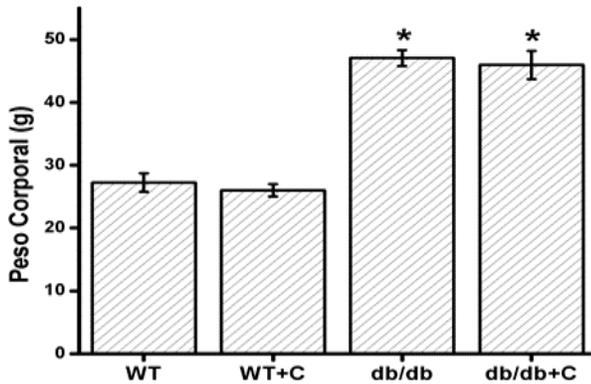


Figura 1. *Peso corporal de los ratones medido al final del tratamiento.* Los datos representan la media \pm EE (n=3). Diferencia significativa entre db/db vs WT y WT+C. Diferencia significativa entre db/db+C vs WT y WT+C. * $p < 0.01$.

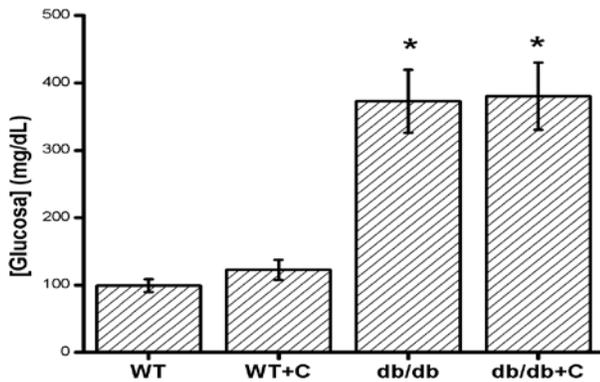


Figura 2. *Concentración de glucosa al final del tratamiento.* Los datos representan la media \pm EE (n=3). Diferencia entre los grupos db/db vs WT y WT+C. Diferencia entre los grupos db/db+C vs WT y WT+C. * $p < 0.01$.

Sin embargo, se debe considerar la edad del ratón, y la dosis de curcumina, el tiempo de tratamiento y la vía de administración empleada. El aumento de peso se asocia a que los ratones aún se encontraban en crecimiento.

La figura 2 muestra que la concentración de glucosa sanguínea fue mayor en los grupos diabéticos que en los grupos control ($p < 0.01$). Esto demuestra que estamos trabajando con ratones diabéticos, como se ha reportado previamente [8].

Antes de realizar la electroforesis 2D se realizó un perfil electroforético para corroborar la concentración de las muestras y la integridad y buena separación de las proteínas (Fig. 3).

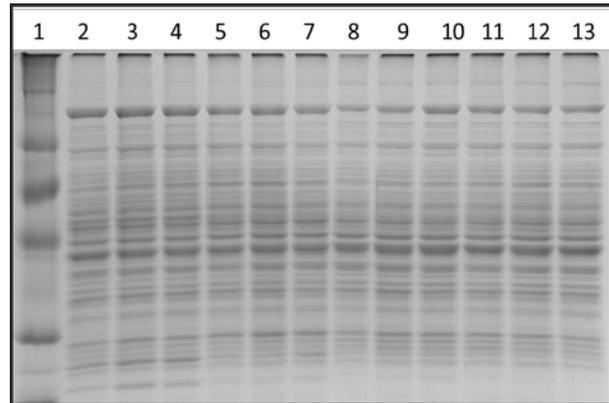


Figura 3. Gel de poliacrilamida al 10% que muestra la separación electroforética de cada una de las muestras de proteínas de hígado de los ratones. En cada carril se cargaron 15 μ g de proteína. Carril 1, marcador de peso molecular. Carriles 2-4, WT. Carriles 5-7, WT+C. Carriles 8-10, db/db. Carriles 11-13, db/db + C.

El análisis proteómico diferencial reveló 352 spots, en los cuales al comparar el grupo db/db con el WT, se encontraron 21 diferencias significativas, de las cuales 5 proteínas disminuyeron su expresión, 13 proteínas aumentaron su expresión y 3 proteínas desaparecieron (Fig. 4). Otros estudios de proteómica comparativa han reportado la expresión diferencial de proteínas en hígado de ratones diabéticos obesos de 10 semanas de edad, comparados con un grupo control. Algunas de estas proteínas, identificadas por espectrometría de masas, están involucradas en procesos metabólicos de carbohidratos, lípidos y proteínas, lo cual sugiere que la alteración en la expresión de estas proteínas tiene un rol importante en la patogénesis de la obesidad y la diabetes [9].

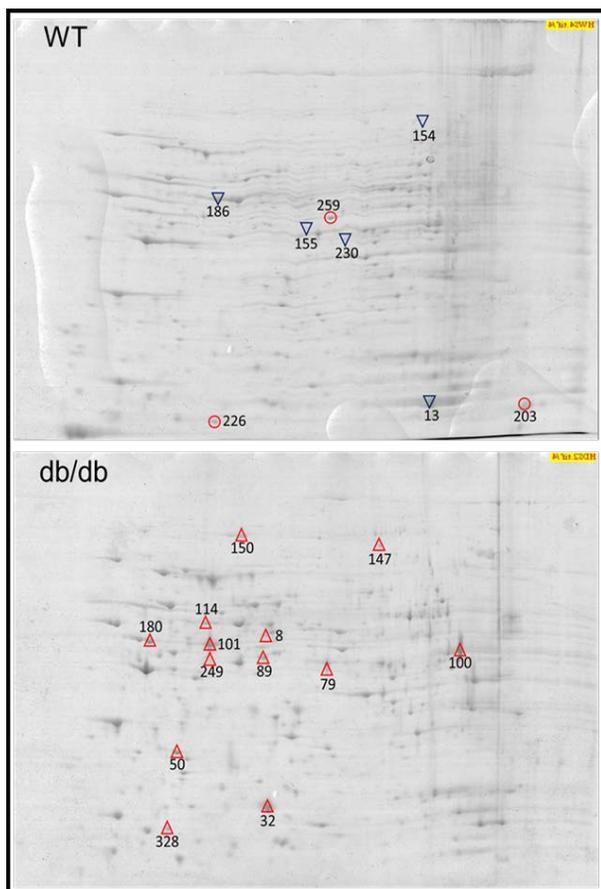


Figura 4. Cambios de expresión de proteínas entre los grupos *db/db* y *WT*. ▼, proteínas que disminuyeron su expresión (5). ▲, proteínas que aumentaron su expresión (13). ●, proteínas que desaparecieron (3).

Para analizar el efecto de la curcumina sobre la expresión de proteínas en el hígado de los ratones diabéticos comparamos el grupo *db/db*+C con el grupo *db/db* y encontramos 9 diferencias significativas, dentro de las cuales 4 proteínas disminuyeron su expresión, 2 proteínas aumentaron su expresión y 3 proteínas desaparecieron con la curcumina (Fig. 5). Recientemente se reportó que la curcumina incrementa la expresión de AMPK y PPAR γ en hígado de ratones diabéticos, cuya función es inhibir la producción hepática de glucosa y la lipogénesis, procesos afectados en la obesidad y DM2; así como la disminución de NF- κ B, lo cual se traduce en disminución de la inflamación presente en la obesidad y DM2 [8]. Estos y otros resultados sugieren que la curcumina tiene efecto sobre la expresión de otras proteínas, como se encontró en este trabajo.

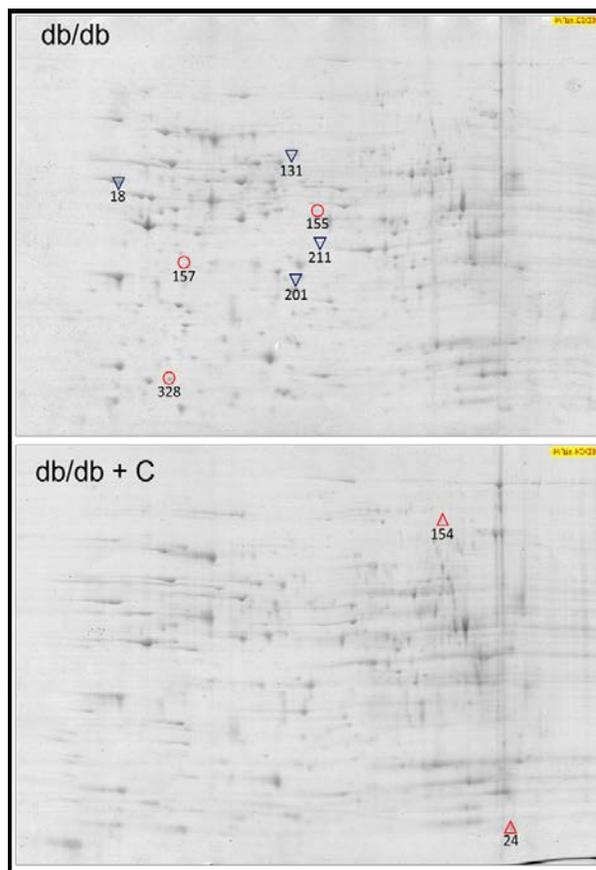


Figura 5. Cambios de expresión de proteínas entre los grupos *db/db*+C y *db/db*. ▼, proteínas que disminuyeron su expresión (4). ▲, proteínas que aumentaron su expresión (2). ●, proteínas que desaparecieron (3).

CONCLUSIONES

La curcumina tiene efecto benéfico en los ratones diabéticos a través de la regulación de la expresión de proteínas hepáticas. La curcumina previno cambios de expresión en el hígado de los ratones diabéticos, disminuyó la expresión de 4, aumentó la expresión de 2 y desapareció la expresión de 3 proteínas. Sería interesante identificar las proteínas con cambios de expresión, para así encontrar su relevancia funcional y efecto de la curcumina sobre la patogénesis de la DM2.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Depto. de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato Campus León por permitirme realizar este trabajo. Al Dr. Victoriano Pérez por su asesoría y a Gerardo Silva por su apoyo, paciencia y coordinación de la investigación.

REFERENCIAS

- [1] Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A. & Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 112(12), 1821-1830.
- [2] Al-Mukhtar, SB, Fadhil NN & Hanna BE. (2012). General and gender characteristics of type 2 diabetes mellitus among the younger and older age groups. *Oman Med J.* 27(5), 375-382.
- [3] Lee, AW; Cox, RD. (2011). Use of mouse models in studying type 2 diabetes mellitus. *Expert Rev Mol Med.* 13:e1.
- [4] Oakhill, J S., Scott, JW. & Kemp, BE. (2012). AMPK functions as an adenylate charge regulated protein kinase. *Trends Endocrinol Metab.* 23(3), 125-132.
- [5] Picard, F. & Auwerx, J. (2002). PPAR (gamma) and glucose homeostasis. *Annual Review of Nutrition,* 22(1), 167-197.
- [6] Gupta, SC., Patchva, S., Koh, W. & Aggarwal, BB. (2012). Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 39(3), 283-299.
- [7] Alappat, L. & Awad, AB (2010). Curcumin and obesity: evidence and mechanisms. *Nutr Rev.* 68(12), 729-738.
- [8] Jiménez-Flores, LM, Ramírez-Emiliano, J, Macías-Cervantes, MH, López-Briones, S. & Pérez-Vázquez, V. (2014). La curcumina incrementa la expresión de AMPK y PPAR γ y disminuye la expresión de NF- κ B en hígado de ratón diabético db/db. *Acta Universitaria,* 24(NE-2), 23-29.
- [9] Guzman-Flores JM., Flores-Perez, EC., Hernandez-Ortiz, M., López-Briones, S., Ramírez-Emiliano, J., Encarnación-Guevara, S. & Pérez-Vázquez, V. (2016). Comparative Proteomics of Liver of the Diabetic Obese db/db and non-Obese or Diabetic Mice. *Current Proteomics.* En prensa.