

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATÓN DIABÉTICO EN RESPUESTA A LA CURCUMINA

Puentes-Gurrola, Fabiola (1), Silva-Gaona, Oscar Gerardo (2), Macías-Cervantes, Maciste H (2)
Ramírez-Emiliano, Joel (2), Pérez-Vázquez, Victoriano (2)

1 [Programa de Químico Bacteriólogo Parasitólogo, Universidad Autónoma de Chihuahua] | Dirección de correo electrónico: [a271740@uach.mx]

2 [Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la salud, Campus León, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [vpvazquez@ugto.mx]

Resumen

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una de las enfermedades crónico-degenerativas con mayor prevalencia a nivel mundial y representa un grave problema de salud pública. La curcumina muestra una fuerte actividad anti-oxidante y anti-inflamatoria cuando se usa como un remedio para la prevención y tratamiento de las enfermedades crónicas como la diabetes, la obesidad y el cáncer, entre otras. En este proyecto se analizó el efecto de la curcumina sobre la expresión de proteínas de músculo esquelético en ratones diabéticos *db/db*. Las proteínas del músculo esquelético extraídas de los diferentes grupos de ratones fueron separadas por 2D-PAGE y las variaciones en la expresión de proteínas fueron estudiadas usando el Software ImageMaster2D Platinum. Al comparar el grupo *db/db* con WT, se encontraron 20 diferencias significativas, de las cuales 11 proteínas disminuyeron su expresión, 6 proteínas aumentaron su expresión, 2 proteínas desaparecieron y 1 proteína apareció de novo. Comparando el grupo *db/db* +C con el *db/db*, se observó que la curcumina disminuyó la expresión de 10 proteínas, incremento la expresión de 8 proteínas y desapareció 2 proteínas. Se concluyó que la curcumina previene la expresión de proteínas en el músculo de ratones diabéticos.

Abstract

Type 2 Diabetes Mellitus (DM2) is a chronic degenerative diseases most prevalent worldwide and represents a serious public health problem. Curcumin shows a strong anti-oxidant and anti-inflammatory activity when used to prevention and treatment of chronic diseases such as diabetes, obesity, cancer, among others. In this project the effect of curcumin on the expression of skeletal muscle proteins in diabetic mice *db/db* was analyzed. Skeletal muscle proteins extracted from the different groups of mice were separated by 2D-PAGE and changes in protein expression were studied using the software ImageMaster2D Platinum. When comparing the *db/db* group with WT, 20 significant differences were found, of which 11 proteins decreased their expression, 6 proteins increased their expression, 2 proteins disappeared and 1 protein appeared. Comparing the *db/db*+C group with *db/db*, it was observed that curcumin decreased expression of 10 proteins, increased expression of 8 proteins and disappeared 2 proteins. It was concluded that curcumin prevents the expression of proteins in muscle of diabetic mice.

Palabras Clave

Curcumina; Diabetes; Expresión de proteínas; Obesidad; Proteómica

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia resultante de la alteración en la secreción y/o acción de la insulina, lo que ocasiona resistencia de ésta en diferentes órganos y tejidos. A su vez, la hiperglucemia incrementa la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), de productos finales de glicación avanzada (AGES), e incrementa la acumulación de glucosa en los glóbulos rojos en forma de hemoglobina glucosilada [1].

La *Cúrcuma longa* es una planta medicinal tradicional con una larga historia de uso como tratamiento para las enfermedades inflamatorias en China y el sudeste de Asia [2]. Controla la inflamación, el crecimiento celular, y la apoptosis; por lo tanto, es útil para prevenir y tratar algunas enfermedades, gracias a sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias. La curcumina, derivada de la *Cúrcuma longa*, es un agente terapéutico potencial en enfermedades crónicas.

El músculo esquelético contribuye a mantener el balance sistémico de energía y sustratos, mientras que la pérdida de este balance induce enfermedades relacionadas con la obesidad y la DM2. Hojiund, y cols., en 2003, encontraron incrementada la expresión de HSP90 y GRP78 en músculo de pacientes diabéticos [3]. Esto ocurre probablemente por la formación de ROS, que conduce a un incremento en la cantidad de proteínas desnaturalizadas y mal plegadas. También sugirieron que la disminución de las proteínas de estrés celular contribuye a la patogénesis de la diabetes [3].

La proteómica abarca el análisis sistemático de proteínas expresadas en una condición específica y tiene un enorme potencial en la identificación de proteínas asociadas a diferentes enfermedades y sus complicaciones. El perfil de expresión brinda información valiosa sobre las proteínas expresadas diferencialmente durante la enfermedad que podrían usarse como marcadores de diagnóstico o blancos terapéuticos en el descubrimiento y evaluación de nuevos fármacos [4].

Para estudiar la DM2, diversos grupos han elaborado mapas de electroforesis bidimensional,

ahora usados como referencia para comparar los cambios de expresión de proteínas en tejidos diabéticos [5,6]. En el presente trabajo se analiza el efecto de la curcumina sobre la expresión de proteínas de músculo esquelético en ratones diabéticos.

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. Wild type (WT), Wild type tratados con curcumina (WT+C), diabéticos (*db/db*) y diabéticos tratados con curcumina (*db/db*+C) de 5 semanas de edad. A los grupos tratados se añadió a su dieta normal 0.75% (p/p) de curcumina durante 8 semanas.

Determinación de Peso Corporal y Glucosa en Sangre

Los ratones fueron pesados al final del tratamiento y al momento del sacrificio se midió la concentración de glucosa en sangre con el kit comercial (Accutrend® GCT, Roche, Spain).

Obtención de Músculo Esquelético de los Ratones

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

Extracción y Cuantificación de Proteínas

La extracción de proteínas se realizó utilizando el Sample Grinding kit (GE Healthcare) como se reportó previamente [6,7]. La proteína se re suspendió en buffer de lisis (7M urea, 2M Thiourea, 4% (p/v) CHAPS, 40mM DTT) y se cuantificó 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 Multiskan GO.

Perfil Electroforético

Se realizó el perfil electroforético en geles de poli(acrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes cargando 15 μ g de proteína por carril.

Electroforesis Bidimensional (2D-PAGE)

Primera dimensión de electroforesis (IEF). Se hidrataron tiras en gradiente de pH inmovilizado (IPG), pH 3-10L de 24 cm, en el dispositivo Ettan IPG box, con buffer de lisis (7M urea, 2M Tiourea, 4% (p/v) CHAPS, 40mM DTT, 2% Anfólinas) conteniendo 700 μ g de proteína, cada tira fue sellada con 2mL de aceite mineral y se hidrataron por 12 horas. Las tiras se colocaron en la unidad Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) y se aplicó un voltaje total de 42800 Vh. Antes de la segunda dimensión, cada tira se equilibró durante 15 minutos en buffer de equilibrio (50mM de TRIS-HCl pH 8.8, Urea 6M, Glicerol (87%) 30% (v/v), SDS 2% (w/v), DTT 0.5%, trazas de bromofenol azul) y 15 minutos en el mismo buffer, pero con 4.5% (w/v) de yodoacetamida en lugar del DTT.

Segunda dimensión de electroforesis. Se colocaron las tiras en geles de poli(acrilamida (12.5%) de 24 cm², corrieron 45 minutos a 5 Watts y a 180 Watts en la cámara de electroforesis Ettan Dalt Twelve (GE Healthcare) hasta que la línea de corrida alcanzó 1 cm antes de la base de los geles (5 horas aprox.). El patrón de separación de proteínas se visualizó mediante la tinción de Comassie coloidal (96 horas). Los geles se destiñeron con solución de ácido acético, etanol y agua desionizada (1:4:5).

Análisis de los cambios de expresión de proteínas

Los geles obtenidos 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). Se utilizó una prueba estadística no paramétrica. La

prueba Kruskal-Wallis se utilizó para encontrar diferencias significativas en los cambios de expresión de proteínas entre los grupos y se aceptó una prueba significativa con una $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso corporal de los ratones diabéticos (*db/db*, 47,06 \pm 1,27 y *db/db+C*, 45,948 \pm 2,26) fue mayor que el peso de los ratones no diabéticos (WT, 27,256 \pm 1,41 y WT+C 25,99 \pm 0,97) (Fig.1). Resultados similares fueron reportados en un artículo reciente [7]. Sin embargo, la curcumina no tuvo influencia sobre el peso corporal de los ratones.

La concentración de glucosa sanguínea es mayor en los grupos *db/db* y *db/db+C* que en los grupos WT y WT+C, con esto comprobamos que los ratones eran diabéticos. La curcumina, en este estudio, no influyó sobre la concentración de glucosa (Fig. 2). Sin embargo, Martínez Morúa y cols. [8], sugirieron aumentar la concentración de curcumina, a 0.75% o 1%, para observar efectos sobre el peso corporal y la glucosa sanguínea.

Antes de continuar con la electroforesis 2D se obtuvo el perfil electroforético de los 4 grupos de estudio donde todas las muestras presentaron la misma concentración, integridad y buena separación (Fig. 3).

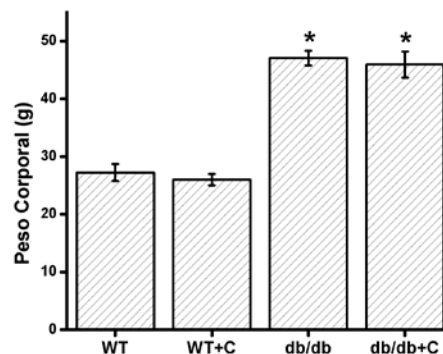


Figura 1. Peso corporal de los ratones al finalizar el tratamiento. Los datos representan la media \pm EE (n=3). Diferencia significativa entre *db/db* vs WT y WT+C. Diferencia significativa entre *db/db+C* vs WT y WT+C. * $p < 0.01$.

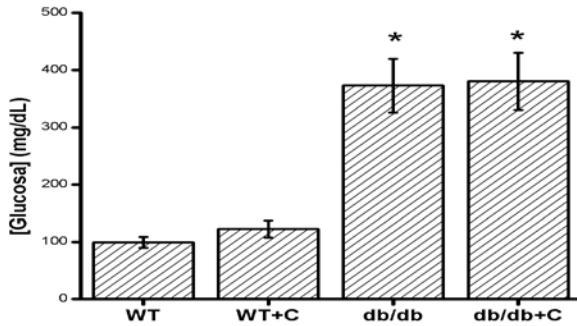


Figura 2. Concentración de glucosa al final del tratamiento. Los datos representan la media \pm EE (n=3). Diferencia entre los grupos *db/db* vs *WT* y *WT+C*. Diferencia entre los grupos *db/db+C* vs *WT* y *WT+C*. * $p < 0.01$.

Al hacer el análisis proteómico diferencial, se encontraron 20 cambios de expresión diferencial en el grupo de ratones diabéticos (*db/db*) comparado con el grupo WT, de las cuales 11 disminuyeron, 6 aumentaron, 2 desaparecieron y 1 apareció de novo (fig. 4).

Estudios recientes han reportado el análisis proteómico diferencial de músculo esquelético humano, encontrando cambios de expresión de proteínas implicadas en el estrés celular, perturbaciones en la síntesis del ATP y en el metabolismo mitocondrial, por ejemplo, la baja regulación de la ATP sintasa subunidad β y la creatina quinasa B, en pacientes con DM2 [3].

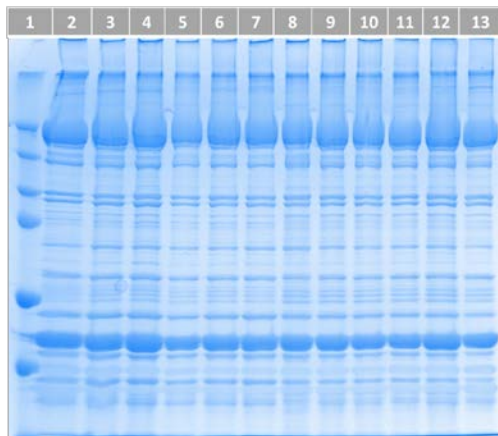


Figura 3. Perfil electroforético de las proteínas de músculo. Gel de poliacrilamida al 10% que muestra la separación electroforética de las proteínas. En cada carril se cargaron 15 μ g de proteína. Carril 1, marcador de peso molecular. Carriles 2-4, WT. Carriles 5-7, WT+C. Carriles 8-10, *db/db*. Carriles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

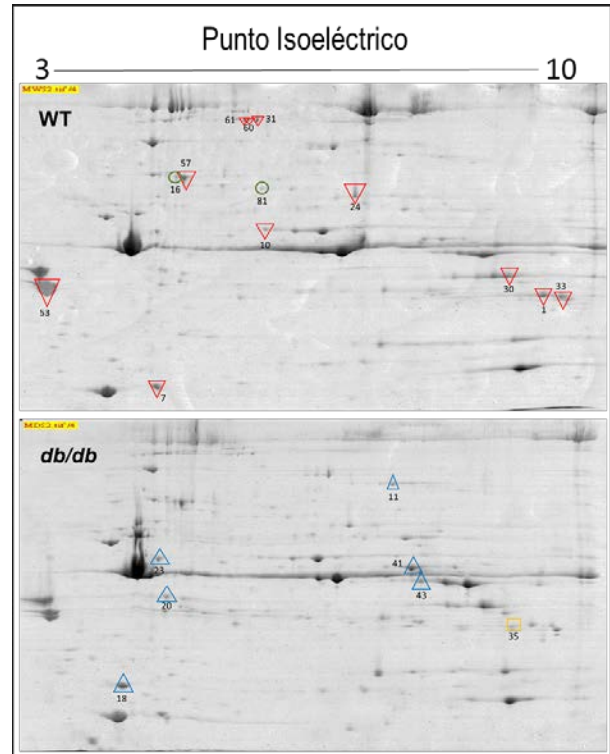


Figura 4. Análisis diferencial de expresión de proteínas en ratones WT y *db/db*. \blacktriangle , Proteínas que aumentaron su expresión (6). \blacktriangledown , Proteínas que disminuyeron (11). \circ , Proteínas que desaparecieron (2). \square , Proteínas que aparecieron de novo (1).

Pérez-Vázquez V y cols. analizaron el perfil de proteínas de páncreas de ratones diabéticos y ratones control e identificaron proteínas como la α -amilasa pancreática, el citocromo b5, la litostatina 1 y 2, y el quimotripsinogeno B, entre otras, que están involucradas en el metabolismo de carbohidratos y proteínas, en el estrés oxidativo y en la inflamación, relacionada con la DM2 [6].

Para analizar el efecto de la curcumina sobre la expresión de ratones diabéticos se comparó el grupo de ratones diabéticos tratados con curcumina, con los diabéticos no tratados encontrando 20 diferencias significativas, de las cuales 10 disminuyeron su expresión, 8 la aumentaron y 2 desaparecieron (Fig. 5). Con esto se demuestra que la curcumina regula la expresión de proteínas en músculo esquelético en los ratones diabéticos como se ha sugerido en otros estudios en hígado y páncreas de ratones diabéticos.

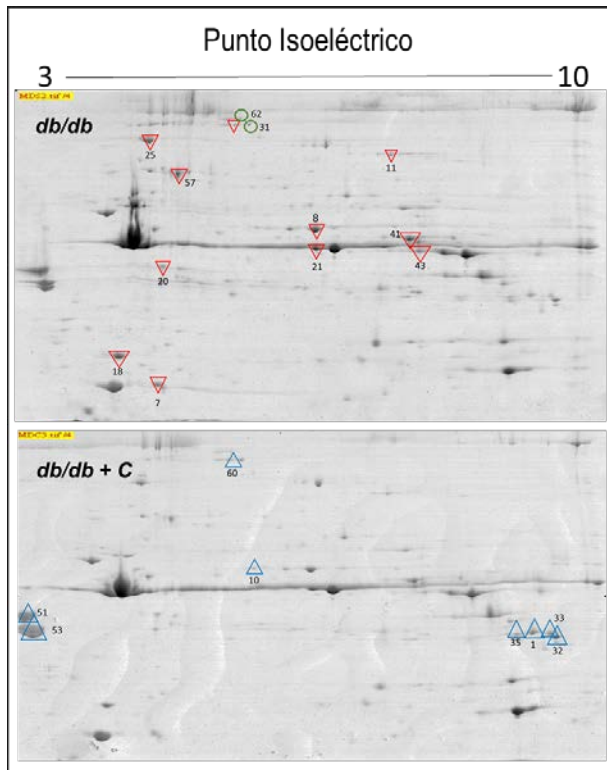


Figura 5. Análisis diferencial de expresión de proteínas en ratones *db/db* y *db/db + C*. ▲, Proteínas que aumentaron su expresión (8). ▼, Proteínas que disminuyeron (10). ○, Proteínas que desaparecieron (2).

En hígado de ratones diabéticos la curcumina aumentó la expresión de la PPAR γ y AMPK y disminuyó la proteína NF- κ B en los ratones *db/db*, lo que sugiere que la curcumina tiene un efecto benéfico para el tratamiento y prevención de las complicaciones de la DM2 [7].

CONCLUSIONES

La curcumina modifica la expresión de proteínas en el músculo esquelético de ratones diabéticos; lo que sugiere que la curcumina puede ser utilizada para la prevención y/o tratamiento de las complicaciones de la DM2. Sería importante identificar las proteínas con cambios de expresión diferencial en respuesta a la curcumina para conocer su relevancia funcional en la DM2 sus complicaciones y usarlas como biomarcadores para la evaluación de nuevos fármacos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Victoriano Pérez por su asesoría en este proyecto. A Gerardo Silva por apoyo incondicional para realizar esta investigación. Al Depto. de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato Campus León por su aceptación para que este proyecto fuera realizado.

REFERENCIAS

- [1] Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(5):1047-53 doi: 10.2337/diacare.27.5.1047
- [2] Lestari ML, Indrayanto G. (2014). Curcuim. *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol*, 39, 113- 204. doi: 10.1016/B978-0-12-800173-8.00003-9.
- [3] Højlund K, Wrzesinski K, Larsen PM, et al. (2003). Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes. *J Biol Chem.*, 278(12):10436-42. doi: 10.1074/jbc.M212881200
- [4] Khurana M, Traum AZ, Aivado M, et al. (2006). Urine proteomic profiling of pediatric nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 21(9):1257-65. doi: 10.1007/s00467-006-0165-8
- [5] Sánchez JC, Chiappe D, Converset V, et al. (2001). The mouse SWISS-2D PAGE database: a tool for proteomics study of diabetes and obesity. *Proteomics*. 1(1):136-63.
- [6] Victoriano Pérez-Vázquez, Juan M. Guzmán-Flores, Daniela Mares-Álvarez, Magdalena Hernández-Ortiz, Maciste H. Macías-Cervantes, Joel Ramírez-Emiliano, Sergio Encarnación-Guevara (2014) Differential Proteomic Analysis of the Pancreas of Diabetic *db/db* Mice Reveals the Proteins Involved in the Development of Complications of Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 15(6): 9579–9593. doi: 10.3390/ijms15069579.
- [7] Jiménez-Flores LM, López-Briones S, Macías-Cervantes MH, Ramírez-Emiliano J, Pérez-Vázquez V. (2014). A PPAR γ , NF- κ B and AMPK-dependent mechanism may be involved in the beneficial effects of curcumin in the diabetic *db/db* mice liver. *Molecules*. 19(6):8289-302. doi: 10.3390/molecules19068289.
- [8] Martínez-Morua A, Soto-Urquieta MG, Franco-Robles E, Zuñiga-Trujillo I, Campos-Cervantes A, Pérez-Vázquez V, Ramírez-Emiliano J. (2013). Curcumin decreases oxidative stress in mitochondria isolated from liver and kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *J Asian Nat Prod Res*. 15(8):905-15. doi: 10.1080/10286020.2013.802687.