

Efecto de la curcumina sobre la expresión de ppara y cpt1 en corazón de ratones alimentados con una dieta alta en fructosa.

Cecilia Gabriela Meléndez-Salcido, Miriam Karime Velázquez-Medrano, Jorge Eduardo Chávez-Negrete, Quetzalli Xiadany Macías-Cervantes, Katya Vargas-Ortiz, Maciste H. Macías-Cervantes, Joel Ramírez-Emiliano y Victoriano Pérez-Vázquez*

Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato. León, 37320, Mexico; E-Mails: cecygaby12@gmail.com (C.G.M.-S.); mk.velazquezmedrano@ugto.mx (M.K.V.-B.); je.chaveznegrete@ugto.mx (J.E.C.-N.); qx.maciascervantes@ugto.mx (Q.X.M.-C.); kava-ti75@hotmail.com (K.V.-O.); macistehabacuc@yahoo.com.mx (M.H.M.-C.); joelre@ugto.mx (J.R.-E.).

* Autor de correspondencia; E-Mail: vpvazquez@ugto.mx.

Resumen

El consumo elevado de fructosa es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Evidencias emergentes sugieren que la curcumina, componente activo de la *Curcuma longa*, a la cual se le han atribuido numerosas propiedades antioxidantes e hipolipemiantes, ejerce un efecto protector sobre el sistema cardiovascular. El propósito de esta investigación fue analizar el efecto de la curcumina sobre la expresión de PPAR α y CPT1 en corazón de ratones alimentados con una dieta alta en fructosa durante 15 semanas. Se formaron cuatro grupos de ratones (n=6): control (C), curcumina (C+Cur), fructosa (F) y Fructosa+ curcumina (F+Cur) tratados con 30% de fructosa y 0.75% de curcumina, respectivamente. Los ratones fueron pesados semanalmente y al finalizar el tratamiento, se determinó la concentración sérica de glucosa y colesterol total. La expresión de PPAR α y CPT1 en el corazón se analizó mediante Western Blot. El grupo fructosa presentó un aumento en la ganancia de peso corporal, mientras que la curcumina mitigó ese incremento. Así mismo, la curcumina previno el aumento de CPT1 y aumentó la expresión de PPAR α disminuida en los ratones tratados con

fructosa. En conclusión; la curcumina regula los cambios de expresión de proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos en corazón de ratones alimentados con alto contenido de fructosa.

Abstract

High consumption of fructose is a risk factor for the development of cardiovascular diseases. Emerging evidence suggests that curcumin, an active component of *Curcuma longa*, to which numerous antioxidant and lipid-lowering properties have been attributed, exerts a protective effect on the cardiovascular system. The purpose of this research was to analyze the effect of curcumin on the expression of PPAR α and CPT1 in the heart of mice fed a diet high in fructose for 15 weeks. Four groups of mice (n = 6) were formed: control (C), curcumin (C+Cur), fructose (F) and Fructose + curcumin (F+Cur) with 30% fructose and 0.75% curcumin, respectively. The mice were weighed weekly and at the end of the treatment, the serum glucose and total cholesterol concentration was determined. The expression of PPAR α and CPT1 in the heart was analyzed by Western Blot. The fructose group showed an increase in

body weight gain, while curcumin mitigated that increase. Likewise, curcumin prevented an increase in CPT1 and increased decreased PPAR α expression in mice treated with fructose. In conclusion; Curcumin regulates the changes in protein expression involved in the metabolism of lipids in the heart of mice fed high fructose.

1.Introducción

La obesidad y la diabetes son un problema de salud pública que experimentan una fuerte prevalencia en todo el mundo. A pesar de los avances en el tratamiento médico, las enfermedades cardiovasculares subyacentes son una causa principal de morbi-mortalidad en estos pacientes [1]. Los estudios epidemiológicos muestran una creciente evidencia de que el consumo elevado de bebidas y alimentos procesados endulzados con fructosa se asocian con aumento de peso corporal, hipertensión, resistencia a la insulina y aparición de trastornos metabólicos y cardiovasculares [2,3]. Así mismo, su rápida utilización a través del hígado lleva un aumento en la lipogénesis de novo y la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que finalmente causa dislipidemia [4].

Las causas comunes de insuficiencia cardíaca se asocian con trastornos en la utilización de ácidos grasos en el miocardio. Se ha demostrado que la familia del receptor activador del proliferador de peroxisomas (PPAR) son factores de transcripción del receptor nuclear que regulan el metabolismo de ácidos grasos en corazón, a nivel de la expresión génica [5]. PPAR tiene tres isoformas α , β/δ , γ ; que participan en el catabolismo y el almacenamiento de lípidos, diferenciación de adipocitos, prevención del aumento de peso y la supresión de citocinas proinflamatorias, entre otras funciones. Estos factores de transcripción participan en el metabolismo de los lípidos como promotores de la expresión de enzimas que regulan la β -oxidación en el hígado y en el músculo esquelético, siendo PPAR α la isoforma que se expresa en mayor proporción en corazón [6].

Actualmente se utilizan en la clínica dos tipos de activadores de los PPAR, los fibratos específicos para los PPAR α con efecto hipolipemiante, y las tiazolidinedionas o glitazonas específicos

para PPAR γ con efecto hipoglucemiante utilizadas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) [7]. La activación de PPAR α estimula la expresión de la carnitina palmitoil-transferasa 1 (CPT1), enzima limitante de la velocidad de la oxidación de los ácidos grasos. La CPT1 está anclada en la membrana externa de la mitocondria y cataliza la formación de acil-carnitina de cadena larga, que transporta al ácido graso a la matriz mitocondrial, donde se lleva a cabo la β -oxidación [8]. Dado que el consumo excesivo de fructosa es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular, asociado a una desregulación en la expresión de enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos en corazón, ha surgido un interés en el estudio de compuestos naturales como los polifenoles que ayuden a prevenir o disminuir los efectos inducidos por este monosacárido. Uno de estos polifenoles es la curcumina, a la cual se le han atribuido numerosas propiedades antioxidantes e hipolipemiantes [9].

Los mecanismos de acción de la curcumina incluyen la modulación de las cascadas de transducción de señales y la regulación de la expresión génica, sin embargo, dichos mecanismos no se han dilucidado del todo. No obstante, investigaciones realizadas con ratones diabéticos han reportado que la suplementación con curcumina en la dieta disminuye el contenido de triglicéridos hepáticos y de proteínas proinflamatorias como NF- κ B1, TNF- α e IL6, mejora los índices de oxidación de lípidos, previene la producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno y aumenta la actividad de ATPasa en estos ratones [9,10].

Además, se ha sugerido que la curcumina ejerce efectos similares a los agonistas farmacológicos de PPAR, como lo reportó Jiménez-Flores y cols., en 2014, por lo cual, el presente estudio se diseñó para evaluar el efecto de la curcumina sobre la expresión de PPAR α y CPT1 en corazón de ratones alimentados con fructosa durante 15 semanas.

2.Materiales Y Métodos

2.1 Tratamiento con fructosa y curcumina

Se formaron cuatro grupos de ratones de la cepa C57BL/6 de seis semanas de edad (n=6): Grupo control (C), que recibió dieta estándar,

grupo tratado con curcumina (C+Cur), grupo tratado con fructosa (F) y grupo tratado con fructosa y curcumina (F+Cur). A los grupos de ratones F se les administró fructosa al 30% (p/v) en el agua; a los grupos Cur se les administró curcumina en la dieta al 0.75% (p/p) y fueron tratados durante 15 semanas.

2.2 Determinación del peso corporal y concentración sérica de glucosa y colesterol total.

Los ratones fueron pesados semanalmente en una balanza granataria (Scout Ohaus, N.J. USA). Al finalizar el tratamiento, los ratones se dejaron en ayuno de 8 h (posterior al pesado) para determinar la concentración sérica de glucosa y colesterol total, mediante el un kit comercial (Spinreact, S.A., Girona, España).

2.3 Obtención del corazón de los ratones.

Al finalizar el tratamiento los ratones se anestesiaron con isoflurano en una cámara cerrada y fueron sacrificados por decapitación para obtener el corazón. Inmediatamente se lavó con un 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.

2.4 Extracción fenólica de proteína total.

Se realizó la extracción fenólica de proteínas totales en corazón de acuerdo con la metodología antes descrita [10].

2.5 Cuantificación de proteína total.

La cuantificación de proteína total se realizó con el método de Bradford modificado. La absorbancia se midió a 595 nm en un espectrofotómetro MultiskanGo (Thermo Scientific™, USA) usando agua destilada como blanco.

2.6 Perfil Electroforético de las Proteínas

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes. En cada carril se cargaron 15 µg de proteína. Se separó a 120 Volts/h hasta que el frente de corrida alcanzó 0.5 cm del final del gel, y se tiñó con azul de Coomassie. Posteriormente se digitalizó en el fotodocumentador XRS+ System (Bio-Rad, CA, USA) y se analizó con el software Image Lab (Bio Rad, México) para corroborar que la cantidad de proteína cargada es la misma en cada muestra.

2.7 Western Blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después de la transferencia, las membranas fueron incubadas en buffer de bloqueo por 1:30 h en agitación constante a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con los anticuerpos anti-PPAR α (1:12000) y anti-CPT1 (1:1000) durante una hora a 4 °C. Posteriormente, después de lavar la membrana con TBS-tween se incubaron durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo IgG conjugado con la peroxidasa HRP (1:50000). La quimiodetección se realizó con Western Lightning® Plus-ECL, y con el uso del fotodocumentador ChemiDoc™ Touch (Bio-Rad, CA). La densidad óptica de las bandas se cuantificó con el software ImageLab. Luego se realizó la tinción de las membranas con Amido black para cuantificar la proteína total de tejido cardiaco, como control de carga. Los resultados se reportan como la relación proteína de interés/proteína total y cada experimento se realizó por triplicado.

2.8 Análisis estadístico

Para encontrar diferencias significativas entre las concentraciones séricas de glucosa y colesterol total, en la ganancia de peso corporal y los cambios en la expresión de PPAR α y CPT1 entre los grupos, los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía, seguido del post-hoc de Tukey para ver diferencias entre los grupos, considerando un valor de $p < 0.05$ como significativo. Los valores se reportan como la media \pm DE. Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS 25 (IMB ® SPSS ® Statistics).

3.Resultados Y Discusión

Como se muestra en la Tabla 1, los ratones del grupo F ganaron más peso corporal (11.00 ± 1.58 g), que los grupos C (6.13 ± 1.37 g, $p < 0.001$) y los ratones del grupo C+Cur (6.75 ± 0.64 g, $p = 0.001$). En los ratones del grupo F+Cur (8.12 ± 0.85 g), la ganancia de peso corporal fue menor que en los ratones del grupo F (11.00 ± 1.58 g, $p = 0.021$). La administración de curcumina previno la ganancia de peso corporal inducida por la fructosa. Estos resultados, coinciden con los de un estudio

anterior realizado por Maithilikarpagaselvi N y cols., en 2016, el cual reportó que la alimentación con alto contenido de fructosa aumentó significativamente el peso corporal en ratones Wistar alimentados con 60% de fructosa durante 10 semanas; mientras el tratamiento con curcumina redujo el peso corporal en ratones alimentados con alto contenido de fructosa [11].

La fructosa no tuvo efecto sobre la concentración de glucosa sanguínea (Tabla 1). Diversos estudios han informado que la dieta alta en fructosa induce hiperglucemia (35%, 66%) [12,13], sin embargo, este estudio se diseñó para inducir cambios en el metabolismo de lípidos sin alterar el metabolismo de la glucosa, como lo reportaron Yoo y cols., en 2017; donde la administración de 30% de fructosa por 20 semanas no indujo cambios en la concentración de glucosa [14], por lo tanto, no esperábamos efecto alguno de la curcumina.

Tabla 1. Efecto de la curcumina sobre el peso corporal y la concentración sérica de glucosa y colesterol total.

VARIABLES	GRUPOS			
	C	C + Cur	F	F + Cur
Ganancia de peso (g)	6.1 ± 0.6	6.7 ± 0.3	11 ± 0.8*	8.1 ± 0.4**
Glucosa (mg/dL)	120.2 ± 8.5	134.41 ± 14.8	127.8 ± 7.9	115.9 ± 10.7
Colesterol total (mg/dL)	110.3 ± 3.7	118.3 ± 7.2	156.5 ± 5.0*	136.6 ± 3.2***

Los datos representan la media ± DE (n=6). Los valores con asteriscos indican un cambio significativo; *p<0.05 (F vs C y C+Cur), **p<0.05 (F+Cur vs F), ***p<0.05 (F+Cur vs C).

La concentración de colesterol total fue mayor en los ratones de los grupos F (156.50 ± 10.03 mg/dL) p<0.001, y F+Cur (136.62 ± 6.49 mg/dL) p=0.014, respecto a los ratones del grupo C (110.31 ± 7.36 mg/dL). De igual modo, aumentó la concentración de colesterol total en los ratones de grupo F respecto a los ratones del grupo C+Cur (118.33 ± 14.33 mg/dL) p=0.001. Kelany y cols., (2016) reportaron en ratas macho Sprague-Dawley adultas, que la administración con 65% de fructosa, durante 8 semanas, aumentó la concentración de colesterol total, la cual se redujo significativamente tras la administración de curcumina por sonda (200

mg/kg), durante 8 semanas. Mientras que Rahimi H y cols., reportaron que el nivel de colesterol total no cambió significativamente en pacientes con DM2 tratados con curcumina.

En este estudio, se esperaba que la curcumina previniera un incremento en la concentración de colesterol total en el grupo F+Cur. No obstante, no se observó dicho efecto. Las causas pueden ser el tiempo de tratamiento, dado que aunque no fue significativo, la concentración de colesterol total en el grupo F+Cur fue menor que la del grupo F, posiblemente si el tratamiento se administra durante más tiempo se pudiera observar un efecto positivo. Sin embargo, no se midieron las concentraciones séricas de VLDL, LDL y HDL, por lo cual no se sabe qué lipoproteína se encuentra elevada [15,16].

Respecto a la expresión de las proteínas en la figura 1 se observa que en los ratones del grupo F disminuyó la expresión de PPARα comparado con el grupo C (0.79±0.08 Vs 1±0, p=0.011), mientras que el tratamiento con curcumina en el grupo F+Cur previno la disminución de PPARα inducida por la fructosa en el grupo F (1.20±0.06 Vs 0.79±0.08, p<0.001), así mismo, la expresión fue mayor en los ratones del grupo F+Cur comparado con el grupo C (1.20±0.06 Vs 1±0, p=0.014) y comparado con el grupo C+Cur (1.20±0.06 Vs 0.89±0.05, p=0.001).

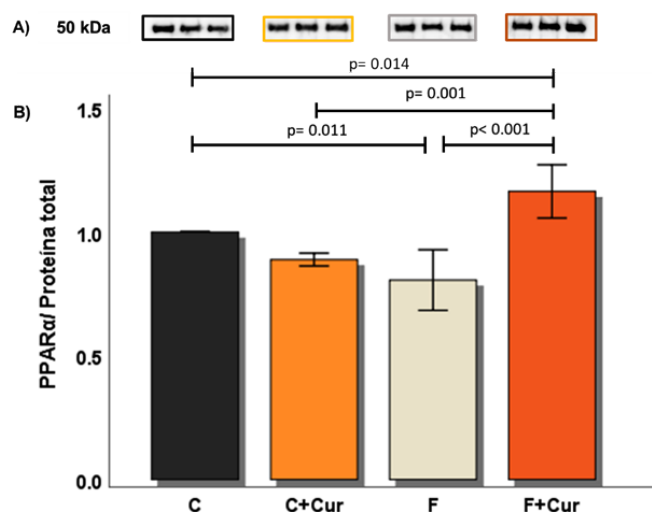


Figura 1. Efecto de la curcumina sobre la expresión de PPARα. A) Western blot representativo de la expresión de PPARα en corazón. B) Análisis densitométrico de la proporción PPARα/Proteína total. Los resultados representan la media de n=3 ± DE. C, grupo control; C+Cur, grupo curcumina; F, grupo fructosa; F+Cur, grupo fructosa + curcumina.

Se han reportado trastornos metabólicos inducidos por fructosa en humanos y ratas; asimismo, se ha demostrado que algunos genes están involucrados en la inducción de estos trastornos, tal y como lo reportaron Ohashi K y cols. (2015) donde la administración de una dieta alta en fructosa suprimió la expresión de PPAR α , resultado de la hipermetilación del gen [17]. Se ha demostrado que la curcumina inhibe la activación de células estrelladas hepáticas al aumentar la actividad de PPAR, como lo reportó Lin y cols., (2012). Este podría ser un efecto benéfico de la curcumina, similar a otros fármacos como las tiazolidinedionas (TZD) que aumentan la expresión de PPAR; con la ventaja de que la curcumina no tiene efectos secundarios como lo reportaron Jiménez-Flores y cols., (2014). Por lo tanto, PPAR α sería un objetivo terapéutico importante de la curcumina para el control de la inflamación crónica en la obesidad y la diabetes; factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares [10,18].

La expresión de CPT1 esta aumentada en los ratones de los grupos C+Cur (2.34 \pm 0.49 Vs 1 \pm 0, p=0.004) y F (1.97 \pm 0.24 Vs 1 \pm 0, p=0.027) comparado con el grupo C. Además, en el grupo F+Cur hubo una menor expresión comparada con el grupo C+Cur (1.43 \pm 0.34 Vs 2.34 \pm 0.49, p=0.036). El tratamiento con curcumina en el grupo F+Cur (1.43 \pm 0.34) previno el aumento de CPT1 en los ratones alimentados con una dieta alta en fructosa como se muestra en la Figura 2.

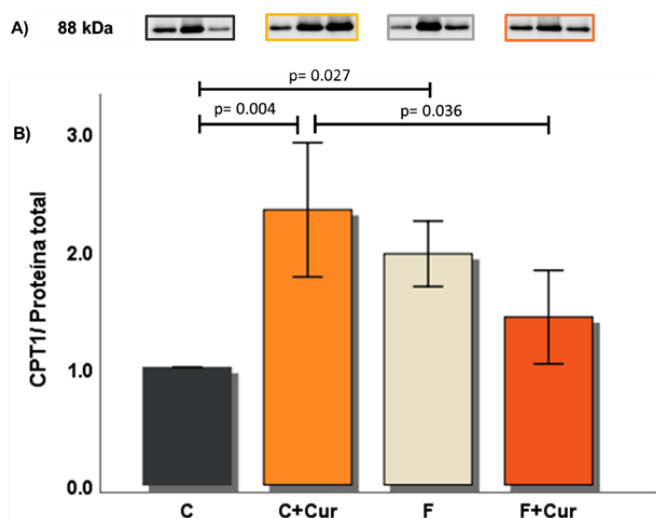


Figura 2. Efecto de la curcumina sobre la expresión de CPT1. A) Western blot representativo de la expresión de CPT1 en corazón. B) Análisis densitométrico de la proporción CPT1/Proteína total.

Los resultados representan la media de n=3 \pm DE. C, grupo control; C+Cur, grupo curcumina; F, grupo fructosa; F+Cur, grupo fructosa + curcumina.

Los resultados en la figura 2, muestran una mayor expresión de CPT1 en el grupo de ratones alimentados con curcumina, lo cual coincide con lo reportado por Lone J y cols., en 2016, donde demostraron que el tratamiento con curcumina incrementó los niveles de CPT1, lo que sugiere un efecto benéfico debido a una mayor oxidación de ácidos grasos [19].

Desde otro enfoque, la sobreexpresión de CPT1 en el grupo F se asocia a un aumento en la captación de ácidos grasos inducido por la fructosa, que a su vez se asocia con hipertrofia cardiaca, lo cual lleva a una sobreexpresión de CPT1 como mecanismo regulatorio, con el objetivo de aumentar su translocación a la mitocondria y evitar que estos ácidos grasos se acumulen en el cardiomiocito [20].

Por otra parte, en el grupo F+Cur, la expresión de CPT1 es menor respecto al grupo C+Cur, por lo que se sugiere que la curcumina pudiera estar evitando un incremento en la síntesis y acumulación de lípidos hepáticos reduciendo así la concentración de ácidos grasos libres en circulación, mediante sus propiedades antioxidantes e hipolipemiantes, y con ello pudiera estar previniendo una sobre captación de ácidos grasos en el cardiomiocito. Por lo cual, al no incrementarse la entrada de ácidos grasos libres al corazón, la expresión de CPT1 no se modifica, tal y como se observó en el grupo F+Cur respecto al grupo C [9].

4. Conclusión

La fructosa aumentó la ganancia de peso corporal y la concentración sérica de colesterol total. Además, disminuyó la expresión de PPAR α y aumentó la expresión de CPT1. Mientras que la curcumina previno la ganancia de peso corporal y el aumento de CPT1 e incrementó la expresión de PPAR α . En conjunto, estos hallazgos sugieren que la curcumina es útil como adyuvante en la prevención de las alteraciones en el metabolismo de lípidos inducidas por la fructosa.

5. Agradecimientos

Agradecemos al Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato, Campus León por permitirnos realizar este

trabajo. Nuestro agradecimiento a Gerardo Silva por el apoyo técnico brindado. Este proyecto fue apoyado a VPV (CIIC 139/2019).

6. Referencias Bibliográficas

1. Fukushima, A., & Lopaschuk, G. D. (2016). Cardiac fatty acid oxidation in heart failure associated with obesity and diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(10), 1525–1534. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.03.020.
2. Tappy, L., & Lê, K.-A. (2010). Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. *Physiological Reviews*, 90(1), 23–46. doi:10.1152/physrev.00019.2009
3. Yoo, S., Ahn, H., & Park, Y. (2016). High Dietary Fructose Intake on Cardiovascular Disease Related Parameters in Growing Rats. *Nutrients*, 9(1), 11. doi: 10.3390/nu9010011.
4. Chen, Q., Wang, T., Li, J., Wang, S., Qiu, F., Yu, H., ... Wang, T. (2017). Effects of Natural Products on Fructose-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Nutrients*, 9(2), 96, doi: 10.3390/nu9020096.
5. Madrazo, J. A., & Kelly, D. P. (2008). The PPAR trio: Regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44(6), 968–975. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.03.021.
6. Ajith, T. A., & Jayakumar, T. G. (2016). Peroxisome proliferator-activated receptors in cardiac energy metabolism and cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(7), 649–658. doi:10.1111/1440-1681.12579.
7. Hong, F., Xu, P., & Zhai, Y. (2018). The Opportunities and Challenges of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Ligands in Clinical Drug Discovery and Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2189, doi: 10.3390/ijms19082189.
8. Fillmore, N., Mori, J., & Lopaschuk, G. D. (2014). Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *British Journal of Pharmacology*, 171(8), 2080–2090. doi:10.1111/bph.12475.
9. Soto-Urquieta, M. G., López-Briones, S., Pérez-Vázquez, V., Saavedra-Molina, A., González-Hernández, G. A., & Ramírez-Emiliano, J. (2014). Curcumin restores mitochondrial functions and decreases lipid peroxidation in liver and kidneys of diabetic db/db mice. *Biological*

Research, 47(1), 74., doi: 10.1186/0717-6287-47-7.

10. Jiménez-Flores, L., López-Briones, S., Macías-Cervantes, M., 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), 8289–8302., doi: 10.3390/molecules19068289.
11. Maithilikarpagaselvi, N., Sridhar, M. G., Swaminathan, R. P., Sripradha, R., & Badhe, B. (2016). Curcumin inhibits hyperlipidemia and hepatic fat accumulation in high-fructose-fed male Wistar rats. *Pharmaceutical Biology*, 54(12), 2857–2863.- doi:10.1080/13880209.2016.1187179.
12. Tappy, L., & Lê, K.-A. (2010). Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. *Physiological Reviews*, 90(1), 23–46. doi:10.1152/physrev.00019.2009
13. Lozano, I., Van der Werf, R., Bietiger, W., Seyfritz, E., Peronet, C., Pinget, M., ... Dal, S. (2016). High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutrition & Metabolism*, 13(1), doi: 10.1186/s12986-016-0074-1.
14. Yoo, S., Ahn, H., & Park, Y. (2016). High Dietary Fructose Intake on Cardiovascular Disease Related Parameters in Growing Rats. *Nutrients*, 9(1), 11. doi:10.3390/nu9010011.
15. Kelany, M. E., Hakami, T. M., & Omar, A. H. (2017). Curcumin improves the metabolic syndrome in high-fructose-diet-fed rats: role of TNF- α , NF- κ B, and oxidative stress. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 95(2), 140–150., doi: 10.1139/cjpp-2016-0152.
16. Rahimi, H. R., Mohammadpour, A. H., Dastani, M., Jaafari, M. R., Abnous, K., Ghayour Mobarhan, M., & Kazemi Oskuee, R. (2016). The effect of nano-curcumin on HbA1c, fasting blood glucose, and lipid profile in diabetic subjects: a randomized clinical trial. *Avicenna journal of phytomedicine*, 6(5), 567–577.
17. Ohashi, K., Munetsuna, E., Yamada, H., Ando, Y., Yamazaki, M., Taromaru, N., Hashimoto, S. (2015). High fructose consumption induces DNA methylation at PPAR α and CPT1A promoter regions in the rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(1-2), 185–189., doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.134.
18. Lin, J., Tang, Y., Kang, Q., Feng, Y., &

Chen, A. (2012). Curcumin inhibits gene expression of receptor for advanced glycation end-products (RAGE) in hepatic stellate cells in vitro by elevating PPAR γ activity and attenuating oxidative stress. *British Journal of Pharmacology*, 166(8), 2212–2227. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01910.

19. Lone, J., Choi, J. H., Kim, S. W., & Yun, J. W. (2016). Curcumin induces brown fat-like phenotype in 3T3-L1 and primary white adipocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 27, 193–202. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.09.006.

20. Xie, X.W., (2017). Liquiritigenin attenuates cardiac injury induced by high fructose-feeding through fibrosis and inflammation suppression. *Biomed Pharmacother*, 86: 694-704.