

EFECTO DE LA CURCUMINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE PPAR α Y MLYCD EN HÍGADO DE RATONES ALIMENTADOS CON UNA DIETA ALTA EN FRUCTOSA

Hernández-Tejada Diana Laura (1), Ortega-Hernández Luz Arcelia (2), León-García María Cristina (2) Vargas-Ortiz Katya (2), Ramírez-Emiliano Joel (2), Pérez-Vázquez Victoriano (2)

¹ [Licenciatura en Nutrición, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [dlht96@gmail.com]

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 curcumina es un compuesto pleiotrópico al cual se le atribuyen diversos beneficios. El propósito de esta investigación fue analizar el efecto de la curcumina sobre la expresión del Receptor de proliferación activado por peroxisoma (PPAR) y Malonil coenzima-A descarboxilasa (MLYCD) en hígado de ratones alimentados con una dieta alta en fructosa al 30% y curcumina al 0.75% por 15 semanas. Se registró el peso de los grupos de ratones. El grupo "fructosa" presentó un aumento significativo en la ganancia del peso corporal, mientras que la curcumina mitigó ese aumento. Además, la curcumina aumentó la expresión de PPAR- α , sin embargo, disminuyó la expresión de MLYCD.

Abstract

Curcumin is a pleotropic compound to which various benefits are attributed. The purpose of this research was analyze the effect of the curcumin on the expression of peroxisome proliferation-activated proliferation receptor (PPAR) and Malonyl Co-A decarboxylase (MLYCD) in the liver of mice fed a high-fructose 30% diet and 0.75% curcumin during 15 weeks. The weight of the groups of mice was recorded. The group "fructose" presented a significant increase in body weight gain, while curcumin mitigated that increase. Curcumin increased the expression of PPAR- α , which was diminished by the effect of fructose. On the contrary, it inhibited the increase of MLYCD in the liver of mice fed a high fructose diet. At the molecular level, the expression of PPAR- α increased, however the expression of MLYCD decreased.

Palabras Clave

Estrés oxidativo; inflamación; obesidad

INTRODUCCIÓN

La fructosa es un monosacárido cetónico presente en muchas plantas [1]. El consumo excesivo de fructosa causa la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). Se ha demostrado que la fructosa induce a EHGNA en animales de experimentación, así como inflamación. La fructosa induce síndrome metabólico, que incluye hipertensión, hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina [2]. El estrés oxidativo se considera un factor crítico en esta patogenia [3]. La rápida utilización de la fructosa por el hígado lleva a una creciente lipogénesis y a una secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que finalmente produce dislipidemia [1]. El receptor de proliferación activado por peroxisoma (PPAR) participa en el metabolismo de lípidos, prevención del aumento de peso, entre otras funciones. El catabolismo lipídico se logra ya que la activación de PPAR aumenta la síntesis de carnitina palmitoil-transferasa (CPT1) y piruvato deshidrogenasa, además, la activación de PPAR es capaz de prevenir la reducción en la expresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos [4]. La malonil-CoA descarboxilasa (MLYCD) cataliza la conversión del malonil-CoA en acetil-CoA y CO₂ [5], proceso que permite al sistema carnitina transportar los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) hacia la mitocondria debido a que CPT1 deja de estar inhibida por malonil-CoA [6].

La curcumina (*Cúrcuma longa*), produce efectos benéficos respecto a la modulación de moléculas de señalización, incluyendo factores de transcripción, citocinas, entre otras [7]. La curcumina tiene efecto protector en el hígado debido a la disminución en el contenido de triglicéridos. Un estudio demostró que la administración de curcumina previno la lesión hepática inducida por dieta alta en fructosa, alteraciones metabólicas hepáticas y los efectos proinflamatorios y prooxidantes en los macrófagos hepáticos de los ratones. Por último, se encontró que la curcumina previene el aumento en el peso corporal y la obesidad debidos a una dieta alta en fructosa [5]. El presente trabajo se realizó para evaluar el efecto de la curcumina sobre el peso corporal en ratones alimentados con una dieta alta en fructosa, determinar su efecto sobre la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre y finalmente analizar su efecto sobre la expresión de las proteínas PPAR α y MLYCD en el hígado de dichos ratones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y Anticuerpos

Sacarosa, cloruro de potasio, cloruro de sodio, ácido etilendiamin-tetracético (EDTA), polivinilpirrolidona (PVP), fenol, TRIS, dodecil sulfato de sodio (SDS), tween-20, glicerol, glicina, 2 β -mercaptoetanol; anticuerpos conejo-monoclonales contra ratón: PPAR α (ab178865), conejo-policonales MLYCD (ab95945) y β -actina (ab8227).

Se realizó un estudio prospectivo, aleatorizado y comparativo en ratones macho de seis semanas de edad, de la cepa C57BL/6, que se alimentaron con alto contenido de fructosa y curcumina durante 15 semanas.

Tratamiento con fructosa y curcumina

Se formaron cuatro grupos de seis ratones: control (CT), dieta con curcumina (C), dieta con fructosa (F) y dieta con fructosa y curcumina (F+C). A los grupos de ratones F se les administró fructosa al 30% (p/v) en el agua; a los grupos C, curcumina en la dieta al 0.75% (p/p).

Determinación del peso corporal y glucosa sanguínea y perfil lipídico en los ratones

Los ratones fueron pesados semanalmente durante el periodo de tratamiento. Al término del mismo los ratones se sacrificaron y se midieron las concentraciones de glucosa, triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL y VLDL en suero con espectrofotómetro automático SPINREACT® a una longitud de onda 450-550 nm.

Obtención del hígado de los ratones

Al finalizar el tratamiento los ratones se anestesiaron y fueron sacrificados por decapitación para obtener el hígado. 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.

Extracción fenólica de proteína total

Se realizó la extracción fenólica de proteínas totales en hígado de acuerdo con la metodología antes descrita [8].

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 usando agua destilada como blanco.

Perfil Electroforético de las Proteínas

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. En cada carril se cargaron 15 μ g de proteína. Carril 1, marcador de peso molecular. Carriles 2-4: grupo CT. Carriles 5-7: grupo C. Carriles 8-10: grupo F. Carriles 11-13: grupo F+C.

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 h en agitación constante a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con los anticuerpos anti-PPAR α (1:20 000), anti-MLYCD (1:2 000) y anti- β -actina (1:1 500) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se incubaron durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente con el anticuerpo cabra anti-conejo IgG conjugado con la peroxidasa HRP (1:30 000). 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. Los resultados se reportaron como la relación proteína/ β -actina y cada experimento se realizó por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al terminar el tratamiento, los ratones se pesaron semanalmente para analizar la ganancia de peso tomando en cuenta el peso inicial y final de estos (IMAGEN 1). Pasado este tiempo fueron anestesiados, sacrificados por decapitación y se obtuvieron el corazón y las muestras sanguíneas para determinar la concentración de glucosa y perfil lipídico (Tabla 1).

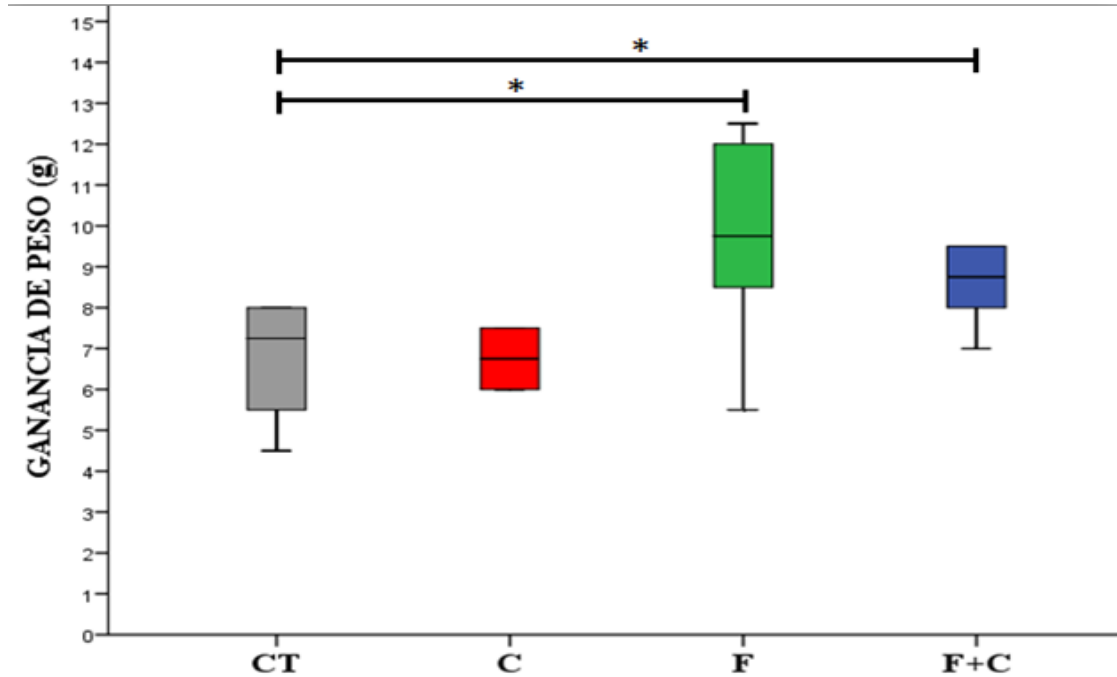


IMAGEN 1: Efecto de la curcumina sobre la ganancia de peso corporal de los ratones. Los datos representan la mediana y rango (n=6). *p<0.05 (CT vs F y F+C). Los ratones de los grupos F [9.75 (5.5-12.5) g] y F+C [8.75 (7.0-16.0) g] incrementaron el peso corporal con respecto a los ratones control (CT) [7.0 (4.5-8.0) g]. La curcumina (C) [6.75 (6.0-7.5) g] no mostró efecto sobre la ganancia de peso.

Tabla 1: Parámetros bioquímicos en suero de los ratones después de 15 semanas de alimentación con alto contenido de fructosa. Los datos representan la mediana y rango (n=6). Los valores en la misma fila con los superíndices de asteriscos indican un cambio significativo cuando se compara con el grupo CT; *p<0.05.

VARIABLES BIOQUÍMICAS	GRUPOS			
	CT	C	F	F+C
1. Glucosa	117.5 (97.6-132.1)	129.2 (95.0-166.7)	112.5 (90.0-116.7)	95.0 (71.4-100.0) *
2. Triglicéridos	77.0 (60.7-98.6)	97.9 (66.7-112.5)	95.8 (75.0-106.2)	77.5 (62.5-85.0)
3. Colesterol	116.8 (114.3-125.1)	100.0 (87.5-120.0)	142.8 (129.2-166.7) *	135.7 (125.0-150.0) *
4. HDL	22.4 (18.0-25.0)	15.0 (12.5-25.0)	9.2 (6.2-12.5) *	10.0 (7.1-12.5) *
5. LDL	79.0 (76.0-91.6)	74.2 (65.8-95.0)	110.0 (85.0-139.2) *	103.6 (97.5-125.0) *
6. VLDL	15.3 (12.1-17.0)	20.0 (13.3-25.0)	18.5 (13.3-21.2)	16.0 (15.0-21.7)

La fructosa no elevó la concentración de glucosa en suero, esto debido a que es un carbohidrato simple de bajo índice glucémico, sin embargo estudios previos han reportado que el consumo prolongado de la fructosa aumenta el peso corporal y la acumulación de grasa, contribuyendo en las alteraciones del perfil de lípidos, dando inicio a dislipidemias y enfermedades cardiovasculares [9]. Por otra parte, la curcumina mostró una tendencia hacia una menor ganancia de peso corporal en los ratones tratados con fructosa [10]. Esto coincide con estudios que reportan que los triglicéridos disminuyen cuando se administra curcumina en ratones, aunque no de manera significativa [11]. Los efectos de la fructosa se producen a través de su rápida metabolización en el hígado por el desvío de la etapa reguladora de fosfofructocinasa en la glucólisis, secretando en mayor

proporción el colesterol VLDL [12]. En efecto, la actividad antioxidante de la curcumina hace que los niveles de VLDL disminuyan y desaparezcan las complicaciones de las dislipidemias [13].

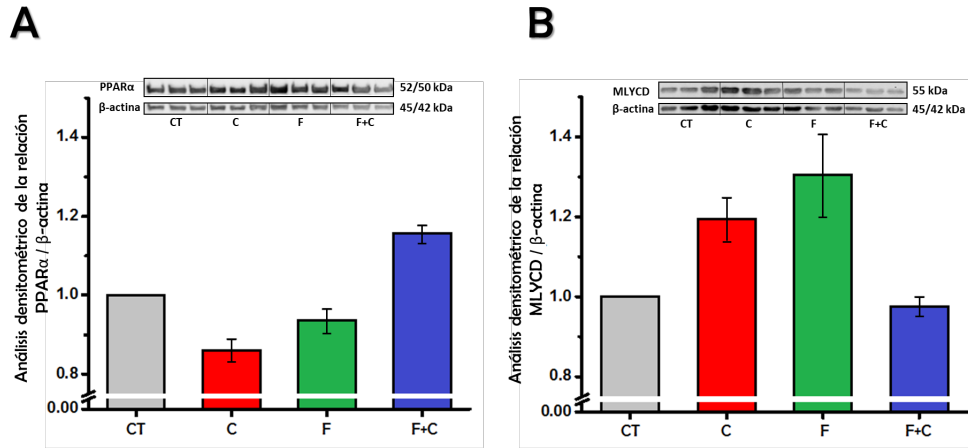


IMAGEN 2: Análisis de Western blot del efecto de la curcumina sobre la expresión de PPAR α y MLYCD en el hígado de ratones macho alimentados con una dieta alta en fructosa. (A) PPAR α normalizada con β -actina, (B) MLYCD normalizada con β -actina. Los datos se expresan en Media \pm EE (n=3). CT: grupo Control; C: grupo Curcumina; F: grupo Fructosa; F+C: grupo Fructosa y Curcumina.

Se observó un aumento en la expresión de MLYCD en el grupo de ratones alimentados con fructosa. Esto coincide con resultados reportados por Oka y cols en 2012, donde el aumento de la expresión y la actividad de MLYCD ocurre en condiciones asociadas con el aumento de las tasas de oxidación de ácidos grasos, debido al incremento en su síntesis dada por una dieta alta en fructosa [14]. PPAR- α disminuyó en los ratones alimentados con fructosa respecto al grupo control, lo que se refleja en estudio previo en el cual se administró fructosa al 20% en ratas machos, donde se observó una disminución en su expresión [15].

CONCLUSIONES

La curcumina mostró un efecto positivo respecto a la ganancia del peso corporal y niveles de glucosa en sangre, además de prevenir el aumento de colesterol, respecto al consumo de fructosa, disminuyendo también niveles de LDL. Respecto a la expresión de proteínas, aumentó la expresión de PPAR- α lo cual es un efecto positivo, sin embargo, disminuyó la expresión de MLYCD lo que favorece la acumulación de ácidos grasos.

REFERENCIAS

- [1] Zhao XJ, Yu HW, Yang YZ, Wu WY, Chen TY, Jia KK, et al. (2018). Polydatin prevents fructose-induced liver inflammation and lipid deposition through increasing miR-200a to regulate Keap1/Nrf2 pathway. *Redox Biol.*, 124–37. doi:10.1016/j.redox.2018.07.002.
- [2] Meriño M, Briones L, Palma V, Herlitz K, Escudero C. (2017). Role of adenosine receptors in the adipocyte-macrophage interaction during obesity. *Endocrinol Diabetes y Nutr.*, 64:317–27. doi:10.1016/j.endinu.2017.03.010.
- [3] Gutiérrez-Salmeán G, Ceballos-Reyes G, Ramírez-Sánchez I. (2012). Obesity and metabolic syndrome: Future therapeutics based on novel molecular pathways. *Clin e Investig En Arterioscler.*, 24:204–11. doi:10.1016/j.arteri.2011.11.002.
- [4] Frimmel S, Zandi S, Sun D, Zhang Z. (2017). The Role of Mitochondria in AMD: Current Knowledge and Future Applications. *J Ophthalmic Vis Res.*, 12:419–23. doi:10.4103/jovr.jovr.
- [5] Rodríguez S, Ellis JM, Wolfgang MJ. (2014). Chemical-genetic induction of Malonyl-CoA decarboxylase in skeletal muscle. *BMC Biochem.*, 15:1–14. doi:10.1186/1471-2091-15-20.
- [6] Ajith TA, Jayakumar TG. (2016). Peroxisome proliferator-activated receptors in cardiac energy metabolism and cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 43:649–58. doi:10.1111/1440-1681.12579.
- [7] Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, Nadeau KJ, Green M, Roncal C, et al. (2018). Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.*, 68:1063–75. doi:10.1016/j.jhep.2018.01.019.
- [8] Gabriela C, Gerardo O. (2016). Efecto de la curcumina sobre el perfil de expresión de proteínas en hígado de ratones diabéticos DB/DB. *Rev Divulg Científica*, 2:1490–5.

- [9] Schultz A, Neil D, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. (2013). Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. *Int J Mol Sci.*, 14:21873–86. doi:10.3390/ijms141121873.
- [10] Weisberg SP, Leibel RL. (2008). An apparent role for Alox15 in the pathogenesis of diabetes in the NOD mouse: Parsing the supporting genetic data. *Diabetes.*, 57:1–2. doi:10.2337/db07-1592.
- [11] Tsai I-J, Chen C-W, Tsai S-Y, Wang P-Y, Owaga E, Hsieh R-H. (2018). Curcumin Supplementation Ameliorated Vascular Dysfunction and Antioxidant Status in High Sucrose, High Fat Fed Rats. *Appl Physiol Nutr Metab.* doi:10.1139/apnm-2017-0670.
- [12] Basciano H, Federico L, Adeli K. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab.*, 2:1–14. doi:10.1186/1743-7075-2-5.
- [13] Manjunatha H, Srinivasan K. (2007). Hypolipidemic and antioxidant effects of dietary curcumin and capsaicin in induced hypercholesterolemic rats. *Lipids*, 42:1133–42. doi:10.1007/s11745-007-3120-y.
- [14] Oka T, Lam VH, Zhang L, Keung W, Cadete VJJ, Samokhvalov V, et al. (2012). Cardiac hypertrophy in the newborn delays the maturation of fatty acid β -oxidation and compromises postischemic functional recovery. *Am J Physiol Circ Physiol.*, 302:H1784–94. doi:10.1152/ajpheart.00804.2011.
- [15] Ohashi K, Munetsuna E, Yamada H, Ando Y, Yamazaki M, Taromaru N, et al. (2015). High fructose consumption induces DNA methylation at PPAR α and CPT1A promoter regions in the rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.*, 468:185–9. doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.134.