

## **Efecto de las dietas hipercalóricas y la curcumina sobre el contenido mitocondrial en hígado de ratones C57BL/6**

Rodríguez-Alba JA<sup>1</sup>, Zamarripa-Sánchez KD<sup>1</sup>, Pérez-Ramírez Y<sup>1</sup>, Pérez-Pimentel I<sup>1</sup>, Carbajal-Ramírez SM<sup>2</sup>, Pérez-Vázquez V<sup>2</sup> y Ramírez-Emiliano J<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Medicina y Nutrición, División Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato.

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Médicas, División Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato.

joelre@ugto.mx

### **Resumen**

En el presente estudio se exploró el efecto de la curcumina sobre el contenido mitocondrial en hígado de ratones alimentados con dietas hipercalóricas, evaluando los niveles de expresión de la subunidad 4 de la citocromo c oxidasa (COX4) por western blot. Se realizó un estudio comparativo con ratones machos C57BL/6 de seis semanas de edad, utilizando siete ratones alimentados con diferentes dietas hipercalóricas y curcumina durante 16 semanas. Al final del tratamiento hígados de los ratones fueron procesados para determinar mediante la técnica de western, la expresión de COX4 y el control de expresión constitutiva Actina. Los resultados mostraron que las dietas hipercalóricas con elevado conte en fructosa (DE+F) y/o grasa (DAG) aumentaron la expresión de COX4 en el hígado de los ratones, y la DAG tuvo un mayor impacto en la expresión de COX4 en comparación con la DE+F. La suplementación a ambas dietas con curcumina, amplificó significativamente éste efecto, especialmente en los ratones que recibieron una combinación de dieta alta en grasa y fructosa (DAG+C+F). Las dietas hipercalóricas inducen un aumento en la expresión de COX4 en el hígado, y este efecto es acentuado por la curcumina, y potenciado en la dieta combinada. Éstos hallazgos sugieren que la curcumina podría desempeñar un papel importante en la mitigación del daño mitocondrial causado por dietas hipercalóricas, ofreciendo un potencial beneficio para el tratamiento de enfermedades metabólicas en humanos. Además, la presente investigación resalta la importancia de los antioxidantes en la dieta para prevenir y reducir el estrés oxidativo y la inflamación asociados con el consumo excesivo de carbohidratos y grasas.

**Palabras clave:** Dieta hipercalórica; mitocondria; curcumina.

### **Antecedentes**

La dieta hipercalórica con alto contenido en carbohidratos y/o grasa es dañina para la salud (1). El principal carbohidrato es la fructosa, el cual es el monosacárido de mayor consumo por la población ya que se utiliza como edulcorante, mientras que la grasa saturada se encuentra en una gran diversidad de alimentos, y en alimentos procesados es añadida para aumentar la palatabilidad. Se ha sugerido que el elevado consumo de carbohidratos y grasas juntos es aún más dañino que el consumo en exceso por separado (2), y el daño es debido a que la dieta hipercalórica incrementa el contenido del tejido adiposo en el organismo, convirtiéndose en un factor de riesgo para desarrollar enfermedades crónicas metabólicas (1).

Las mitocondrias son cruciales para metabolizar la grasa y los derivados de los carbohidratos con la finalidad de producir energía en forma de adenosina trifosfato (ATP) para las necesidades celulares, que incluye la adecuada síntesis y almacenamiento de ácidos grasos en el tejido adiposo. Por ello, las mitocondrias son fundamentales durante el metabolismo de las dietas hipercalóricas, sin embargo, el elevado consumo de estas dietas por tiempo prolongado puede inducir daño y disfunción mitocondrial, contribuyendo al desarrollo de patologías como hígado graso no alcohólico, diabetes, enfermedad cardiovascular, entre otras (2, 3). En el desarrollo de éstas patologías se involucra la inflamación y el estrés oxidativo, por lo cual se recomienda el consumo de antioxidantes para disminuir y/o prevenir estos dos procesos indeseables.

La curcumina es extraída de la planta cúrcuma longa, y se le atribuyen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, también se ha observado que mejora el consumo de oxígeno en mitocondrias de ratones diabéticos (4-6). Por ello, la presente investigación determinó si la curcumina influye sobre el contenido mitocondrial, determinado por los niveles de expresión de la subunidad 4 de la citocromo c oxidasa (COX4), en el hígado de ratones alimentados con dietas hipercalóricas.

## Metodología

### *Modelo experimental, tratamiento y consideraciones éticas*

Se realizó un estudio comparativo utilizando muestras de hígado ratón, almacenadas en congelación que fueron obtenidas en un estudio previo. En el estudio previo, los ratones machos C57BL/6 de seis semanas de edad fueron alimentados con dietas hipercalóricas durante 16 semanas. Las dietas hipercalóricas consistieron en suplementar el alimento con grasa saturada y/o curcumina, y/o fructosa en el agua de bebida, como se indica en la Tabla 1; además la Tabla 2 indica el aporte calórico de las dietas.

Se formaron 7 grupos de tratamiento como se muestra en la Tabla 1, y todos los ratones tuvieron acceso al alimento y agua a libre demanda. Los ratones se alojaron en jaulas y se mantuvieron en condiciones de laboratorio estándar (temperatura 25°C ± 2°C, ciclo de 12h luz/12h oscuridad) durante 16 semanas, de acuerdo con la legislación mexicana actual (NOM-062-ZOO-1999) y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (Bethesda, MD, EE. UU.). El proyecto previo fue titulado "Análisis comparativo del efecto de la curcumina y las dietas con alto contenido en fructosa y en grasa sobre la expresión del receptor a cannabinoides cerebral y desempeño cognitivo del ratón", con el número de registro "CIBIUG-P43-2020".

**Tabla 1.** Tratamiento con dieta alta en grasa y fructosa, y/o curcumina a ratones de 6 semanas de edad.

Grupos (6 ratones cada grupo)	Tipo de tratamiento durante 16 semanas
1. DE	Dieta estándar (DE) y agua potable
2. DE+F	DE y 30% p/v de fructosa disuelta en agua
3. DE+C+F	DE suplementada con 0.75% (p/p) de curcumina y 30% p/v de fructosa disuelta en agua

4. DAG	Dieta alta en grasa 40% (p/p) y agua potable
5. DAG+C	Dieta alta en grasa suplementada con 0.75% (p/p) de curcumina y agua potable
6. DAG+F	DAG + 30% (p/v) de fructosa en agua
7. DAG+C+F	DAG suplementada con 0.75% (p/p) de curcumina + 30% (p/v) de fructosa en agua

**Tabla 2.** Composición y contenido energético de las dietas

Macromolécula	Dieta estándar por cada 100g			Dieta alta en grasa por cada 100g		
	Gramos	Energía (Kcal)	Aporte (%)	Gramos	Energía (Kcal)	Aporte (%)
Proteína	30.8	123.3	28.5	18.7	74.6	13.4
Grasa	6.5	58.4	13.5	36.9	332.0	59.5
Hidratos de carbono	62.7	250.8	58.0	37.9	151.6	27.2
Total		432.4	100.0		558.3	100.0

Solución de fructosa al 30% por cada mL	
Energía (Kcal)	1.2 Kcal

### **Extracción de proteínas y western blot**

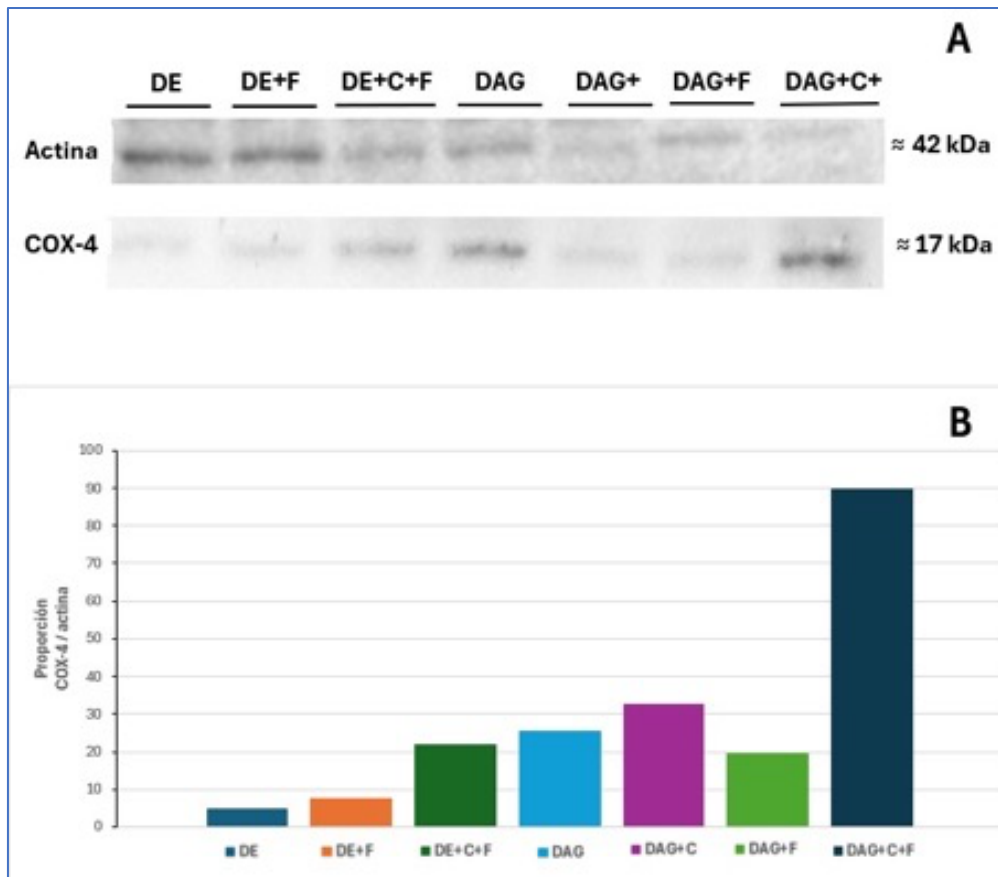
Los hígados fueron homogenizados en frío y se realizó la extracción de proteínas por el método fenol-cloroformo. En seguida se determinó la concentración total de las proteínas por el método del ácido bicinónico. Posteriormente se eligió un ratón de cada grupo para que las proteínas fueran separadas en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando 15 microg de cada muestra como se describió previamente (7). Una vez separadas las proteínas, éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa utilizando la técnica semihúmeda. Con las membranas conteniendo las proteínas, se realizó inmunodetección utilizando el anticuerpo conejo anti-COX4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una dilución de 1:2000, y actina mediante el anticuerpo conejo anti-actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una dilución de 1:3500. Como anticuerpo secundario se utilizó cabra anti-conejo biotinilado (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una dilución de 1:5000. En seguida se procedió a revelar utilizando quimioluminiscencia (Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer). Finalmente se determinó la densidad de cada una de las bandas utilizando el programa Image Lab 3.0 software (ChemiDoc™ XRS, Bio-Rad), y se calculó la proporción COX4/actina.

### **Resultados y discusión**

Para lograr cumplir en tiempo y forma con el objetivo planteado, se utilizaron muestras de hígados congeladas que fueron obtenidas de un estudio previo. En ese estudio, a los ratones de 6 semanas

de edad se les dio tratamiento con dietas hipercalóricas y/o curcumina por 16 semanas (Tablas 1 y 2), es decir, los ratones fueron sometidos a un tratamiento crónico.

En el presente estudio se determinaron los niveles de expresión tanto de COX4 como del control de expresión constitutiva Actina (Blot en la Figura 1A); de éste blot se determinó la densidad de cada banda de proteína y se calculó la proporción COX4/Actina (Figura 1B). Se observa en la gráfica (Figura 1B) que el ratón que recibió la dieta alta en fructosa (DE+F) tuvo un ligero incremento en la expresión de COX4 (proporción 7.88) comparado con el ratón control que recibió dieta estándar (DE; proporción 4.91), mientras que el ratón que recibió dieta de fructosa y curcumina (DE+F+C) tuvo un incremento de 4.5 veces la expresión de COX4 (proporción 22.07) comparada con el control DE. Por otra parte, la dieta alta en grasa (DAG) por sí sola incrementó más de 5 veces la expresión de COX4 (proporción 25.64) comparada con el control DE, y la suplementación con curcumina (DAG+C; proporción 32.63) acentuó débilmente éste incremento que indujo por sí sola la DAG. La dieta combinada fructosa y grasa (DAG+F) incrementó aproximadamente 4 veces la expresión de COX4 (proporción 19.53) comparado con el control DE; éste incremento fue un poco más del doble comparado con el ratón que recibió DE+F (7.88), sin embargo, de forma interesante fue dos tercios de la expresión observada en el ratón que recibió DAG+C (32.63). Inesperadamente, la expresión de COX4 se elevó sobremanera en el ratón que recibió DAG+C+F (89.59) con respecto al resto de los grupos.



*Figura 1. A) Inmunodetección de actina ( $\approx 42$  kDa) y COX-4 ( $\approx 17$  kDa) en hígado de ratón que recibió diferentes condiciones dietéticas: DE (dieta estándar), F (fructosa), C (curcumina), DAG (dieta alta en grasas), siendo actina utilizada como grupo de control. B) Proporción de la expresión de COX4/actina en las diferentes condiciones dietética.*

Los resultados muestran que hay un incremento de la expresión de COX4 en los grupos que recibieron las dietas hipercalóricas con alto contenido en fructosa y/o grasa, siendo mayor el efecto en el caso de la dieta con grasa. Este resultado es congruente si consideramos que la grasa se cataboliza en la mitocondria, a diferencia de la fructosa en la cual su metabolismo inicia en el citosol en la fructólisis, y parte de los intermediarios que se producen pueden dirigirse a otras vías metabólicas como el ciclo de las pentosas, entre otros, evitando ingresar a la mitocondria.

Por su parte la curcumina, acentuó el incremento de expresión de COX4 inducido por las dietas hipercalóricas, y de manera sorpresiva, este aumento se acrecentó en el ratón tratado con DAG+C+F. Al respecto de este hallazgo, es importante considerar que en modelos animales el consumo crónico de dietas hipercalóricas tiene como consecuencia daño a la función de las mitocondrias y una posible disminución en la cantidad de las mismas. Por lo tanto, el posible daño a COX4 en las mitocondrias del hepatocito deberá ser compensado con un aumento en la expresión de COX4 para tratar de reestablecer la función mitocondrial a un nivel fisiológico, y la curcumina podría inducir una mayor expresión de COX4 para lograr alcanzar dicho propósito.

Es importante considerar que la célula posee un mecanismo llamado dinámica mitocondrial, ésta es la capacidad de las mitocondrias para fusionarse (fusión) o dividirse (fisión) y se lleva a cabo uno u otro proceso dependiendo de la necesidad metabólica de la célula, teniendo como propósito el control de la calidad funcional de las mitocondrias, lo que hace posible el mantenimiento de la demanda energética celular (9). Por lo tanto, dadas las condiciones de tratamiento de los ratones en éste estudio, es razonable considerar el daño a COX4 inducido por las dietas hipercalóricas y paralelamente que el hepatocito indujo una mayor expresión para compensar el daño, sin embargo, probablemente a las 16 semanas de tratamiento la compensación inducida por el hepatocito no fue suficiente para reestablecer la función a nivel fisiológico. Afortunadamente, el tratamiento con curcumina logró una mayor expresión de COX4, posiblemente alcanzando los niveles funcionales requeridos por el hepatocito; esto es congruente con nuestros resultados previos donde la curcumina logró disminuir del daño oxidativo mejorando el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígado de ratones alimentados con DAG y en ratones diabéticos (4, 5).

Las fortalezas del estudio son: haber determinado por separado el efecto de las dietas hipercalóricas, en combinación y/o tratados con curcumina, mostrando que la curcumina es eficiente en ambos tipos de dietas. Sin embargo, la limitación del estudio es que no se determinó la funcionalidad de COX4 y debido al corto tiempo del estudio, no se determinó en los 6 ratones que integran cada grupo de tratamiento.

En conclusión, las dietas hipercalóricas inducen una mayor expresión de COX4 que es acentuada por la curcumina, siendo más relevante el efecto de éste polifenol en el ratón que recibió la dieta combinada. Lo anterior muestra el potencial efecto benéfico para el tratamiento del daño mitocondrial en humanos.

## Bibliografía

1. García Sánchez et al. El Síndrome Metabólico y sus efectos en la función y dinámica de las mitocondrias del corazón. *Rev Educ Bioquímica*. 2021;40(4):189-203.
2. Chiang Morales et al. High-Fructose/High-Fat Diet Downregulates the Hepatic Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Pathway in Mice Compared with High-Fat Diet Alone. *Cells*. 2022.11(21):3425.
3. Cardenas-Perez et al. Maternal overnutrition by hypercaloric diets programs hypothalamic mitochondrial fusion and metabolic dysfunction in rat male offspring. *Nutr Metab (Lond)* 15, 38 (2018).
4. Martínez-Morúa et al. Curcumin decreases oxidative stress in mitochondria isolated from liver and kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *J Asian Nat Prod Res*. 2013;15(June):905–15.
5. Soto-Urquieta et al. Curcumin restores mitochondrial functions and decreases lipid peroxidation in liver and kidneys of diabetic db/db mice. *Biological Research* 2014 47:74.
6. Zhao D et al. Curcumin improves adipocytes browning and mitochondrial function in 3T3-L1 cells and obese rodent model. *R Soc Open Sci*. 2021;8(3):200974.
7. Ramírez-Emiliano et al. Mitochondrial content and oxidative damage in full-term placentas from SGA, LGA and AGA infants pregnant women. *Archives of Medical Science*, 2021.