

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

Juliana Oriel de Oliveira

**Metabolismo de proteínas na musculatura esquelética de animais diabéticos
tratados com iogurte enriquecido com curcumina**

Araraquara

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E ENZIMOLOGIA CLÍNICAS

**Metabolismo de proteínas na musculatura esquelética de animais diabéticos
tratados com iogurte enriquecido com curcumina**

Juliana Oriel de Oliveira

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Co-orientador: Ms. Carlos Alberto Arcaro Filho

Araraquara

2015

Agradecimentos

A Deus, por me dar força e luz, por cuidar de mim a cada caminho que eu trilhar.

A toda a minha família, em especial aos meus pais Aparecido e Dirce e minha irmã Larissa, por todo o amor, incentivo e suporte.

À Profa. Dra. Amanda Martins Baviera, por ter me orientado e dado a oportunidade de desenvolver a iniciação científica, por sempre ter me incentivado a seguir na pesquisa e por todo o carinho.

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, pelo apoio e contribuição ao trabalho, pelos momentos divertidos no laboratório.

Ao Carlos, Renata e Vânia, pela paciência, por terem me ensinado praticamente tudo o que eu sei de pesquisa, por serem exemplos de profissionais que eu vou levar para a vida e pela ótima companhia em todos esses anos.

A todos do laboratório, Thais, Bianca, Monalisa, Daniela, Mariana e Victória, pelo apoio e pelos ótimos momentos que passamos juntas.

Aos amigos Tatiane, Jéssica, Marco Aurélio, Mayra, Isadora, Sara, Juliana, Laryssa e Natália, por terem sido minha família em Araraquara.

Aos presentes que a JFU nos deu, Priscila, Carol, Vanessa, Karen, Nathália e Fabiane.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Sumário

1. Introdução	7
1.1 Diabetes mellitus	7
1.1.1 Classificação do diabetes mellitus	8
1.1.2 Sintomas do DM.....	9
1.1.3 Mecanismos efetores de proteólise intracelular.....	10
1.1.3.1 Outras causas de perda de massa muscular	15
1.2 Tratamento do diabetes mellitus	16
1.3 Curcumina	17
1.4 Músculos esqueléticos e características	18
2. Objetivo	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. Material e métodos	20
3.1 Equipamentos	20
3.2 Sais e reagentes	20
3.3 Animais	21
3.4 Indução do diabetes mellitus experimental.....	22
3.5 Tratamento crônico de animais diabéticos com curcumina incorporada em iogurte.....	22
3.6 Princípios das determinações bioquímicas.....	24
3.6.1 Determinação da glicemia.....	24
3.6.2 Determinação de ureia urinária	24
3.6.3 Determinação de proteínas totais	25
3.7 Atividades proteolíticas na musculatura esquelética	25
3.7.1 Atividade quimiotripsina- <i>like</i> do proteassoma	25
3.7.2 Atividade de calpaína	26
3.7.3 Atividade de caspase-3	27
3.8 Níveis de conjugados ubiquitinados (Western blotting)	28
3.9 Análise estatística	29
4. Resultados	30
4.1 Glicemia	30
4.2 Ureia urinária	31

4.3	Peso corporal	33
4.4	Peso dos músculos <i>soleus</i> e EDL	34
4.5	Atividade quimiotripsina- <i>like</i> do proteassoma.....	36
4.6	Atividade de calpaína.....	38
4.7	Atividade de caspase-3.....	40
4.8	Níveis de conjugados ubiquitinados	42
5.	Discussão.....	44
6.	Conclusão	49
7.	Referências	50
	Anexo I – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da FCFAr	60
	Dados finais	61

Resumo

A perda de massa muscular observada no diabetes mellitus (DM) tipo 1 é consequência da combinação entre redução na velocidade de síntese proteica e aumento na velocidade de proteólise. A curcumina, pigmento amarelo extraído dos rizomas de *Curcuma longa* L., promove diversos benefícios no metabolismo de carboidratos e lipídeos no DM. Deste modo, buscamos avaliar o efeito do tratamento de ratos diabéticos com curcumina incorporada em iogurte sobre o metabolismo proteico muscular.

Ratos Wistar machos (150 ± 10 g) receberam estreptozotocina (40 mg/kg, i.v.) para indução do DM e foram divididos nos grupos (n=8): diabético tratado com iogurte (DIOG), 90 mg/kg de curcumina (DC90), 4U de insulina (DINS) e ratos normais, não diabéticos, tratados com iogurte (NIOG). Após 35 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e os músculos esqueléticos *soleus* e *extensor digitorum longus* (EDL) foram retirados e utilizados para a determinação das atividades proteolíticas de caspase-3, calpaína e proteassoma (atividade quimiotripsina-like).

O tratamento de animais diabéticos com curcumina incorporada em iogurte reduziu a glicemia, os níveis de ureia urinária e promoveu um maior ganho de peso corporal em relação aos animais diabéticos tratados somente com iogurte (DIOG). Animais DIOG apresentaram um aumento nas atividades de calpaína e proteassoma em músculos *soleus* e EDL em relação aos valores encontrados em músculos de animais NIOG; já o tratamento com curcumina reduziu as atividades de calpaína e proteassoma em EDL de ratos diabéticos, o que explica, pelo menos em parte, a menor perda de massa deste músculo em ratos DC90. Houve uma redução na atividade de caspase-3 em músculos de animais DIOG em comparação aos grupos

NIOG, DINS e DC90. O tratamento de ratos diabéticos com curcumina incorporada em iogurte promove diversos benefícios relacionados ao combate dos distúrbios observados no metabolismo de carboidratos e lipídeos, e evidências deste estudo mostram que a curcumina reduz a atrofia muscular observada neste modelo de deficiência insulínica. Por fim, a redução na degradação de proteínas musculares promovida pela curcumina pode contribuir para a redução na glicemia, uma vez que menos substratos (aminoácidos) são oferecidos para a gliconeogênese hepática.

1. Introdução

1.1 Diabetes mellitus

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas resultante de prejuízos na produção e secreção de insulina pelas células beta do pâncreas e/ou resistência às ações da insulina em tecidos periféricos; uma das principais consequências do DM é a hiperglicemia, em decorrência da menor captação de glicose pelos tecidos periféricos e do aumento na produção hepática de glicose. A manutenção da hiperglicemia por longos períodos tem relação direta com o desenvolvimento das diversas complicações microvasculares (retinopatias, neuropatias, nefropatias) e macrovasculares (doenças cardiovasculares e cerebrovasculares oclusivas) observadas no DM (MADONNA; DE CATERINA, 2011).

O DM é uma doença crônica distribuída mundialmente. Em 2013, o número de indivíduos com DM atingiu a impressionante marca de 382 milhões de pessoas; a *International Diabetes Federation* (IDF) estima que em 2035 o número de indivíduos acometidos pelo DM será de 592 milhões em todo o mundo (GUARIGUATA et al, 2014).

Nos países em desenvolvimento, o número de pessoas acometidas pelo DM cresce em larga escala e representa 80% dos casos no mundo. Este aumento é reflexo do crescimento acelerado destes países nos últimos anos, com urbanização descontrolada e drásticas mudanças nos hábitos alimentares (GUARIGUATA et al, 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

Em 2013, o Brasil apresentava cerca de 11,9 milhões de indivíduos com DM, na faixa etária de 20 a 79 anos, número que nos posiciona como o quarto país com

mais diabéticos no mundo (GUARIGUATA et al, 2014). Já segundo dados do CENSO realizado pelo IBGE em 2010, o número total de diabéticos na população brasileira era de 12.054.827 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2012).

1.1.1 Classificação do diabetes mellitus

O DM é classificado principalmente em DM tipo 1, tipo 2 e gestacional, entretanto, há uma grande variedade etiológica do DM. Além destes tipos comumente citados, o DM pode ser decorrente, por exemplo, de defeitos genéticos na função das células beta pancreáticas ou na ação da insulina, endocrinopatias, doenças do pâncreas exócrino, infecções, síndromes genéticas e reação adversa ao uso de medicamentos ou agentes químicos.

O DM tipo 1 caracteriza-se por uma deficiência absoluta na produção de insulina pelas células beta pancreáticas, decorrente de um processo autoimune. Nos indivíduos acometidos por este tipo de DM podem ser encontrados elevados níveis circulantes de anticorpos anti-ilhota, anti-insulina, antiácido glutâmico descarboxilase, isoforma de 65 kDa (GAD65) e antiantígenos associados a insulino (IA2 e IA2B). Cerca de 85 a 90% dos indivíduos com DM tipo 1 possuem um ou mais destes anticorpos. Há também alguns tipos de DM tipo 1 idiopáticos, não decorrentes de autoimunidade (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

No DM tipo 2, há uma combinação entre resistência à ação da insulina nos tecidos-alvo e uma resposta pancreática secretória de insulina inadequada. Este tipo de diabetes ocorre, principalmente, em indivíduos obesos ou com acúmulo de gordura na região abdominal (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

Já o DM gestacional caracteriza-se por um quadro de intolerância à glicose com início durante a gravidez, ou pré-existente e apenas detectado neste período. Após o parto, muitas mulheres reverterem este quadro de DM (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

1.1.2 Sintomas do DM

Os principais sintomas do DM incluem hiperglicemia, poliúria (aumento do volume urinário), polidipsia (aumento da ingestão hídrica), polifagia (aumento da ingestão alimentar) e perda de peso. A hiperglicemia crônica pode ainda aumentar a susceptibilidade a infecções e instalação de complicações ao longo prazo, tais como retinopatia com potencial perda de visão, nefropatia levando a problemas renais, e neuropatia periférica com risco de amputações. Há também aumento na incidência de aterosclerose, sendo que a hipertensão e dislipidemia são frequentemente observadas em diabéticos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

Outra importante consequência do DM é o processo de perda de massa muscular, que contribui para a diminuição da qualidade de vida do indivíduo diabético, principalmente de idosos; nesta faixa etária, a perda de massa muscular tem prevalência de 8 a 50% (MORLEY et al., 2001; ATIENZAR et al., 2012), e o DM contribui para a piora desse processo. PARK et al. (2007) observaram, em estudo realizado com idosos de 70 a 79 anos, que indivíduos com DM tipo 2 perderam a força muscular precocemente em relação aos indivíduos não diabéticos; posteriormente, PARK et al. (2009) comprovaram que houve maior perda de massa muscular em idosos com DM tipo 2 em relação aos indivíduos saudáveis.

No DM tipo 1, a resposta catabólica em decorrência da deficiência absoluta de insulina é ainda mais evidente; RESKE-NIELSEN et al. (1977) analisaram um grupo de indivíduos diagnosticados com DM tipo 1 há no máximo 28 semanas e neste período estes indivíduos já apresentavam uma importante perda de massa muscular (KRAUSE et al., 2011).

1.1.3 Mecanismos efetores de proteólise intracelular

Diversos estudos que tratam da compreensão das alterações metabólicas observadas no DM, bem como da eficiência de intervenções terapêuticas na doença, têm como foco principal a correção dos distúrbios observados no metabolismo de carboidratos e lipídeos; poucos são os estudos direcionados para a compreensão das mudanças observadas e/ou intervenções que sejam efetivas no combate à perda de massa muscular que ocorre no DM.

A insulina inibe a degradação de proteínas e estimula a síntese proteica no músculo esquelético (WORKENEH et al., 2013), portanto a deficiência do hormônio culmina em perda de massa muscular. Segundo PEPATO et al. (1996), animais diabéticos (indução com estreptozotocina) apresentam redução na velocidade de síntese proteica e aumento na proteólise em músculos esqueléticos, levando à atrofia muscular que pode contribuir para a diminuição de peso corporal no DM.

Há quatro vias proteolíticas principais que, quando ativadas, estão envolvidas na perda de massa muscular: sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma (UPS), sistema proteolítico mediado por caspase, sistema proteolítico dependente de cálcio (calpaínas como proteases) e sistema proteolítico lisossomal (catepsinas como proteases) (WORKENEH et al., 2013).

O UPS é o sistema proteolítico que contribui de maneira mais efetiva para a degradação proteica intracelular. O proteassoma, protease do sistema, é formado por um núcleo catalítico, denominado proteassoma 20S, e as subunidades 19S nas quais se localizam as ATPases responsáveis pelo reconhecimento e posterior desenovelamento das proteínas a serem degradadas pelo proteassoma 20S. A montagem das subunidades 20S e 19S culmina na formação do proteassoma 26S (ATTAIX et al., 2005). Antes da degradação das proteínas pelo proteassoma, existe o processo de ubiquitinação; as proteínas destinadas à degradação pelo proteassoma 26S são “marcadas” pela ligação covalente e sucessiva de proteínas ubiquitina (Ub), através do processo de poliubiquitinação, que envolve a ação sequencial da enzima ativadora da ubiquitina (E1), enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) e enzimas ligadoras de ubiquitina (E3) (CIECHANOVER et al., 1980) (Figura 1).

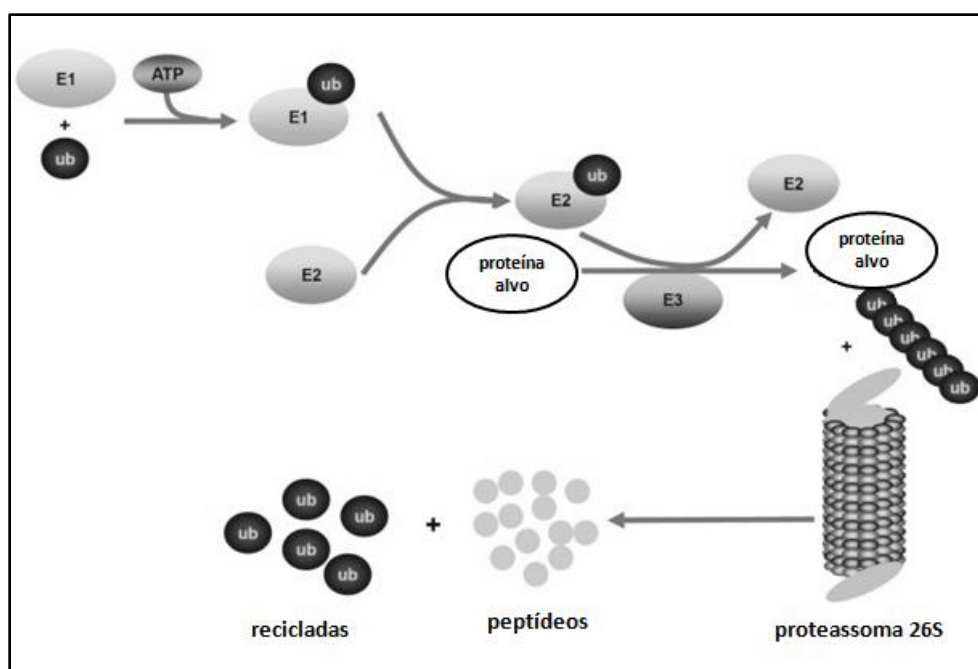


Figura 1: Degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteassoma (TU et al., 2012, com modificações).

Diversos estudos têm demonstrado que a perda de massa muscular no DM seria causada principalmente pela diminuição na ativação de efetores intracelulares que fazem parte da sinalização da insulina, e assim não ocorre a inibição na expressão de genes de componentes do UPS (MERFORTH et al., 1999).

Uma vez que o proteassoma é incapaz de degradar proteínas miofibrilares intactas (SOLOMON; GOLDBERG, 1996) e considerando-se que aproximadamente 70% das proteínas musculares estão na forma de complexos de actomiosina que são degradados pelo UPS (LECKER et al., 1999), a prévia dissociação das miofibrilas é um passo limitante para o processo de ubiquitinação de proteínas miofibrilares e subsequente degradação pelo proteassoma 26S (Figura 2).

As caspases são proteases normalmente ativadas em processos de apoptose, um mecanismo de morte celular programada dependente de energia e fisiologicamente regulado. Na célula, as caspases estão inicialmente em forma inativa (zimogênios) e são posteriormente ativadas por estímulos de morte celular, tanto extrínsecos (eliminação de células indesejadas durante o desenvolvimento, remoção de tumores pelo sistema imune) quanto intrínsecos (eliminação de células afetadas por radiação ionizante, quimioterapia, dano mitocondrial) à célula. As caspases são classificadas em iniciadoras ou efetoras. As iniciadoras correspondem às caspases 8 e 10, ativadas pela via extrínseca, e às caspases 9 e 2, ativadas pela via intrínseca. As caspases 3 e 7 atuam como efetoras na cascata de apoptose (BOATRIGT; SALVESEN, 2003).

DU et al. (2004) demonstraram que a caspase-3 também tem participação no processo de degradação de proteínas no músculo, promovendo desestruturação do sarcômero e fornecendo substratos para o UPS na musculatura esquelética. A

caspase-3 é capaz de clivar complexos de actomiosina a fragmentos de actina de 14 kDa, liberando proteínas do sarcômero.

As calpaínas são as proteases que fazem parte do sistema proteolítico dependente de cálcio e também possuem participação na liberação de proteínas miofibrilares do sarcômero, já que clivam diversas das proteínas envolvidas na manutenção da estrutura existente entre os miofilamentos e as miofibrilas.

No músculo esquelético há dois tipos principais de calpaínas, a μ -calpaína, protease dependente de Ca^{2+} em concentração micromolar, e a m -calpaína, dependente de concentração milimolar de Ca^{2+} para seu funcionamento. Outro componente do sistema das calpaínas é a proteína calpastatina, que atua como um inibidor fisiológico das calpaínas (GOLL et al., 2008).

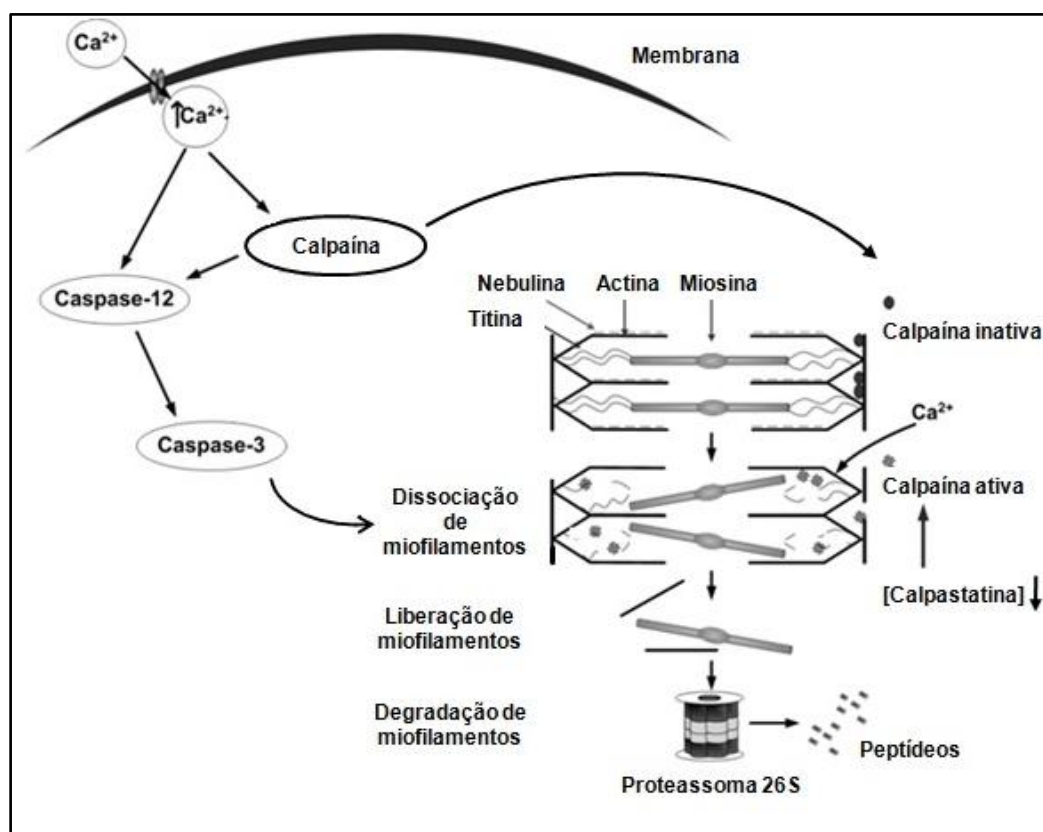


Figura 2: Liberação de proteínas do sarcômero pela ação de calpaína e caspase-3 e degradação pelo proteassoma (POWERS et al., 2005, com modificações).

O sistema proteolítico lisossomal pode ser ativado por estímulos extra e intracelulares, tais como deficiência de aminoácidos, hipóxia, estresse oxidativo, infecções e por meio de sinalização entre as organelas. Proteínas da membrana e componentes do meio externo são transportados até o lisossomo pela via endocítica; já os componentes do citosol e as organelas podem ser transportados por meio de autofagia. Os principais mecanismos de autofagia são: microautofagia, macroautofagia e autofagia mediada por chaperonas, sendo os dois últimos os principais responsáveis pela degradação de proteínas (WANG et al., 2015; MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011).

A macroautofagia ocorre com a formação do autofagossomo, que engloba materiais solúveis e organelas e incorpora-se ao lisossomo para que estes componentes sejam degradados (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011). Na autofagia mediada por chaperonas, as proteínas alvo que contém o peptídeo KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) são reconhecidas por chaperonas e transportadas diretamente para o lumen lisossomal. (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011).

As proteases lisossomais são as catepsinas, divididas em quatro grupos de acordo com suas características: cisteína, aspartil, serina e asparagina endopeptidases. As catepsinas são transportadas ao lisossomo e ativadas pelo baixo pH da organela ou através de processamento proteolítico por outra protease (KASTEREN; OVERKLEEF, 2014).

No presente trabalho, o enfoque foi sobre os sistemas proteolíticos UPS, calpaínas e caspase-3, direcionando a investigação sobre o sistema de dissociação e degradação das proteínas miofibrilares.

1.1.3.1 Outras causas de perda de massa muscular

A perda de massa muscular também pode ser decorrente de uma grande variedade de condições clínicas, tais como caquexia associada a condições patológicas, envelhecimento (sarcopenia) e inatividade muscular (EVANS, 2010)

A caquexia secundária a patologias (câncer, sepse, doença pulmonar obstrutiva crônica, perda de função renal, AIDS) tem como característica a rápida perda de peso e massa muscular. Nesta condição frequentemente ocorre elevação nos níveis do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e de interferon- γ (IFN- γ), que promovem um aumento na degradação de miosina por indução na expressão de genes do sistema UPS via ativação do fator de transcrição nuclear kappa beta (NF- κ B). A redução nos níveis de testosterona, um hormônio anabólico, também contribui para a redução de massa muscular em indivíduos com caquexia, assim como uma possível resistência do músculo esquelético ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (EVANS, 2010).

A sarcopenia é a perda de massa e função musculares em decorrência do envelhecimento. Ocorre de maneira complexa e multifatorial, envolvendo a redução na quantidade e na velocidade de ação de neurônios motores, redução da prática de atividades físicas, dano oxidativo ao DNA mitocondrial, resistência à ação da insulina, entre diversos outros fatores (DREYER et al., 2005).

A atrofia causada por desuso muscular, como no caso de pacientes acamados, também tem origem complexa. Esses indivíduos apresentam elevada excreção de nitrogênio, porém esta excreção aumentada de nitrogênio tem maior influência da redução na síntese proteica em relação ao aumento na degradação de proteínas musculares (EVANS, 2010).

Em todos os casos, a atrofia muscular leva a um agravamento do estado de saúde do indivíduo, diminuindo a qualidade de vida e podendo levar a uma piora do quadro clínico. Sendo a perda de massa muscular um sintoma agravante também no DM, a busca por compostos que inibam vias proteolíticas envolvidas neste processo é fundamental.

1.2 Tratamento do diabetes mellitus

O tratamento medicamentoso do DM consiste na administração de insulina exógena e/ou uso de fármacos antidiabéticos orais que, por muitas vezes, promovem efeitos adversos, tais como hipoglicemia, disfunção hepática, acidose láctica, dor abdominal, diarreia, entre outros (SIQUEIRA, 2012). Desta forma, é crescente o interesse da população pela busca de tratamentos alternativos e/ou complementares à terapia convencional, advindos principalmente de plantas medicinais e/ou alimentos funcionais.

A presença de compostos biologicamente ativos explica o potencial das plantas medicinais e dos alimentos funcionais na prevenção, redução de riscos e/ou tratamento de doenças. Esteroides vegetais, fibras, alcaloides e polifenóis são exemplos de compostos encontrados nestes produtos de origem natural e que possuem um amplo espectro de atividades biológicas importantes no combate a doenças em humanos (DILLARD; GERMAN, 2000).

1.3 Curcumina

A curcumina é um polifenol extraído dos rizomas de *Curcuma longa* L.

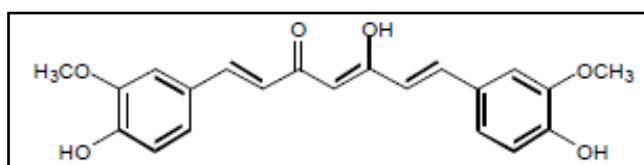


Figura 3: Estrutura da curcumina.

A literatura reporta uma diversidade de propriedades farmacológicas da curcumina, tais como anti-inflamatória, antioxidante, analgésica, além de possuir ação preventiva e terapêutica em diversos tipos de câncer (AGGARWAL, 2010). GUTIERRES et al. (2012) demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com 90 mg/kg de curcumina incorporada em iogurte melhorou diversos parâmetros associados ao DM; houve redução nos níveis de glicose e triacilgliceróis no plasma, redução da polifagia e aumento no ganho de peso, além de outros benefícios.

Alguns estudos propõem os mecanismos que podem explicar a atividade antidiabética da curcumina; tem sido demonstrado que a curcumina é capaz de reduzir a hiperglicemia por diversos mecanismos: estímulo da captação de glicose pela musculatura esquelética (KIM et al., 2010), que pode ter relação com o aumento na translocação de transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4) para a membrana plasmática (GUTIERRES et al., 2015); inibição da produção hepática de glicose pelo processo da gliconeogênese (FUJIWARA et al., 2008); aumento na secreção de insulina (ABDEL-AZIZ et al., 2010) e na sensibilidade periférica ao hormônio (SHAO et al., 2012). Além disso, o potencial antioxidante da curcumina também leva a redução no estresse oxidativo observado no DM, podendo assim ser

importante para prevenir o estabelecimento das complicações a longo prazo da doença (ARCARO et al., 2014; MENG et al., 2013; YU et al., 2012).

1.4 Músculos esqueléticos e características

Pelas características bioquímicas, as fibras musculares podem ser classificadas em aeróbicas/oxidativas (tipo I) ou anaeróbicas/glicolíticas (tipo II) (SCOTT et al., 2001).

O músculo *soleus* possui fibras predominantemente oxidativas, do tipo I, com pequeno diâmetro, altos níveis de mitocôndrias e mioglobina, de contração mais prolongada. Este tipo de fibra possui mais capilares do que fibras do tipo II e utiliza glicose e ácidos graxos livres como principais fontes de energia (MUTHNY et al., 2008).

O músculo *extensor digitorum longus* (EDL) possui majoritariamente fibras glicolíticas, tipo II, que são mais espessas e contém elevados níveis de miosina ATPase, sua contração é mais forte e rápida. Como fonte de energia, utiliza principalmente a glicose dos estoques de glicogênio (MUTHNY et al., 2008).

O músculo *gastrocnemius* é composto por fibras do tipo I e II, encontradas praticamente na mesma proporção (WIDRICK et al., 2001).

Nos estudos sobre as alterações em processos metabólicos na musculatura esquelética, é importante a utilização de músculos com características metabólicas distintas. Por este motivo, utilizamos no presente estudo diferentes músculos para avaliar a influência do DM na atividade de diferentes proteases, bem como a efetividade de intervenções terapêuticas, como no caso deste estudo, com o tratamento com curcumina.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades das proteases proteassoma, caspase-3 e calpaína em músculos esqueléticos de animais diabéticos tratados com iogurte enriquecido com curcumina.

2.2 Objetivos específicos

Verificar o efeito do tratamento de ratos diabéticos durante 35 dias com iogurte suplementado com 90 mg/kg de curcumina sobre os processos de degradação de proteínas em músculos esqueléticos *soleus* (músculo esquelético de fibras predominantemente oxidativas, tipo I) e *extensor digitorium longus* (músculo esquelético de fibras predominantemente glicolíticas, tipo II):

- Atividade quimiotripsina-*like* do proteassoma;
- Atividade de caspase-3;
- Atividade de calpaína;
- Alterações nos níveis de conjugados ubiquitinados (*gastrocnemius*).

3. Material e métodos

3.1 Equipamentos

Para incorporação da curcumina em iogurte e preparo dos homogenatos dos músculos *soleus*, EDL e *gastrocnemius*, foram utilizados homogeneizadores Metabo® e OMNI®, respectivamente. Reagentes (sais) e tecidos foram pesados em balança analítica (Acculab®).

A leitura da fluorescência relacionada à determinação das atividades proteolíticas de caspase-3, calpaína e quimiotripsina-*like* do proteassoma foi realizada em fluorímetro de placas BioTek® Synergy H1. Para a determinação de glicemia e ureia urinária, foi utilizado espectrofotômetro de placas da BioTek® Power Wave XS2. Utilizou-se também potenciômetro Marconi® e centrífugas 5417R e 5804R da marca Eppendorf®.

Para realização da eletroforese de proteínas e transferência para membranas de nitrocelulose, utilizou-se aparato de montagem de gel de acrilamida, sistema de eletroforese de proteínas e sistema de transferência para membranas de nitrocelulose da Bio-Rad® (Mini-Protean, BioRad Laboratories). Equipamento C-Digit Blot Scanner (Li-Cor) foi utilizado para a detecção do sinal quimiluminescente gerado nas membranas de nitrocelulose na revelação do Western blotting.

3.2 Sais e reagentes

Foram utilizados: iogurte natural Nestlé® para incorporação da curcumina. Estreptozotocina, curcumina, albumina bovina sérica, reagente de Follin-Ciocalteau,

adenosina trifosfato (ATP), ditioneitol (DTT), amino-4-metilcumarina (AMC), MG132, substrato de proteassoma succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, substrato de calpaína N-Suc-Leu-Tyr-7-amido-4-metilcumarina, substrato de caspase-3 Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metilcumarina, ácido etilenodiamino tetra acético dissódico (EDTA), Triton X-100, HEPES, dodecilsulfato de sódio (SDS), aprotinina, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), leupeptina, pirofosfato de sódio, fluoreto de sódio, ortovanadato de sódio, glicerol, azul de bromofenol, glicina, acrilamida/bisacrilamida, luminol, ácido p-iodofenilborônico (Sigma-Aldrich®). Heparina sódica (Hemofol®) e isoflurano (Cristália®); insulina (NPH 100 U/MI, Lilly®); peróxido de hidrogênio e cloreto de potássio (Merck®); Tris (hidroximetil) aminometano (Tris) e álcool metílico (Qhemis®); sacarose (Mallinckrodt®); cloreto de cálcio (Reagen®). Para a determinação de glicemia e ureia urinária foram utilizados kits comerciais da Labtest Diagnóstica S.A. Cloreto de magnésio e cloreto de sódio (Synth®). Anticorpo antiubiquitina e anticorpo secundário conjugado a *horseradish* peroxidase (HRP) (Cell Signaling®).

3.3 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso inicial de 150 g (seis semanas de idade) provenientes do Biotério Central do Câmpus de Botucatu, UNESP. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Câmpus de Araraquara, onde permaneceram em sala climatizada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade $55 \pm 5\%$) e ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos de manejo e manipulação de animais do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP (CEUA nº 37/2012, ANEXO I).

3.4 Indução do diabetes mellitus experimental

Para a indução do DM, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas; na manhã seguinte foram anestesiados com isoflurano e então receberam 40 mg de estreptozotocina (STZ) por quilo de peso de rato, solubilizada em tampão citrato (10 mM, pH 4,5), na veia jugular. Ratos normais receberam somente tampão citrato pela mesma via. A ração foi reoferecida 2 horas após a indução do DM e os animais foram monitorados até total recuperação do procedimento.

3.5 Tratamento crônico de animais diabéticos com curcumina incorporada em iogurte

Após três dias da administração de STZ, os animais foram selecionados para os experimentos e distribuídos (pareados) em seus respectivos grupos, considerando-se a semelhança entre valores médios de glicemia e peso corporal.

Os grupos estudados foram os seguintes (n = 8 ratos/grupo):

- Grupo normal (não diabético) tratado com iogurte (NIOG);
- Grupo diabético controle tratado com iogurte (DIOG);

- Grupo diabético tratado com 90 mg/kg de curcumina incorporada ao iogurte (DC90);
- Grupo diabético tratado com 4U de insulina (DINS).

A curcumina (Sigma®) foi incorporada em iogurte natural (Nestlé®) em ambiente termostaticado (25°C) durante 90 segundos, sob rotação de 27000 rpm em homogeneizador Metabo®. O tratamento dos animais com curcumina em iogurte ocorreu por via intragástrica (gavagem), em volume de 0,5 mL de iogurte/animal, duas vezes ao dia (8:00 e 18:00 horas), durante 35 dias. Os animais dos grupos DIOG e NIOG receberam somente iogurte, nas mesmas condições.

A insulina (4U/dia, Humolin®) foi administrada por via subcutânea, duas vezes ao dia (8:00 e 18:00 horas), em doses de 2U/administração, durante todo o período de tratamento.

Durante o período experimental, os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais e semanalmente foram determinados o volume urinário de 24 horas e o peso corporal. A urina foi coletada em frasco limpo contendo 300 µL de tolueno para conservação dos metabólitos urinários.

Semanalmente foi realizada a coleta de sangue para obtenção do plasma. A coleta foi feita pela cauda, após indução de vasodilatação periférica, em eppendorfs heparinizados (Hemofol®). Após a coleta do sangue, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 2500 rpm e o plasma foi separado para a determinação da glicemia.

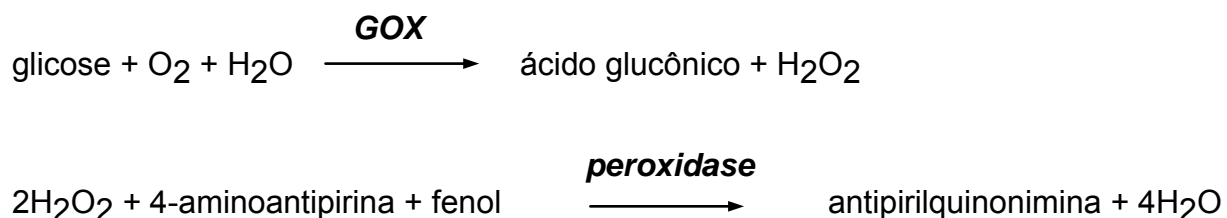
Após 35 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação e o sangue coletado para determinação da glicemia. Além da determinação da glicemia, os músculos esqueléticos *soleus*, EDL e *gastrocnemius* foram retirados,

pesados e imediatamente congelados a -80°C para posterior utilização na determinação da atividade das proteases e níveis de conjugados ubiquitinados.

3.6 Princípios das determinações bioquímicas

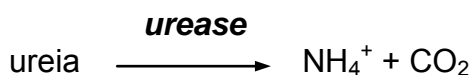
3.6.1 Determinação da glicemia

A glicose oxidase (GOX) catalisa o processo de oxidação da glicose. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando uma antipirilquinonimina (vermelha), que é monitorada à 505 nm e cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra (TRINDER, 1969):



3.6.2 Determinação de ureia urinária

A hidrólise da ureia catalisada pela urease produz íons amônio e CO_2 . Os íons amônio reagem com salicilato e hipoclorito de sódio em meio alcalino na presença de nitroprussiato de sódio, formando o azul de indofenol, o qual é monitorado espectrofotometricamente em 600 nm (BOLLETER; BUSHMAN; TIDWELL, 1961; BERGMEYER, 1985):



3.6.3 Determinação de proteínas totais

As concentrações de proteínas nos sobrenadantes de músculos *soleus*, EDL e *gastrocnemius* foram determinadas de acordo com o método de LOWRY et al. (1951). O princípio do método baseia-se em uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto azul escuro. As concentrações de proteínas foram determinadas espectrofotometricamente em 660 nm.

3.7 Atividades proteolíticas na musculatura esquelética

3.7.1 Atividade quimiotripsina-*like* do proteassoma

A atividade quimiotripsina-*like* do proteassoma foi realizada de acordo com KLAUDE et al. (2007), em sobrenadantes obtidos após homogeneização de músculos *soleus* e EDL em tampão específico (50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 1,8 mM de ATP; pH 7,2), seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o *pellet* e foi realizada nova centrifugação do sobrenadante a 12.000 rpm por 10 minutos.

Foram adicionados 20 μL de sobrenadante de músculos a 265 μL de tampão de reação (50 mM de Tris-HCl, 5 mM de MgCl_2 , 1 mM de DTT e 1 mM de ATP; pH 7,5) e a reação foi iniciada após a adição de 15 μL de solução estoque (1 mM) do substrato específico, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcumarina, que no meio reacional atingiu concentração de 100 μM .

Foram realizadas leituras de 10 em 10 minutos, em total de 180 minutos, da 7-amino-4-metilcumarina (AMC) liberada no meio. O mesmo ensaio foi repetido para cada amostra, na presença de 90 μM de MG132, inibidor da atividade proteolítica do proteassoma. Também foram realizadas leituras de fluorescência da curva padrão de AMC (0,015 μM a 0,5 μM), nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 360 e 460 nm, respectivamente.

A atividade do proteassoma foi determinada pela diferença nas leituras de fluorescência na ausência e na presença do inibidor da protease. Os resultados foram expressos como pmol de AMC.mg proteína⁻¹.min⁻¹.

3.7.2 Atividade de calpaína

A atividade de calpaína (DOUILLARD et al., 2012) foi realizada em sobrenadantes obtidos após homogeneização de músculos *soleus* e EDL em tampão específico (20 mM de Tris-HCl, 5 mM de EDTA, 1 mM de DTT e 0,1% de Triton X-100; pH 7,4), seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Foram adicionados 20 μL de sobrenadante de músculos a 200 μL de tampão de reação (20 mM de Tris-HCl, 5 mM de CaCl_2 , 1 mM DTT; pH 7,4) e a reação foi iniciada após a adição de 10 μL de solução estoque (1 mM) do substrato específico,

N-Suc-Leu-Tyr-7-amido-4-metilcumarina, que no meio reacional atingiu concentração de 50 μM .

Foram realizadas leituras nas mesmas condições citadas anteriormente, desta vez na presença de 50 μM de calpeptina, inibidor da atividade proteolítica das calpaínas. Também foram realizadas leituras de fluorescência da curva padrão de AMC (0,015 μM a 0,5 μM), nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 360 e 460 nm, respectivamente.

A atividade de calpaína foi determinada pela diferença nas leituras de fluorescência na ausência e na presença do inibidor da protease. Os resultados foram expressos como pmol de AMC.mg proteína⁻¹.min⁻¹.

3.7.3 Atividade de caspase-3

A atividade de caspase-3 foi realizada de acordo com DU et al. (2004), com modificações, em sobrenadantes obtidos após homogeneização de músculos *soleus* e EDL em tampão específico (100 mM de HEPES, 10% de sacarose, 0,1% de Triton X-100, 10 mM de DTT; pH 7,5), seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 45 minutos a 4°C.

Foram adicionados 20 μL de sobrenadante de músculos a 255 μL de tampão de reação (20 mM de HEPES, 2 mM de EDTA, 5mM de DTT; pH 7,5) e a reação foi iniciada após a adição de 10 μL de solução estoque (1mM) do substrato específico, Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metilcumarina, que no meio reacional atingiu concentração de 50 μM .

Foram realizadas leituras nas mesmas condições citadas anteriormente.

Os resultados foram expressos como nmol de AMC.mg proteína⁻¹.min⁻¹.

3.8 Níveis de conjugados ubiquitinados (Western blotting)

Músculos *gastrocnemius* foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4; 4°C) contendo 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS, inibidores de proteases (5 µg/mL de aprotinina, 1 mM de PMSF, 2,34 mM de leupeptina) e inibidores de fosfatases (10 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de ortovanadato de sódio). O homogenato foi centrifugado a 11000 rpm e 4°C durante 30 minutos e o sobrenadante utilizado para determinação da concentração de proteínas utilizando albumina bovina sérica como padrão (LOWRY et al.,1951).

Amostras de sobrenadante contendo 100 µg de proteína em tampão Laemmli (62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 10% de glicerol, 2% de SDS, 100 mM de ditiotreitol, 0,1% de azul de bromofenol) foram fervidas por 3 minutos e submetidas a eletroforese tipo SDS-PAGE em gel de acrilamida/bisacrilamida 7% (Laemmli, 1970) em aparato de gel miniatura Bio-Rad (Mini-Protean, BioRad Laboratories). A eletrotransferência das proteínas do gel para membranas de nitrocelulose foi realizada em tampão de transferência (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM glicina, 10% metanol, 0,05% de SDS) durante 180 minutos a amperagem constante de 350 mA em aparato de transferência miniatura Bio-Rad (MiniProtean) de acordo com TOWBIN et al. (1979).

Ligações não específicas de proteínas a membrana de nitrocelulose foram reduzidas pela pré incubação da membrana em tampão de bloqueio durante 1 hora (10% de leite desnatado, 10 mM de Tris, 125 mM de NaCl e 0,05% de Tween 20). Posteriormente, as membranas foram incubadas a 4°C *overnight* com anticorpo primário específico antiubiquitina (1:1000) (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Como

controle interno, foi utilizada a densitometria da imagem das membranas coradas com Ponceau. Após lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a *horseradish* peroxidase (HRP) na diluição 1:1000 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) durante 1 hora à temperatura ambiente.

Novamente as membranas foram lavadas, incubadas com substrato quimiluminescente (1,25 mM de luminol, 4 mM mM de ácido p-iodofenilborônico, 5,3 mM de peróxido de hidrogênio, Tris-HCl 0,1 M, pH 8,8) de acordo com Haan; Behrmann (2007), com modificações. O sinal quimiluminescente foi detectado por equipamento C-Digit Blot Scanner (LI-COR, Lincoln, NE, USA) e a intensidade das bandas foi quantificada utilizando o programa LI-COR Image Studio 4.0.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados por análise de variância One-way (ANOVA) seguida pelo Student-Newman-Keuls, para comparações intergrupos temporais dos parâmetros bioquímicos. Para as comparações intragrupo foi utilizado o teste t Student pareado. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$. As análises supracitadas foram realizadas utilizando o programa GraphPad InStat® 3.05.

4. Resultados

4.1 Glicemia

Antes do início do tratamento (dia zero, pareamento), os valores médios de glicemia de animais diabéticos dos diferentes grupos foram de aproximadamente 445 mg/dL, mostrando assim a eficiência do pareamento e permitindo afirmar que alterações nos valores de glicemia deste dia em diante podem ser interpretadas como cronicidade do DM (DIOG) ou respostas promovidas pelos tratamentos (DC90, DINS). Além disso, os valores médios de glicemia de animais DIOG foram estatisticamente maiores em relação aos valores encontrados no grupo NIOG, desde o dia 0, bem como em relação ao grupo DINS, desde o 7º dia até o final do período experimental. Também pode-se observar que houve uma piora progressiva do estado diabético dos animais DIOG, com aumento significativo da glicemia desde o 7º dia até o final dos 35 dias de experimento (Figura 4).

O tratamento de ratos diabéticos com insulina (DINS) foi capaz de reduzir os níveis glicêmicos, mantendo-os em valores próximos daqueles observados no grupo NIOG, durante os 35 dias de tratamento. O tratamento com 90 mg/kg de curcumina também foi capaz de promover manutenção na glicemia dos animais diabéticos, a partir do 7º dia de tratamento, em relação ao grupo DIOG, impedindo assim o aumento progressivo na glicemia tal como observado em DIOG (Figura 4).

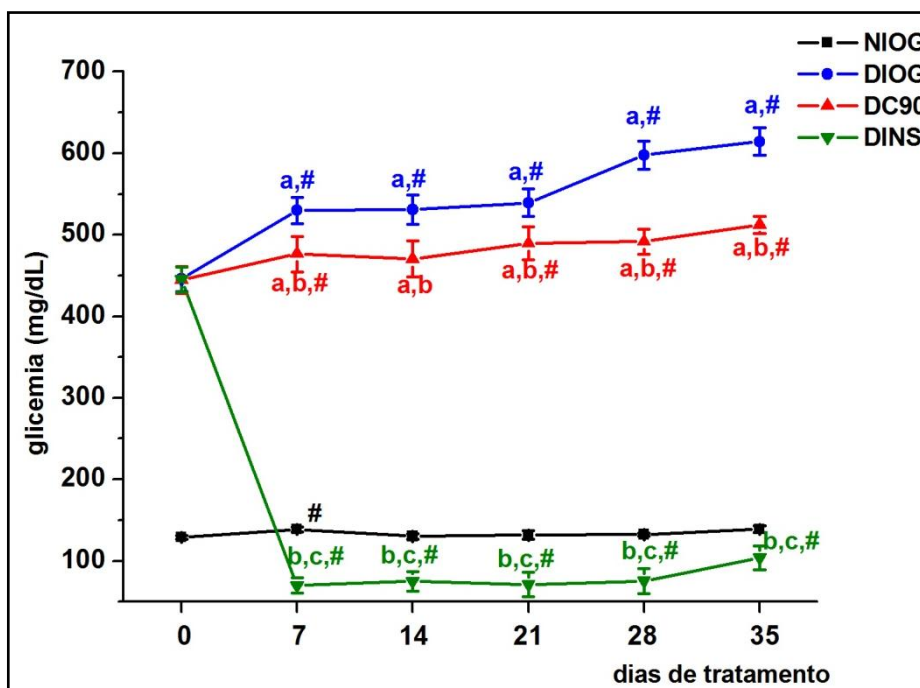


Figura 4: Glicemia (mg/dL) de ratos diabéticos tratados durante 35 dias com curcumina incorporada em iogurte. Os valores representam média \pm EPM. Comparações intergrupos para um mesmo período ($p < 0,05$): a: vs NIOG; b: vs DIOG; c: vs DC90; #: diferenças em relação ao dia 0.

4.2 Ureia urinária

Na Figura 5 estão apresentadas as concentrações de ureia na urina de animais normais e diabéticos ao longo dos 35 dias de tratamento. Pode-se observar que no pareamento (dia 0), isto é, apenas 3 dias após a indução do DM, os animais diabéticos já apresentavam valores de ureia urinária significativamente elevados em relação aos animais normais, que mantiveram estes níveis baixos durante todo o experimento.

Houve um aumento progressivo nos níveis de ureia urinária em animais DIOG, que eliminaram concentrações de ureia significativamente maiores ao longo do experimento. Já o tratamento com insulina evitou o aumento nos níveis urinários

de ureia, que foram semelhantes aos valores encontrados no grupo NIOG até o final do experimento (Figura 5).

O tratamento com curcumina mostrou-se efetivo no controle dos níveis urinários de ureia: a partir do 21º dia de tratamento, os níveis de ureia foram semelhantes aos valores observados no grupo DINS e, apesar de ter ocorrido um aumento no 28º dia, ao final do experimento os níveis de ureia urinária em animais DC90 foram semelhantes aos animais DINS e inferiores aos valores observados no grupo DIOG (Figura 5).

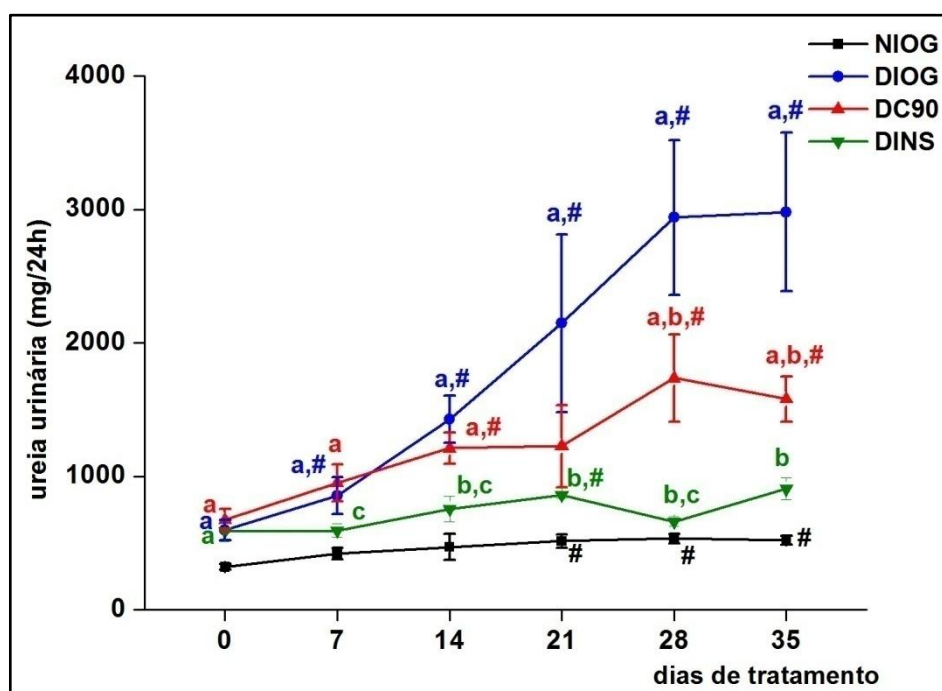


Figura 5: Ureia urinária de ratos diabéticos tratados durante 35 dias com curcumina incorporada em iogurte. Os valores representam média \pm EPM. Comparações intergrupos para um mesmo período ($p < 0,05$): a vs NIOG; b: vs DIOG; c: vs DC90; #: diferenças em relação ao dia 0.

4.3 Peso corporal

Animais do grupo DIOG apresentaram um menor ganho de peso corporal em relação aos animais NIOG durante todo o período experimental, indicando assim uma piora do estado diabético nos animais sem tratamento (Figura 6).

O grupo DINS apresentou ganho de peso corporal maior em relação aos grupos DIOG e DC90, alcançando a taxa de ganho corporal observada no grupo NIOG (Figura 6).

Animais DC90 apresentaram um ganho de peso corporal significativamente maior em relação ao grupo DIOG, a partir do 28º dia de tratamento, porém não alcançaram a taxa de crescimento corporal observada nos grupos NIOG e DINS (Figura 6).

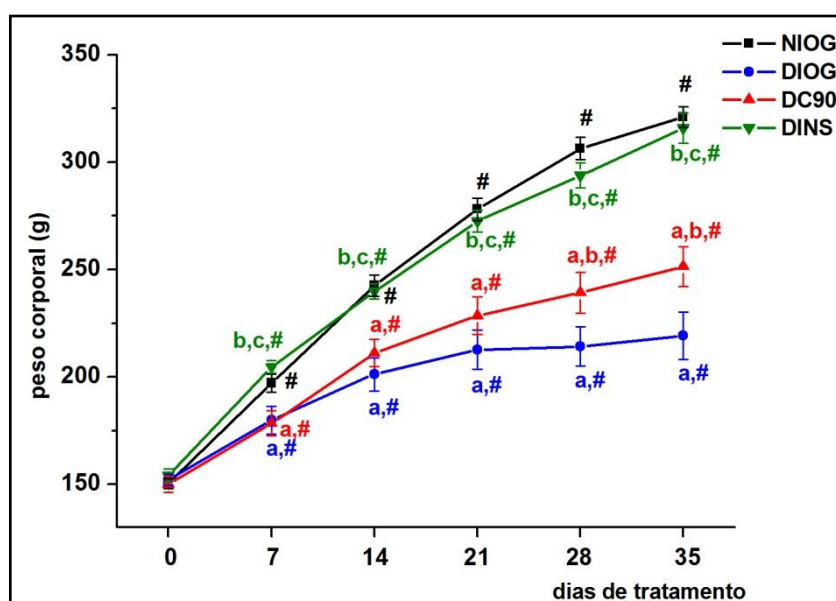


Figura 6: Peso corporal (g) de ratos diabéticos tratados durante 35 dias com curcumina incorporada em iogurte. Os valores representam média \pm EPM. Comparações intergrupos para um mesmo período ($p < 0,05$): a: vs NIOG; b: vs DIOG; c: vs DC90; #: diferenças em relação ao dia 0.

4.4 Peso dos músculos *soleus* e EDL

Animais do grupo DIOG apresentaram uma redução de 39% no peso de músculo *soleus* em relação ao grupo NIOG, mostrando o estado de catabolismo típico de uma situação de deficiência insulínica, levando à atrofia da musculatura esquelética. O grupo DINS apresentou o maior ganho de massa muscular em relação aos demais grupos de animais diabéticos, com valores de peso de músculos *soleus* semelhantes àqueles do grupo NIOG. Não foram encontradas diferenças nos valores de peso de músculo *soleus* entre os grupos DIOG e DC90 (Figura 7).

Semelhante ao observado para os músculos *soleus*, animais do grupo DIOG apresentaram peso de músculos EDL menor (29%) em relação aos valores observados em NIOG. Houve maior ganho de massa de músculo EDL de animais DINS em relação aos demais grupos de animais diabéticos, que apresentaram peso deste músculo semelhante ao NIOG (Figura 7).

Houve um aumento de 30% no peso de músculos EDL em animais DC90 em relação ao grupo DIOG. Além disso, a massa de músculo EDL de ratos DC90 foi semelhante àquela observada em DINS e NIOG, mostrando que a eficácia do tratamento com curcumina em preservar a massa da musculatura glicolítica foi semelhante ao benefício trazido pelo tratamento com insulina (Figura 7).

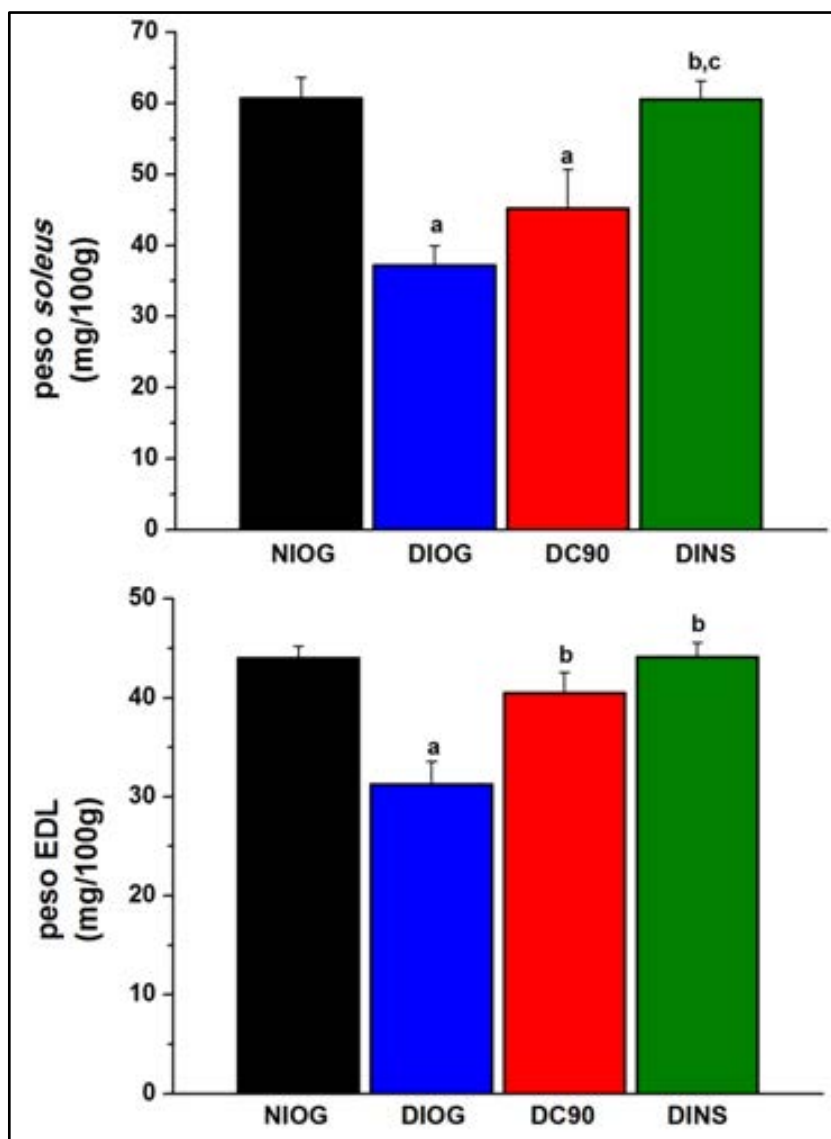


Figura 7: Peso dos músculos *soleus* e EDL (mg/100g) de ratos diabéticos tratados durante 35 dias com curcumina incorporada em iogurte. Os valores representam média \pm EPM. Comparações intergrupos para um mesmo período ($p < 0,05$): a: vs NIOG; b: vs DIOG; c: vs DC90.

4.5 Atividade quimiotripsina-*like* do proteassoma

Em *soleus*, a atividade quimiotripsina-*like* do proteassoma foi maior nos grupos DIOG e DC90 em relação ao grupo NIOG, em 22 e 23%, respectivamente. O grupo DINS apresentou o mesmo perfil que NIOG em relação à atividade da protease (Figura 8).

Em EDL, a atividade quimiotripsina-*like* do proteassoma apresentou-se aumentada em 44% no grupo DIOG em relação à NIOG, corroborando a perda de massa muscular observada neste músculo em ratos diabéticos. Houve redução de 26% na atividade do proteassoma em animais do grupo DC90 e de 34% em animais do grupo DINS em relação ao DIOG. Pode-se evidenciar que o tratamento com curcumina produziu resultados semelhantes ao tratamento com insulina (Figura 8).

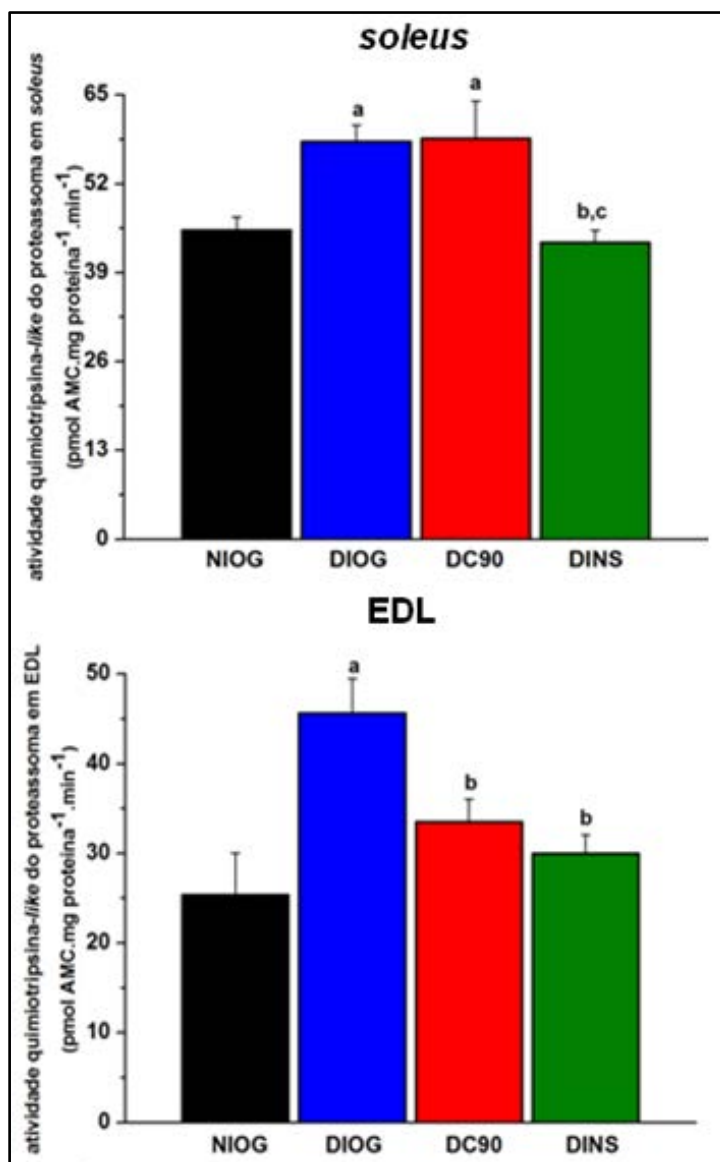


Figura 8: Atividade de proteassoma em músculos *soleus* e EDL (pmol AMC/mg proteína/min) de ratos diabéticos tratados durante 35 dias com curcumina incorporada em iogurte. Os valores representam média \pm EPM. Comparações intergrupos para um mesmo período ($p < 0,05$): a: vs NIOG; b: vs DIOG; c: vs DC90.

4.6 Atividade de calpaína

Os grupos apresentaram perfil de resposta de atividade de calpaína em músculos semelhante ao observado para a atividade do proteassoma.

Em músculos *soleus*, as atividades de calpaína foram semelhantes entre DIOG e DC90, sendo maiores que NIOG, em 24 e 20%, respectivamente. DINS apresentou atividade de calpaína em *soleus* semelhante ao NIOG (Figura 9).

Em músculos EDL, animais DIOG apresentaram atividade de calpaína 40% maior em comparação aos valores em NIOG. Nos grupos DC90 e DINS, a atividade de calpaína foi menor (23 e 31%, respectivamente) em relação ao grupo DIOG (Figura 9).

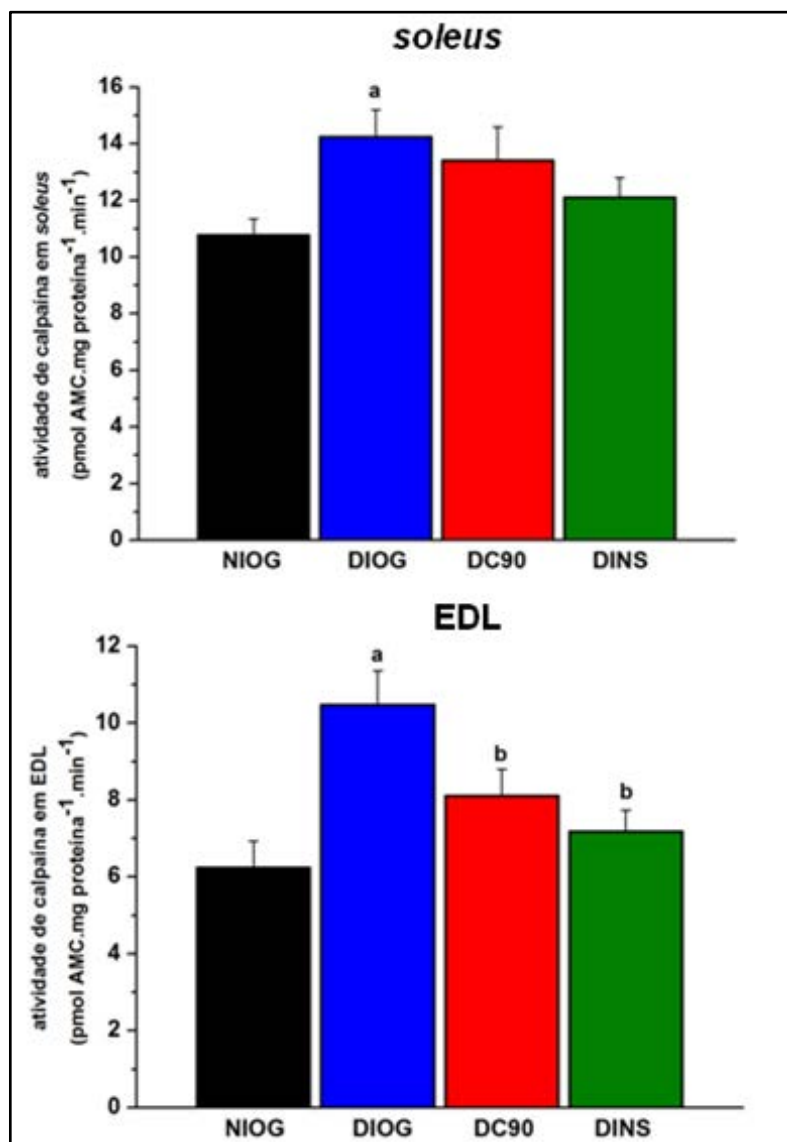


Figura 9: Atividade de calpaína em músculos *soleus* e EDL (pmol AMC/mg proteína/min) de ratos diabéticos tratados durante 35 dias com curcumina incorporada em iogurte. Os valores representam média \pm EPM. Comparações intergrupos para um mesmo período ($p < 0,05$): a: vs NIOG; b: vs DIOG; c: vs DC90.

4.7 Atividade de caspase-3

Houve queda de 24% na atividade de caspase-3 no músculo *soleus* de animais DIOG em relação aos valores encontrados em NIOG. Tanto o tratamento com insulina quanto o tratamento com curcumina foram capazes de promover aumento (ou prevenir a queda) na atividade de caspase-3 no músculo *soleus* de ratos diabéticos; a atividade da protease foi 47% e 34% maior nos grupos DC90 e DINS, respectivamente, em relação ao grupo DIOG, alcançando valores semelhantes aqueles observados no grupo NIOG (Figura 10).

O perfil observado na atividade de caspase-3 em músculos EDL foi semelhante àquele encontrado em músculos *soleus*. Houve redução de 29% na atividade de caspase-3 em EDL de animais DIOG em relação à NIOG. A atividade de caspase-3 foi 37% e 26% maior nos grupos DC90 e DINS, respectivamente, em relação ao grupo DIOG, alcançando valores semelhantes àqueles observados no grupo NIOG (Figura 10).

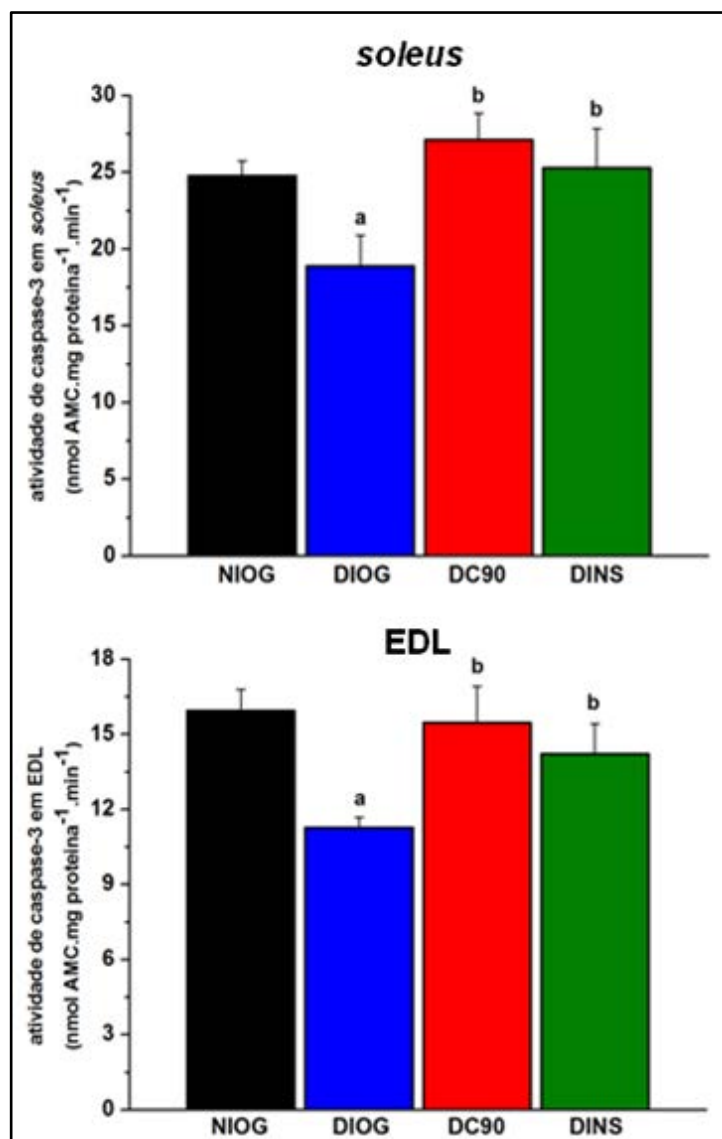


Figura 10: Atividade de caspase-3 em músculos *soleus* e EDL (nmol AMC/mg proteína/min) de ratos diabéticos tratados durante 35 dias com curcumina incorporada em iogurte. Os valores representam média \pm EPM. Comparações intergrupos para um mesmo período ($p < 0,05$): a: vs NIOG; b: vs DIOG; c: vs DC90.

4.8 Níveis de conjugados ubiquitinados

Na Figura 11 estão apresentados os níveis de conjugados ubiquitinados em músculos *gastrocnemius* de animais diabéticos tratados durante 35 dias com iogurte enriquecido com curcumina. Por serem pequenos, os músculos *soleus* e EDL foram necessários no preparo de amostras para as atividades proteolíticas, não restando tecidos a serem processados para o estudo dos conjugados ubiquitinados; por este motivo os conjugados ubiquitinados foram investigados neste outro músculo.

Pode-se observar que animais diabéticos tratados somente com iogurte (DIOG) apresentaram níveis elevados de conjugados ubiquitinados em comparação a todos os outros grupos; seus níveis foram 156 e 162% superiores aos valores apresentados pelos grupos NIOG e DINS, respectivamente (Figura 11).

O grupo diabético tratado com curcumina apresentou redução de 41% nos níveis de conjugados ubiquitinados em relação ao DIOG e níveis semelhantes aos grupos NIOG e DINS (Figura 11).

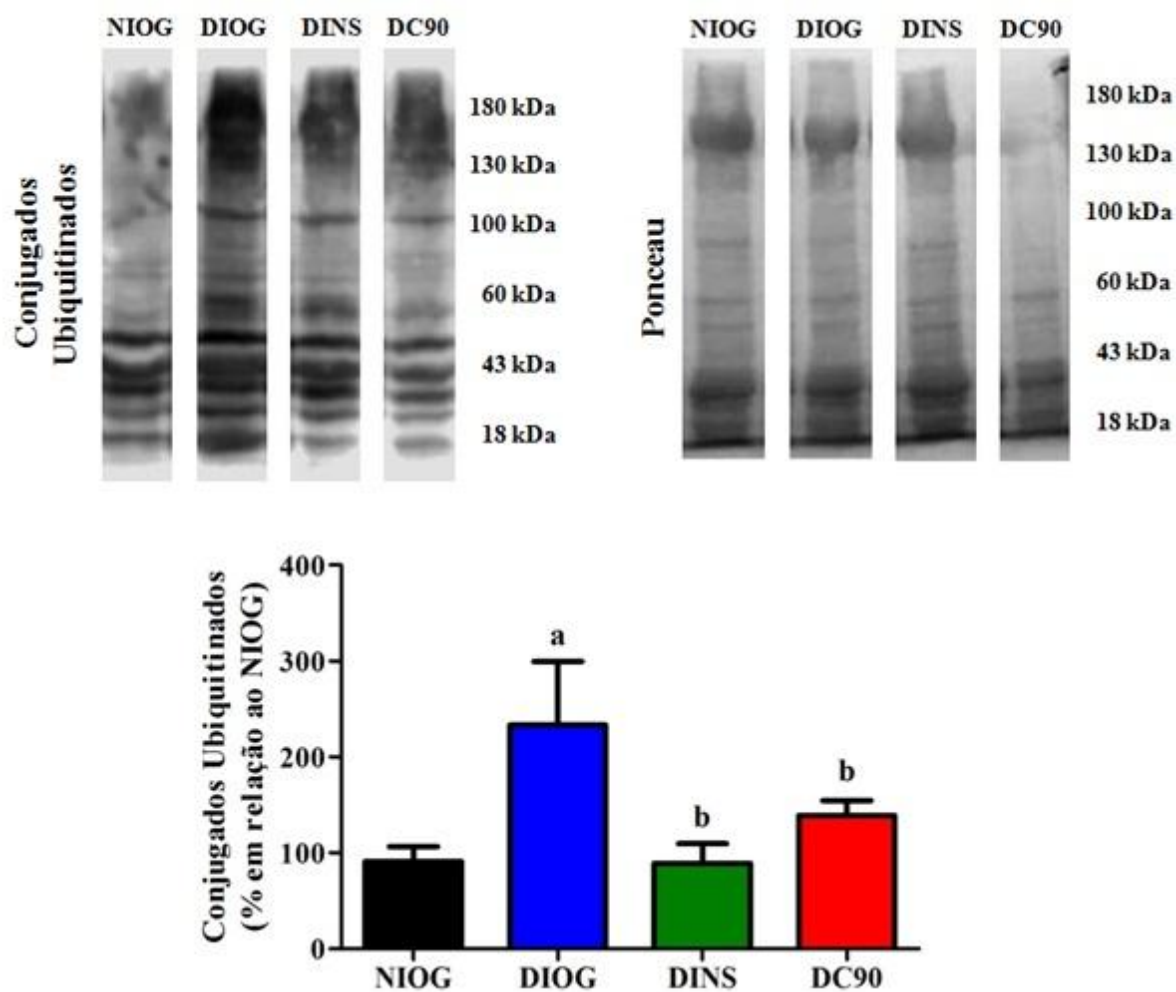


Figura 11: Níveis de conjugados ubiquitinados (% em relação ao NIOG) em músculos *gastrocnemius* de ratos normais e diabéticos tratados por 35 dias com iogurte enriquecido com curcumina. Os valores representam média \pm EPM. Comparações intergrupos para um mesmo período ($p < 0,05$): a: vs NIOG; b: vs DIOG.

5. Discussão

O tratamento de ratos diabéticos com curcumina incorporada em iogurte preveniu o aumento progressivo na glicemia, o que não foi observado em ratos diabéticos tratados somente com iogurte, reproduzindo assim achados anteriores do laboratório (GUTIERRES et al., 2012; ARCARO et al., 2014).

As altas concentrações de ureia na urina de animais diabéticos não tratados refletem a piora no estado de deficiência insulínica, condição caracterizada por aumento nas velocidades dos processos de gliconeogênese e proteólise muscular em decorrência da diminuição dos níveis de insulina. Houve redução na concentração de ureia na urina dos animais diabéticos tratados com curcumina em relação aos animais diabéticos não tratados com curcumina ou insulina. Pode-se presumir que a menor concentração de ureia em animais tratados com o pigmento é decorrente da redução do processo de gliconeogênese e, conforme evidenciado pela redução nas atividades proteolíticas do proteassoma e das calpaínas, também é decorrente de uma diminuição da proteólise muscular.

O tratamento com curcumina promoveu redução nas atividades do proteassoma e das calpaínas em EDL de animais diabéticos, reduzindo a perda de massa muscular e contribuindo, pelo menos em parte, para o ganho de peso destes animais. Podemos presumir, portanto, que a calpaína seja a protease responsável em promover a dissociação das proteínas miofibrilares neste modelo experimental de diabetes mellitus, fornecendo substratos para o proteassoma. Também podemos sugerir que a atividade do proteassoma seja a responsável pelo desenvolvimento do perfil atrófico observado nos ratos diabéticos, bem como foi a protease que respondeu aos benefícios trazidos pelos tratamentos com insulina ou curcumina,

levando a maior ganho (ou menor perda) de massa muscular. Estas hipóteses parecem verdadeiras, já que as atividades tanto de calpaína quanto do proteassoma nos músculos estudados apresentaram o mesmo perfil frente ao modelo experimental e frente aos tratamentos.

Corroborando nossos achados, a inibição concomitante nas atividades de calpaínas e proteassoma após o tratamento com curcumina já foi previamente demonstrada; as atividades aumentadas das calpaínas e do proteassoma em EDL de ratos sépticos foram significativamente reduzidas pelo tratamento com 600 mg/kg de curcumina (POYLIN et al., 2008).

Estudos *in vitro* com linhagens celulares de tumores já atestaram que a curcumina inibe a atividade do proteassoma, especialmente a atividade quimiotripsina-*like* (YANG et al., 2010), porém mais estudos são necessários para compreender os mecanismos pelos quais a curcumina impede a perda muscular. ALAMDARI et al. (2009) propuseram que esta ação da curcumina se daria por inibição do fator NF- κ B, que está diretamente envolvido no estabelecimento do catabolismo proteico em músculos de animais sob diversas situações de atrofia muscular e/ou caquexia.

ARCARO et al. (2014) demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com iogurte enriquecido com curcumina reduz os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo e promove aumento na atividade de enzimas de sistemas antioxidantes; além disso, segundo estudos de BARZEGAR et al. (2011), a curcumina também é capaz de capturar espécies reativas de oxigênio. Assim, a atividade antioxidante da curcumina também pode contribuir para a redução na proteólise, uma vez que o estresse oxidativo no músculo esquelético leva a um

aumento nas atividades de proteassoma, calpaína e caspase-3 (POWERS et al., 2005).

De acordo com estudo recente de GUTIERRES et al. (2015), ratos diabéticos tratados por 15 dias com 90 mg/kg de curcumina incorporada em iogurte e em seguida submetidos à sobrecarga de glicose apresentam um aumento significativo na fosforilação da proteína quinase AKT em músculos *gastrocnemius* em comparação aos animais diabéticos não tratados e submetidos à sobrecarga de glicose. Assim, pode-se assim sugerir que a curcumina tenha a capacidade de aumentar a sensibilidade dos músculos à insulina (NA et al., 2011) ou possuir ações *insulina-like*.

A ativação de AKT na cascata da sinalização da insulina em músculos esqueléticos, além de estimular o processo de captação de glicose, também participa na inibição do processo atrofico, especialmente pela inibição da expressão gênica das ubiquitina ligases *atrogen-1* (ou MAFbx, *muscle atrophy F-box*) e *muscle RING finger-1* (MuRF-1) (STITT et al., 2004). *Atrogen-1* e *MuRF-1* são enzimas codificadas por um conjunto de genes conhecidos como “atrogenes”, que fazem parte de um programa transcricional induzido em diversas situações patológicas sistêmicas caracterizadas pela perda de massa muscular esquelética (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001).

Corroborando nossos achados, ONO et al. (2015) demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com curcumina (1500 mg/kg) reduziu a atrofia muscular pela inibição da expressão de genes de ubiquitina ligases, portanto diminuindo o processo de ubiquitinação de substratos para o proteassoma.

Pode-se então presumir que os menores níveis de conjugados ubiquitinados em músculos *gastrocnemius* de animais diabéticos tratados com curcumina são

decorrentes da inibição de atrogenes, tal como relatado por ONO et al. (2015) e indiretamente demonstrado por GUTIERRES et al. (2015) através da ativação de AKT neste mesmo músculo, que levaria então à inibição na expressão dos atrogenes.

Podemos observar que a atividade de caspase-3 está diminuída tanto em *soleus* quanto em EDL de ratos diabéticos, tanto em relação aos animais normais como também em relação aos animais diabéticos tratados com insulina, Uma possível explicação para a queda observada na atividade de caspase-3 em músculos de ratos diabéticos pode ser atribuída à redução na síntese proteica desta protease, pois sabe-se que a síntese proteica é reduzida no diabetes. Esta hipótese pode ser verdadeira se observarmos que o tratamento com insulina restabelece a atividade de caspase-3 para valores semelhantes àqueles observados em animais normais. O tratamento com curcumina promoveu alterações na atividade de caspase-3 tal como o tratamento com insulina, isto é, aumento de atividade. No entanto, este aumento não corrobora a redução na atividade do proteassoma ou maiores valores de peso de músculo observados em ratos diabéticos tratados com o pigmento.

Por fim, vale observar que músculos EDL foram mais responsivos aos benefícios promovidos pela curcumina na inibição das enzimas proteolíticas, em relação aos músculos *soleus*, que permaneceram com as atividades de proteassoma e calpaínas ainda aumentadas em animais diabéticos tratados com o pigmento. Assim, dependendo do tipo de fibra que prevalece na musculatura esquelética, parece existir uma responsividade diferencial ao tratamento com curcumina. Uma possível explicação para isto talvez seja o fato de o músculo *soleus* ser rico em fibras oxidativas, portanto é provável que o estabelecimento de estresse

oxidativo seja mais evidente neste músculo ao invés do EDL, que possui fibras glicolíticas, dependentes de metabolismo anaeróbico. Sabe-se que o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, tanto sistemicamente como também na musculatura esquelética, tem papel importante no estabelecimento de diversas complicações relacionadas ao DM, sarcopenia, caquexia, entre outras condições (MASON; WADLEY, 2014). Assim, se as ações antioxidantes da curcumina forem importantes para as respostas antiproteolíticas do pigmento, tais respostas certamente são mais evidentes em um tecido com menor potencial para geração de espécies reativas de oxigênio.

6. Conclusão

O tratamento de ratos diabéticos com curcumina incorporada em iogurte melhora diversos parâmetros fisiológicos e bioquímicos alterados neste modelo de DM tipo 1, especialmente àqueles relacionados aos distúrbios no metabolismo de carboidratos e lipídeos.

O presente estudo apresenta evidências dos benefícios promovidos pelo tratamento com curcumina no metabolismo de proteínas nesta condição de deficiência insulínica, combatendo a perda de massa muscular. Assim, a redução observada nas atividades das calpaínas e do proteassoma na musculatura esquelética de ratos diabéticos tratados com curcumina pode explicar a menor perda de massa muscular, ilustrando os benefícios da curcumina no combate da atrofia muscular. Além disso, esta redução na proteólise também pode contribuir para a redução na glicemia após o tratamento com curcumina, uma vez que menos substratos são oferecidos para a gliconeogênese hepática.

7. Referências

ABDEL AZIZ, M.T.; EL-ASMAR M.F.; EL NADI E.G.; WASSEF M.A.; AHMED H.H.; RASHED, L.A.; OBAIA, E.M.; SABRY, D.; HASSOUNA, A.A.; ABDEL AZIZ, A.T.; The effect of curcumin on insulin release in rat-isolated pancreatic islets. **Angiology**. 2010 Aug; 61(6): 557-66.

AGGARWAL, B.B.; SUNDARAM, C; MALANI, N; ICHIKAWA, H. Curcumin: the Indian solid gold. **Adv. Exp. Med. Biol.** 2007; 595: 1-75.

ALAMDARI, N.; O'NEAL P.; HASSELGREN, P.O. Curcumin and muscle wasting: a new role for an old drug? **Nutrition**. 2009;25(2):125-9.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. 2010; 33(1): S62-S69.

ARCARO, C.A.; GUTIERRES, V.O.; ASSIS, R.P.; MOREIRA, T.F.; COSTA, P.I.; BAVIERA, A.M.; BRUNETTI, I.L. Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin diabetic rats. **PLoS One**. 2014; 9(12): e113993.

ATIÉNZAR, P.; ABIZANDA, P.; GUPPY, A.; SINCLAIR, A.J. Diabetes and Frailty: An Emerging Issue. Part 1: Sarcopaenia and Factors Affecting Lower Limb Function. **Br. J. Diabetes Vasc. Dis.** 2012; 12(3): 110-116.

ATTAIX, D.; MOSONI, L.; DARDEVET, D; COMBARET, L; MIRAND, P.P; GRIZARD, J. Altered responses in skeletal muscle protein turnover during aging in anabolic and catabolic periods. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 2005; 37: 1962-1973.

BARZEGAR, A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A. Intracellular ROS Protection Efficiency and Free Radical-Scavenging Activity of Curcumin. **PLoS One.** 2011; 6(10): e26012.

BERGMEYER, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed, Deerfield Beach, FL: **Verlag Chemie.** 1985; 449-453.

BODINE, S.C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V.K.; NUNEZ, L.; CLARKE, B.A.; POUYMIROU, W.T.; PANARO, F.J.; NA, E.; DHARMARAJAN, K.; PAN, Z.Q.; VALENZUELA, D.M.; DECHIARA, T.M.; STITT, T.N.; YANCOPOULOS, G.D.; GLASS, D.J. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science.** 2001; 294: 1704–1708.

BOLLETER, W.T.; BUSHMAN, C.J.; TIDWELL, P.W. Spectrophotometric determination of ammonia as indophenol. **Analytical Chemistry.** 1961; 33: p.592-594.

BOATRIGHT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. **Curr. Opin. Cell Biol.** 2003; 15: 725–731.

CIECHANOVER, A.; HELLER, H.; ELIAS, S.; HAAS, A.L.; HERSHKO, A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1980; 77:1365-1368.

DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. **J. Sci. Food Agriculture.** 2000; 80: 1744–1756.

DOUILLARD, A.; GALBES, O.; BEGUE, G.; ROSSANO, B.; LEVIN, J.; VERNUS, B.; BONNIEU, A.; CANDAU, R.; PY, G. Calpastatin overexpression in the skeletal muscle of mice prevents clenbuterol-induced muscle hypertrophy and phenotypic shift. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 2012; 39(4):364-72.

DREYER, H.C.; VOLPI, E. Role of Protein and Amino Acids in the Pathophysiology and Treatment of Sarcopenia. **J. Am. Coll. Nutr.** 2005; 24(2): 140S–145S.

DU, J.; WANG, X.; MIERELES, C.; BAILEY, J.L.; DEBIGARE, R.; ZHENG, B.; PRICE, S.R.; MITCH, W.E. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. **J. Clin. Invest.** 2004; 113(1):115-23.

EVANS, W.J. Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. **Am. J. Clin. Nutr.** 2010; 91(suppl): 1123S–7S.

FUJIWARA, H.; HOSOKAWA, M.; ZHOU, X.; FUJIMOTO, S.; FUKUDA, K.; TOYODA, K.; NISHI, Y.; FUJITA, Y.; YAMADA, K.; YAMADA, Y.; SEINO, Y.;

INAGAKI, N. Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes.

Diabetes Res. Clin. Pract. 2008; 80(2): 185-91.

GOLL, D.E.; NETI, G.; MARES, S.W.; THOMPSON, V.F. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. **J. Anim. Sci.** 2008. 86(14 Suppl): E19-35.

GOMES, M.D.; LECKER, S.H.; JAGOE, R.T.; NAVON, A.; GOLDBERG, A.L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 2001; 98: 14440–14445.

GUARIGUATA, L.; WHITING, D.R.; HAMBLETON, I.; BEAGLEY, J.; LINNENKAMP, U.; SHAW, J.E. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Res. Clin. Pract.** 2014; 103(2):137-49.

GUTIERRES, V.O.; PINHEIRO, C.M.; ASSIS, R.P.; VENDRAMINI, R.C.; PEPATO, M.T.; BRUNETTI, I.L. Curcumin supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes. **Br. J. Nutr.** 2012; 108(3): 440-8.

GUTIERRES, V.O.; CAMPOS, M.L.; ARCARO, C.A.; ASSIS, R.P.; BALDAN-CIMATTI, H.M.; PECCININI, R.G.; PAULA-GOMES, S.; KETTELHUT, I.C.; BAVIERA, A.M.; BRUNETTI, I.L. Curcumin Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evidences in Streptozotocin-Diabetic Rats Support the Antidiabetic Activity to Be via Metabolite(s). **J. Evid. Based. Complementary Altern. Med.** 2015; 1-13.

HAAN, C.; BEHRMANN, I. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. **J. Immunol. Methods.** 2007; 10; 318(1-2): 11-9.

KASTEREN, S.I.; OVERKLEEF, H.S. Endo-lysosomal proteases in antigen presentation. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 2014; 23: 8-15.

KIM, J.H.; PARK, J.M.; KIM, E.K.; LEE, J.O.; LEE, S.K.; JUNG, J.H.; YOU, G.Y.; PARK, S.H.; SUH, P.G.; KIM, H.S. Curcumin stimulates glucose uptake through AMPK-p38 MAPK pathways in L6 myotube cells. **J. Cell. Physiol.** 2010; 223(3): 771-8.

KRAUSE, M.P.; RIDDELL, M.C.; HAWKE, T.J. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. **Pediatr. Diabetes.** 2011; 12: 345–364.

KLAUDE, M.; FREDRIKSSON, K.; TJÄDER, I.; HAMMARQVIST, F.; AHLMAN, B.; ROOYACKERS, O.; WERNERMAN, J. Proteasome proteolytic activity in skeletal muscle is increased in patients with sepsis. **Clin. Sci. (Lond).** 2007; 112(9):499-506.

LECKER, S.H.; SOLOMON, V.; MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **J. Nutr.** 1999; 129: 227S–237S.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** 1951; 193(1): p.265-75.

MADONNA, R.; DE CATERINA, R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part I: pathways of vascular disease in diabetes. **Vascul. Pharmacol.** 2011; 54(3-6): 68-74.

MASON, S.; WADLEY, G.D. Skeletal muscle reactive oxygen species: A target of good cop/bad cop for exercise and disease. **Redox Rep.** 2014; 19(3): 97-106.

MENG, B.; LI, J.; CAO, H. Antioxidant and antiinflammatory activities of curcumin on diabetes mellitus and its complications. **Curr. Pharm. Des.** 2013; 19(11): 2101-13.

MERFORTH, S.; OSMERS, A.; DAHLMANN, B. Alterations of proteasome activities in skeletal muscle tissue of diabetic rats. **Mol. Biol. Rep.** 1999; 26(1-2):83-7.

MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. **Cell.** 2011; 147: 728-41.

MORLEY, J.E.; BAUMGARTNER, R.N.; ROUBENOFF, R. et al. Sarcopenia. **J. Lab. Clin. Med.** 2001; 137: 231-43.

MUTHNY, T.; KOVARIK, M.; SISPERA, L.; TILSER, I.; HOLECEK, M. Protein metabolism in slow- and fast-twitch skeletal muscle during turpentine-induced inflammation. **Int. J. Exp. Pathol.** 2008; 89(1): 64-71.

NA, L.X.; ZHANG, Y.L.; LI, Y.; LIU, L.Y.; LI, R.; KONG, T.; SUN, C.H. Curcumin improves insulin resistance in skeletal muscle of rats. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.** 2011; 21(7): 526-533.

ONO, T.; TAKADA, S.; KINUGAWA S.; HIROYUKI, T. Curcumin ameliorates skeletal muscle atrophy in type 1 diabetic mice by inhibiting protein ubiquitination. **Exp. Physiol.** 2015; 100.9: 1052–1063

PARK, S.W.; GOODPASTER, B.H.; STROTMEYER, E.S. et al. Accelerated Loss of Skeletal Muscle Strength in Older Adults With Type 2 Diabetes. The Health, Aging, and Body Composition Study. **Diabetes Care.** 2007; 30:1507–1512.

PARK, S.W.; GOODPASTER, B.H.; LEE, J.S. et al. Excessive Loss of Skeletal Muscle Mass in Older Adults With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care.** 2009; 32:1993–1997.

PEPATO, M.T.; MIGLIORINI, R.H.; GOLDBERG, A.L.; KETTELHUT, I.C. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. **Am J Physiol.** 1996; 271(2 Pt 1): E340-7.

POYLIN, V.; FAREED, M.U.; O'NEAL, P.; ALAMDARI, N.; REILLY, N.; MENCONI, M.; HASSELGREN, P. The NF- κ B Inhibitor Curcumin Blocks Sepsis-Induced Muscle Proteolysis. **Mediators Inflamm.** 2008; 2008: 1-13.

POWERS, S.K.; KAVAZIS, A.N.; DeRUISSEAU, K.C. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 2005; 288: R337–R344.

RESKE-NIELSEN, E.; HARMSEN, A.; VORRE, P. Ultrastructure of muscle biopsies in recent, short-term and long-term juvenile diabetes. **Acta. Neurol. Scand.** 1977; 55: 345–362.

SCOTT, W.; STEVENS, J.; BINDER-MACLEOD, S.A. Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. **Phys. Ther.** 2001; 81(11): 1810-6.

SHAO, W.; YU, Z.; CHIANG, Y.; YANG, Y.; CHAI, T.; FOLTZ, W.; LU, H.; FANTUS, I.G.; JIN, T. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. **PLoS One.** 2012; 7(1): e28784.

SIQUEIRA JT. Investigação do mecanismo da ação antidiabética do extrato etanólico das flores de *Combretum lanceolatum* Pohl. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Mato Grosso, 2012, 85pp.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015. São Paulo: AC Farmacêutica, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. São 12 milhões de diabéticos no Brasil.

Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/ultimas/sao-12-milhoes-de-diabeticos-no-brasil>. Acesso em: 6 de Outubro de 2015.

SOLOMON, V.; GOLDBERG, A.L. Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. **J. Biol. Chem.** 1996; 271: 26690-26697.

STITT, T.N.; DRUJAN, D.; CLARKE, B.A.; PANARO, F.; TIMOFEYVA, Y.; KLINE, W.O.; GONZALEZ, M.; YANCOPOULOS, G.D.; GLASS, D.J. The IGF-1/PI3K/AKT pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FoxO transcription factors. **Mol. Cell.** 2004; 14: 395-403.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 1979; 76(9): 4350-4354.

TRINDER P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **J. Clin. Pathol.** 1969; 22(2):246.

WANG, D.; PENG, Z.; REN, G.; WANG, G. The different roles of selective autophagic protein degradation in mammalian cells. **Oncotarget.** 2015; 35(6): 37098-7116.

WIDRICK, J.J.; ROMATOWSKI, J.G.; NOREMBERG, K.M.; KNUTH, S.T.; BAIN, J.L.W.; RILEY, D.A.; TRAPPE, S.W.; TRAPPE, T.A.; COSTILL, D.L.; FITTS, R.H. Functional properties of slow and fast gastrocnemius muscle fibers after a 17-day spaceflight. **J. Appl. Physiol.** 2001; 90(6): 2203-2211.

WORKENEH, B.; BAJAJ, M. The regulation of muscle protein turnover in diabetes. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 2013; 45:2239–2244.

TU, Y; CHEN, C; PAN, J; XU, J; ZHOU, Z; WANG, C. The Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.** 2012; 5(8): 726-738.

YANG, H.; LIU, J.; DOU, Q.P. Targeting Tumor Proteasome with Traditional Chinese Medicine. **Curr. Drug. Discov. Technol.** 2010; 7(1): 46–53.

YU, W.; WU, J.; CAI, F.; XIANG, J.; ZHA, W.; FAN, D.; GUO, S.; MING, Z.; LIU, C. Curcumin alleviates diabetic cardiomyopathy in experimental diabetic rats. **PLoS One.** 2012; 7(12): e52013.

Anexo I – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da FCFAr

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 07/2012

Pesquisador: VÂNIA ORTEGA GUTIERRES

Orientador: Prof.Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Projeto: Avaliação do tratamento com Curcumina e sua associação com insulina, em animais diabéticos.

Parecer nº 37/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 23 de julho de 2012, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Avaliação do tratamento com Curcumina e sua associação com insulina, em animais diabéticos", apresentado pela pós-graduanda Vânia Ortega Gutierres, sob orientação do Prof.Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, do Departamento de Análises Clínicas, desta Faculdade, esta estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em NOVEMBRO 2012, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 24 de julho de 2012.

Prof^aDr^a ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
Vice-Coordenadora da CEUA

Dados finais

Araraquara, 11 de Janeiro de 2016

Juliana Oriel de Oliveira

De acordo,

Profa. Dra. Amanda Martins Baviera