

Posible Efecto Protector del Xanthohumol sobre la Respuesta Inflamatoria Hepática asociada al Envejecimiento

Possible Protective Effect of Xanthohumol on Liver Inflammatory Response associated to Aging

Alberto Alonso, Aída Izquierdo y César Montero

Tutores:

Elena Vara y Sergio D. Paredes

Universidad Complutense de Madrid

Resumen

El envejecimiento se asocia con una desregulación de los sistemas biológicos que conducen a un aumento del estrés oxidativo, la inflamación, apoptosis... El xanthohumol (XN) es la principal calcona prenilada presente en el lúpulo (*Humulus lupulus* L.). En este trabajo se investigó el posible efecto protector del XN sobre la respuesta inflamatoria hepática secundaria al envejecimiento. Para ello, se utilizaron ratones (SAMP8), jóvenes y viejos, de 2 y 10 meses de edad, respectivamente. Los animales se dividieron en 4 grupos: jóvenes no tratados, viejos no tratados, viejos tratados con 1 mg/kg/día de XN y viejos tratados con 5 mg/kg/día de XN. Como control se usaron ratones SAMR1. Tras 30 días de tratamiento, los animales se sacrificaron, los hígados se almacenaron a -80°C y se midió la expresión de ARNm (eNOS, HO-1, IL-1 β , NF- κ B, y TNF- α) y de proteínas (eNOS, iNOS, TNF- α , IL1 β , NF- κ B e IL10) por RT-PCR y Western blotting. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA seguido de la prueba t de Student con significancia estadística en $p < 0,05$. Se observó una mayor expresión de ARNm y proteínas de marcadores inflamatorios en ratones viejos SAMP8 comparados con los observados en ratones SAMP8 jóvenes y SAMR1. Este efecto fue significativamente reducido por XN ($p < 0,05$). En la mayoría de los casos, este efecto fue dependiente de la dosis. En conclusión, se demostró que el tratamiento con XN modula la inflamación y el estrés oxidativo en hígados envejecidos, lo que sugiere su posible efecto protector sobre la disfunción hepática secundaria a la edad.

Palabras clave: xanthohumol, hígado, envejecimiento, inflamación.

Abstract

Aging is associated with a deregulation of biological systems that lead to an increase in oxidative stress, inflammation, and apoptosis, among other several effects. Xanthohumol (XN) is the main prenylated chalcone present in hops (*Humulus lupulus* L.). In recent years, it has been shown its antioxidant, anti-inflammatory and chemopreventive properties. In this research work, the possible protective activity of XN on liver dysfunction was addressed. In order to do so, male senescence accelerated mice (SAMP8) were used. Young and old animals, aged 2 and 10 months respectively, were divided into 4 groups: untreated young, untreated old, old treated with 1 mg / kg / day XN, and old treated with 5 mg/kg/day XN. SAMR1 mice were used as the control animals. Male senescence accelerated resistant mice (SAMR1) were used as controls. After 30 days of treatment, animals were sacrificed and livers were collected. mRNA (eNOS, HO-1, IL-1 β , NF- κ B, and TNF- α) and protein expression (eNOS, iNOS, TNF- α , IL1 β , NF- κ B, and IL-10) were measured by RT-PCR and Western blotting, respectively. Mean values were analyzed using ANOVA followed by Student's t-test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. A significant increase in mRNA and protein levels of oxidative stress and pro-inflammatory markers was shown in old untreated SAMP8 mice compared with SAMP8 young group and SAMR1 mice. In general, age-related oxidative stress and inflammation were significantly decreased ($p < 0.05$) after XN treatment. In most cases, this effect was dose-dependent. In conclusion, XN was shown to modulate inflammation and oxidative stress in aged livers, exerting a possible protective effect on hepatic dysfunction.

Keywords: xanthohumol, liver, aging, inflammation.

Introducción

El envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo de enfermedades crónicas. La senescencia celular es un mecanismo que limita el potencial proliferativo de células dañadas y, además, también conduce a inflamación, fibrosis y otros trastornos importantes.

El hígado está totalmente involucrado en este proceso ya que el metabolismo energético y las vías de desintoxicación se dañan. El envejecimiento hepático conduce a alteraciones estructurales y funcionales: el hígado sufre una reducción significativa del 30% en el volumen con el aumento de la edad. Del mismo modo, el flujo sanguíneo hepático se reduce un 35%, lo que puede explicar la disfunción de las células endoteliales hepáticas. Además diferentes estudios han demostrado una disminución significativa en el número de mitocondrias en los sujetos de edad avanzada y una disminución en la expresión de los genes implicados en la defensa frente al estrés oxidativo (Preedy V, 2014). Los flavonoides son un grupo diverso de fitonutrientes que se encuentran en las frutas y verduras. En términos de envejecimiento, los flavonoides son de particular interés ya que pueden interactuar con las vías de señalización celular modulándolas. El xanthohumol (XN) es un flavonoide prenilado derivado del lúpulo, que ha sido identificado como un regulador de varias vías metabólicas (Pinto C, Cestero K, Rodríguez-Galdón B y Macías P, 2014). Se ha sugerido que el XN puede tener efectos antioxidantes y/o antiinflamatorios (Zhang B, Chu W, Wei P, Liu Y y Wei T, 2015). En este aspecto, estudios recientes han demostrado que el XN contribuye a la prevención del daño oxidativo reduciendo no sólo las ROS sino también la producción de óxido nítrico (NO). También exhibe propiedades antiinflamatorias por la inhibición de la actividad ciclooxigenasa (Ungvari Z, Csiszar A y Kaley G, 2004).

El objetivo de este trabajo fue evaluar los posibles efectos del XN en la respuesta inflamatoria al envejecimiento hepático en un modelo experimental consistente en ratones macho SAMP8.

Material y métodos

Se utilizaron ratones (SAMP8), jóvenes y viejos, de 2 y 10 meses de edad, respectivamente. Los animales se dividieron en 4 grupos: jóvenes no tratados, viejos no tratados, viejos tratados con 1 mg / kg / día de XN y viejos tratados con 5mg / kg / día de XN. Como animales control se usaron ratones SAMR1. Tras 30 días de tratamiento, los animales se sacrificaron, los hígados se almacenaron a -80° C y la expresión de ARNm (eNOS, HO-1, IL-1 β , NF- κ B, y TNF- α) y de proteínas (eNOS, iNOS, TNF- α , IL1 β , NF- κ B e IL-10) se midieron por RT-PCR y Western blotting, respectivamente. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA seguido de la prueba t de Student y la significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

Resultados

El envejecimiento aumentó la expresión de TNF- α e IL1 β , tanto en hígado de ratones SAMP8 como SAMR1. Este efecto fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los ratones SAMP8. El tratamiento con XN redujo significativamente la expresión de TNF- α , siendo más notable este efecto a la dosis de 5 mg / kg / día. La expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10 fue similar en todos los grupos.

La expresión proteica de NF- κ B fue similar en todos los grupos. Sin embargo, la expresión de ARNm de NF- κ B fue mayor en los ratones SAMP8 jóvenes comparado con los valores observados en el grupo SAMR1 joven ($p < 0,05$). El envejecimiento aumentó la expresión de ARNm de NF- κ B en los SAMR1 pero no en SAMP8, cuyos niveles ya estaban elevados en el grupo de jóvenes. El XN solo tuvo efecto significativo a la dosis más alta de 5 mg / kg / día ($p < 0,05$).

El envejecimiento indujo efectos contrarios sobre la expresión de eNOS e iNOS. Mientras que la expresión de iNOS aumentó en los ratones SAMP8 viejos en comparación con el grupo SAMP8 joven y con el grupo control SAMR1, la expresión de eNOS se redujo con la edad. La administración de XN bloqueó este efecto del envejecimiento.

La expresión proteica de hemo-oxigenasa 1 (HO1), fue mayor en los ratones SAMP8 comparados con los SAMR1. El envejecimiento aumentó la expresión de HO1 en los SAMR1 pero no en los SAMP8, cuyos niveles ya estaban elevados en el grupo de jóvenes. El XN solo tuvo efecto significativo a la dosis más alta de 5 mg / kg / día ($p < 0,05$).

Discusión

En este trabajo el envejecimiento fue responsable de un aumento significativo en la expresión hepática de diferentes mediadores implicados en la cascada inflamatoria. Para determinar si el XN posee un efecto antiinflamatorio sobre la disfunción hepática, se ha determinado el efecto de la administración de XN sobre la expresión de estos mediadores.

El XN puede inhibir la respuesta inflamatoria mediante la atenuación de la liberación de NO, o la regulación positiva de iNOS, IL-1 β y TNF- α (Lee et al., 2011). De acuerdo con esto, en este trabajo el XN disminuyó la expresión de IL-1 β y TNF- α , lo que confirmaría su efecto antiinflamatorio. Este efecto podría estar mediado por la inhibición de la expresión de NF- κ B observada en este estudio.

Para investigar un posible efecto protector del XN frente al estrés oxidativo celular, hemos determinado eNOS, iNOS y HO-1 como mediadores de este proceso. La función vascular depende principalmente del equilibrio entre la síntesis y la degradación del NO, que depende de la actividad normal de NOS. Mientras que el NO producido por eNOS es el resultado de una respuesta metabólica normal y regula el flujo sanguíneo y las interacciones de células sanguíneas, la activación de iNOS puede tener efectos perjudiciales para la

función hepática (Yong WK, Malek A y Nurestri S, 2015). En este trabajo los niveles de ARNm de eNOS no se modificaron con la edad a pesar de que la expresión de proteínas se redujo con el envejecimiento. Por el contrario, la expresión proteica de iNOS aumentó con el envejecimiento. Estos efectos fueron revertidos por el XN, lo que sugiere un posible efecto protector de esta molécula en la disfunción hepática secundaria al envejecimiento.

En conclusión, el envejecimiento indujo un incremento significativo en el estado pro-oxidativo y pro-inflamatorio hepático. El XN fue capaz de revertir estos efectos disminuyendo significativamente la expresión de marcadores inflamatorios y oxidativos. Esta molécula podría contribuir a la modulación de los cambios relacionados con la edad en el hígado y, por tanto, actuar como un compuesto protector sobre la disfunción hepática.

Referencias

- Lee, I.-S, Lim, J., Gal, J., Kang, J. C., Kim, H. J., Kang, B. Y., & Choi, H. J. (2011). Anti-inflammatory activity of xanthohumol involves heme oxygenase-1 induction via NRF2-ARE signaling in microglial BV2 cells. *Neurochemistry International*, 58, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.11.008>
- Pinto, C., Cestero, J. J., Rodríguez-Galdón, B., & Macías, P. (2014). Xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus L.*) protects rat tissues against oxidative damage after acute ethanol administration. *Toxicology Reports*, 1, 726-733. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.09.004>
- Preedy, V. R. (2014). *Aging* (pp. 39-47). Oxford, UK: Academic Press.
- Ungvari, Z., Csiszar, A., & Kaley, G. (2004). Vascular inflammation in aging. *Herz*, 29(8), 733-740. <https://doi.org/10.1007/s00059-004-2625-x>
- Yong, W. K., & Malek, S. N. A. (2015). Xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis in Ca Ski human cervical cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, ID 921306. <https://doi.org/10.1007/s00059-004-2625-x>
- Zhang, B., Chu, W., Wei, P., Liu, Y., & Wei, T. (2015). Xanthohumol induces generation of reactive oxygen species and triggers apoptosis through inhibition of mitochondrial electron transfer chain complex I. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 486-497. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.09.021>