

## **El Tratamiento con Xanthohumol reduce la Apoptosis en el Hígado de Ratones con Senescencia Acelerada (SAMP8)**

### **Treatment with Xanthohumol reduces Apoptosis in Mice's Liver with Accelerated Senescence (SAMP8)**

Bryan Hyacinthe, Paula Corral y Jorge Guzmán

Tutores:

Elena Vara y Sergio D. Paredes

Universidad Complutense de Madrid

#### *Resumen*

El envejecimiento se asocia con una desregulación de los sistemas biológicos que conduce a un aumento del estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis, entre otros efectos. Se ha sugerido que el xanthohumol (XN), un flavonoide presente en el lúpulo, podría proteger frente al envejecimiento y que este efecto podría estar mediado por modificaciones en el grado de apoptosis. En este trabajo, se investigó el posible efecto protector del XN sobre la apoptosis 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. Se usaron ratones SAMR1 como animales control. Tras 30 días de tratamiento, los animales se sacrificaron y los hígados se almacenaron a -80° C y se determinó la expresión de ARNm (AIF, BAD, BAX, Bcl-2, PCNA, SIRT1) y proteínas (BAD, BAX, AIF, caspase-3) por RT-PCR y Western blotting, respectivamente. Los resultados se analizaron usando ANOVA seguido de la prueba t de Student. La significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ . El envejecimiento indujo un aumento significativo de los niveles de marcadores pro-apoptóticos en ratones SAMP8 no tratados. Este efecto fue bloqueado, de forma dosis dependiente, por la administración de XN.

*Palabras clave: envejecimiento, apoptosis, hígado, xanthohumol.*

#### *Abstract*

Aging is associated with deregulation of biological systems leading to increased oxidative stress, inflammation and apoptosis, among other effects. It has been suggested that xanthohumol (XN), a flavonoid present in hops, could protect against aging and that this effect could be mediated by changes in the degree of apoptosis. In this work, we investigated a possible protective effect of XN on hepatic apoptosis secondary to aging. For this, mice (SAMP8), young and old, of 2 and 10 months of age, respectively, were used. The animals were divided into 4 groups: young untreated, old untreated, old treated with XN 1 mg / kg / day and old treated with XN 5 mg / kg / day. SAMR1 mice were used as control animals. After 30 days of treatment, animals were sacrificed and livers were stored at -80° C and expression of mRNA (AIF, BAD, BAX, Bcl-2, PCNA, SIRT1) and proteins (BAD, BAX, AIF, caspase-3) was determined by RT-PCR and Western blotting, respectively. The results were analyzed using ANOVA followed by Student's t-test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Aging induced a significant increase in the levels of pro-apoptotic markers in untreated SAMP8 mice. This effect was reduced in a dose-dependent manner by the administration of XN.

*Keywords: Aging, Apoptosis, Liver, Xanthohumol.*

## Introducción

El envejecimiento es una condición fisiológica universal que induce una serie de cambios en las células y tejidos que disminuyen la capacidad de mantenimiento de la homeostasis y aumentan la vulnerabilidad del organismo incrementando el riesgo de enfermedad y muerte (Sanz, 2008). El hígado parece jugar un papel importante en este proceso ya que el metabolismo energético y las vías de desintoxicación se dañan. Las muertes relacionadas con el hígado también aumentan con la edad a medida que aumenta la susceptibilidad a la enfermedad. La senescencia celular en los hepatocitos se ha demostrado en varios trastornos parenquimatosos crónicos, entre los que se incluyen las hepatitis víricas crónicas B y C, la enfermedad hepática relacionada con el alcohol y la enfermedad hepática grasa no relacionada con el alcohol. Diversas investigaciones han demostrado que el xanthohumol (XN), uno de los principales flavonoides que se encuentran en los extractos del lúpulo, tiene un efecto protector frente a diferentes patologías incluyendo patologías inflamatorias (Díaz y Marcos, 2008; González-Muñoz, Peña y Meseguer, 2008; Romeo, González-Gross, Wärnberg, Díaz y Marcos, 2008) y que este efecto podría estar mediado por modificaciones en el grado de apoptosis. El objetivo de este trabajo fue investigar el posible efecto protector del XN sobre la apoptosis hepática secundaria al envejecimiento.

## 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 5 mg / kg / día de XN. Se usaron ratones SAMR1 como animales control. Tras 30 días de tratamiento, los animales se sacrificaron y los hígados se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  y la expresión de ARNm (AIF, BAD, BAX, Bcl-2, PCNA, SIRT1) y proteínas (BAD, BAX, AIF, caspase-3) se determinó por RT-PCR y Western blotting, respectivamente. Los resultados se analizaron usando ANOVA seguido de la prueba t de Student. La significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

## Resultados

Los ratones SAMP8 viejos mostraron niveles más altos de ARNm de BAD y BAX en comparación con ratones SAMP8 jóvenes y ratones SAMR1 jóvenes y viejos ( $p < 0,05$ ). Aunque ambas dosis de XN fueron capaces de disminuir la expresión de BAX, en el caso del ARNm de BAD solo se observó un efecto significativo a la dosis de 5 mg / kg / día. De forma similar, tanto el ARNm como los nive-

les de proteína del factor inductor de apoptosis AIF fueron mayores en ratones SAMP8 viejos que en ratones SAMP8 jóvenes y ratones SAMR1 jóvenes y viejos ( $p < 0,05$ ). Si bien ambas dosis de XN fueron capaces de disminuir los niveles de ARNm de AIF, sólo la dosis de 5 mg / kg / día disminuyó significativamente el aumento de la expresión proteica ( $p < 0,05$ ). Además, el envejecimiento también aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) los niveles de caspasa 3, los cuales disminuyeron significativamente con el tratamiento de XN, no siendo este efecto dependiente de la dosis. No se observaron cambios en la expresión de Bcl-2. Por último, no se encontró ningún efecto relacionado con la edad en los niveles de los marcadores de proliferación PCNA y SIRT1. El XN tampoco modificó la expresión de estos marcadores.

## Discusión

La apoptosis juega un papel importante en el proceso de envejecimiento. La tasa de apoptosis se comporta en la mayoría de los tipos de envejecimiento de las poblaciones celulares y los órganos como un mecanismo de protección contra la acumulación de células defectuosas. Sin embargo, la sobre-activación de la vía de la apoptosis parece estar involucrada en la mayoría de las enfermedades asociadas con la edad. Aunque la apoptosis ha sido reconocida como uno de los principales procesos para evitar que las células cancerosas crezcan en sujetos jóvenes, se cree que su aumento en el envejecimiento está relacionado con enfermedades como cirrosis o disfunción hepática. En este estudio, se observó que la expresión de la proteína caspasa 3 aumentaba con el envejecimiento lo que indica una activación de caspasas efectoras. El tratamiento con XN, redujo su expresión a los niveles observados en ratones jóvenes, sugiriendo que el efecto protector del XN podría estar mediado, al menos en parte, por una inhibición de la apoptosis.

No se observaron cambios importantes en los niveles de ARNm de BAX con el envejecimiento o el tratamiento con XN. Sin embargo, la expresión de la proteína BAX se incrementó en animales viejos y el XN bloqueó este efecto. Por otra parte, los niveles de ARNm de BAD aumentaron con el envejecimiento y el tratamiento con XN, a una dosis de 5 mg / kg / día, fue capaz de reducir estos valores. En cuanto a Bcl-2, proteína anti-apoptótica, se podría esperar una reducción en su expresión; sin embargo, en este trabajo no se observaron cambios, lo que indica que el desequilibrio pro/anti-apoptótico es debido al aumento de los marcadores pro-apoptóticos.

AIF es una flavoproteína que normalmente se encuentra en la mitocondria. Después de los estímulos de muerte, AIF se transloca al citosol y al núcleo donde participa en la inducción de la apoptosis. La condensación de la cromatina nuclear y la fragmentación del ADN están entre sus principales funciones (Daugas et al., 2000). En este trabajo, he-

mos observado un aumento de tanto la transcripción como la traducción de AIF. De nuevo el XN redujo este efecto de la edad.

Finalmente, se abordó la posible relación entre el XN, la proliferación y la supervivencia. PCNA juega un papel importante en el metabolismo de ácidos nucleicos.

Esta proteína es esencial para la replicación del ADN. También está implicada en la reparación de la escisión del ADN, así como en el ensamblaje de la cromatina (Kelman, 1997). Cuando se analizó la expresión de PCNA, no se observaron diferencias significativas entre los grupos, sugiriendo que el ciclo celular podría no estar afectado.

En cuanto a SIRT1, se ha descrito que tiene un gran número de funciones. Aparte de desacetilar histonas, lo que confiere resistencia al estrés celular, actúa como un prolongador de vida por la disminución de los niveles de ROS (Guarente, 2007). A pesar de ello, en nuestro estudio no se observó ningún cambio significativo ni con el envejecimiento ni con el tratamiento con XN en los niveles de SIRT1.

### Conclusiones

El envejecimiento indujo un aumento significativo de los niveles de marcadores pro-apoptóticos en ratones SAMP8 no tratados. Este efecto fue bloqueado, de forma dosis dependiente por la administración de XN. Esto sugiere un efecto protector del XN frente a los cambios relacionados con la edad en el hígado y por lo tanto podría actuar

como un compuesto protector en las alteraciones hepáticas secundarias al envejecimiento.

### Referencias

- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S. A., Zamzami, N., & Kroemer, G. (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): A ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Letters*, 476(3), 118-123. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01731-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01731-2)
- González-Muñoz, M. J., Peña, A., Meseguer, I. (2008). Role of beer as a possible protective factor in preventing Alzheimer's disease. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.036>
- Guarente, L. (2007). Sirtuins in aging and disease. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 72(1), 483-488. <http://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.024>
- Kelman, Z. (1997). PCNA: Structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14(6), 629-640. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1200886>
- Romeo, J., González-Gross, M., Wärnberg, J., Díaz, L. E., & Marcos, A. (2008). Effects of moderate beer consumption on blood lipid profile in healthy Spanish adults. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(5), 365-372. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2007.03.007>
- Sanz, A., & Stefanatos, R. K. A. (2008). The Mitochondrial Free Radical Theory of Aging: A critical view. *Current Aging Science*, 1(1), 10-21. <http://doi.org/10.2174/1874609810801010010>