

Efecto Protector del Xanthohumol frente al Daño Cerebral relacionado con la Edad

Protective effect of Xanthohumol against Age-related Brain Damage

Guzmán López de Hontanar, Pedro Muñoz y Fernando Huelín

Tutoras:

Elena Vara y Lisa Rancan

Universidad Complutense de Madrid

Resumen

El xanthohumol (XN) es la principal calcona prenilada presente en el lúpulo (*Humulus lupulus* L.). En los últimos años se han puesto de manifiesto sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y quimiopreventivas especialmente en el hígado, y sobre determinados marcadores del síndrome metabólico pero sus efectos en el cerebro envejecido no se habían abordado hasta el momento. En este trabajo, se evaluó la posible actividad neuroprotectora del XN frente al daño cerebral secundario al envejecimiento en ratones macho de senescencia acelerada (SAMP8). Los animales se dividieron en 4 grupos: Jóvenes, viejos no tratados y viejos tratados con 1 mg/kg/día o 5 mg/kg/día de xanthohumol. Como control, se usaron ratones resistentes a la senescencia acelerada (SAMR1). Tras tratarlos 30 días, los animales fueron sacrificados y sus cerebros extraídos e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido. Se evaluó la expresión de mRNA de GFAP, TNF- α , IL-1 β , AIF, BAD, BAX, XIAP, NAIP y Bcl-2 mediante RT-PCR. La expresión proteica de GFAP, TNF- α , IL-1 β y BDNF, sinaptofisina y sinapsina se cuantificó mediante Western-blotting. Los datos se analizaron usando ANOVA, seguido de la t de Student. Se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de los marcadores de estrés oxidativo, pro-inflamatorios y pro-apoptóticos en los ratones SAMP8 viejos no tratados comparados con los jóvenes y los SAMR1. En general, el estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) con ambas dosis de xanthohumol. En conclusión, el XN moduló el estrés oxidativo, la inflamación y apoptosis del cerebro envejecido, consiguiendo un efecto protector sobre el daño inducido por el envejecimiento.

Palabras clave: envejecimiento, apoptosis, inflamación, cerebro, xanthohumol.

Abstract

Xanthohumol 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, especially in the liver, and its effects on certain markers of metabolic syndrome, including weight and level of preprandial glycemia, but its role in the aging brain had not been addressed so far. Therefore, in this investigation the possible neuroprotective activity of xanthohumol against brain damage secondary to aging was evaluated in male senescence accelerated mice (SAMP8). Animals were divided into 4 groups: Untreated young mice, untreated old mice and old mice treated either with 1 mg/kg/day or 5 mg/kg/day xanthohumol. Young and old senescence accelerated resistant mice (SAMR1) were used as controls. After 30 days of treatment, animals were sacrificed and their brains were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. mRNA (GFAP, TNF- α , IL-1 β , AIF, BAD, BAX, XIAP, NAIP, and Bcl-2) and protein (GFAP, TNF- α , IL-1 β , BDNF, synaptophysin and synapsin) expressions were measured by RT-PCR and Western blotting, respectively. Mean values were analysed using ANOVA. A significant increase ($p < 0.05$) in mRNA and protein levels of oxidative stress and pro-inflammatory markers as well as pro-apoptotic parameters was shown in old untreated SAMP8 mice compared to young and SAMR1 mice. In general, age-related oxidative stress, inflammation, and apoptosis were significantly decreased ($p < 0.05$) with any concentration of XN. In conclusion, XN treatment modulated the inflammation and apoptosis of aged brains, exerting a protective effect on damage induced by aging.

Keywords: aging, apoptosis, inflammation, brain, xanthohumol.

Introducción

El envejecimiento es un estado fisiológico universal en el que ocurre una disminución progresiva de las funciones orgánicas, lo que se acompaña del consecuente desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad. Numerosos estudios han asociado el envejecimiento con la desregulación de los sistemas biológicos que se produce en parte a través de daños que se acumulan con el tiempo. Entre tales daños se encuentran las alteraciones funcionales de las biomoléculas atribuibles a los radicales libres. La inflamación crónica conlleva un continuo estrés oxidativo, daño celular y pérdida de función, todos ellos presentes en el proceso de envejecimiento, en el cual se observa también un descenso en la capacidad antioxidante.

Actualmente existen indicios de que los flavonoides resveratrol y XN presentes, respectivamente, en el vino y la cerveza serían responsables del efecto protector observado en el organismo tras el consumo moderado de ambas bebidas fermentadas. En el caso del resveratrol, se conoce desde hace tiempo su acción como molécula anti-envejecimiento, además de sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiapoptóticos. Sin embargo, la información disponible sobre los posibles efectos del XN es escasa. En los últimos años se han puesto de manifiesto las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias del XN en hígado (Lupinacci et al., 2009), órganos reproductores (Colgate et al., 2007), endometrio (Rudzitis-Auth, Körbel, Scheuer, Menger y Laschke, 2012) y en el síndrome metabólico (Legette et al., 2013). En el cerebro, no obstante, con la excepción de algunas investigaciones aisladas en donde se han observado efectos positivos ejercidos por esta molécula (Yen et al., 2012; Zajc, Filipič y Lah, 2012), no existen prácticamente datos sobre los posibles efectos que el XN podría ejercer sobre este órgano. La presente investigación ha pretendido evaluar los efectos del XN sobre el cerebro en un modelo experimental consistente en ratones macho con senescencia acelerada (SAMP8).

Material y métodos

Se han utilizado ratones macho con senescencia acelerada (SAMP8). Los animales se dividieron en 4 grupos: Jóvenes, viejos no tratados y viejos tratados con XN (1 o 5 mg/kg/día). Como control, se usaron ratones resistentes a la senescencia acelerada (SAMR1). Tras tratarlos 30 días, los animales fueron sacrificados y sus cerebros extraídos y congelados en nitrógeno líquido. Se evaluó la expresión de mRNA de GFAP, TNF- α , IL-1 β , AIF, BAD, BAX, XIAP, NAIP y Bcl-2 mediante RT-PCR. La expresión proteica de GFAP, TNF- α , IL-1 β y BDNF, sinaptofisina y sinapsina se cuantificó mediante Western-blotting.

Los datos se han expresado como la media \pm el error estándar de la media del número de determinaciones. Los resultados se analizaron mediante ANOVA para investigar po-

sibles diferencias entre grupos. A continuación se utilizó el test de la t de Student, para comparar pares de medias. Se consideró significativo $p < 0,05$.

Resultados

El envejecimiento aumentó de forma significativa la expresión proteica y de mRNA de GFAP en ambas cepas de ratones y este efecto fue mayor en los ratones SAMP8 ($p < 0,05$) que el observado en ratones SAMR1. Estos cambios fueron asociados a un aumento significativo ($p < 0,05$) de la expresión de proteínas y mRNA de TNF- α e IL-1 β en los ratones viejos, comparados con los valores observados en jóvenes. El tratamiento con XN redujo significativamente estos efectos ($p < 0,05$). El envejecimiento también aumentó la expresión de mRNA de AIF, BAD y BAX ($p < 0,05$) y de nuevo el XN redujo estos efectos. Con respecto a los niveles de XIAP y NAIP, se obtuvieron valores significativamente menores ($p < 0,05$) en los ratones SAMP8 jóvenes con respecto a los SAMR1. Además, el envejecimiento redujo de manera significativa ($p < 0,05$) los niveles de estos marcadores ($p < 0,05$). El XN revirtió este efecto en el caso de NAIP, pero no modificó el efecto del envejecimiento en cuanto a XIAP. Los valores de Bcl-2 fueron similares en todos los grupos. La expresión proteica de BDNF disminuyó de forma significativa ($p < 0,05$) en los ratones SAMP8 viejos comparada con los ratones jóvenes de la misma cepa y este efecto fue bloqueado por el XN.

Finalmente, la expresión proteica de sinaptofisina y sinapsina fue menor ($p < 0,05$) en los ratones SAMP8 jóvenes con respecto a los SAMR1. Además, el envejecimiento redujo ($p < 0,05$) los niveles de estos marcadores. El tratamiento con XN consiguió bloquear dichos efectos.

Discusión

El envejecimiento es un proceso complejo que implica alteraciones cerebrales tanto a nivel estructural como funcional (Hedden y Gabrieli, 2004). Es aceptado que la edad es un factor de riesgo importante de diferentes situaciones patológicas, incluyendo alteraciones de la memoria y alteraciones cognitivas que podrían jugar un papel importante en la transición del envejecimiento normal a un estado claramente patológico como la enfermedad de Alzheimer o demencia senil (Petersen, 2004). Diferentes estudios han sugerido que en estas alteraciones podrían jugar un papel importante los marcadores inflamatorios (Sánchez-Mejía et al., 2008), el estrés oxidativo (Dröge y Schipper, 2007), la apoptosis (Albrecht et al., 2007) y/o una disminución de la plasticidad sináptica (Bishop et al., 2010). El aumento de la expresión de TNF- α e IL-1 β , en el cerebro de los ratones viejos podría indicar que en estos animales hay un estado de neuroinflamación que podría tener efectos perjudiciales

incluyendo la muerte neuronal. Además, hemos observado una reducción de la expresión de BDNF y de sinaptofisina y sinapsina en el cerebro de los ratones viejos, lo que sugiere que tanto la transmisión sináptica como la supervivencia se encuentran alteradas durante la senescencia. En este estudio, también se ha observado que la edad indujo un aumento de los marcadores pro-apoptóticos (BAD, BAX y AIF). Por el contrario, los factores antiapoptóticos disminuyeron o no se modificaron (Bcl-2). Esto indica que la relación entre factores pro- y anti-apoptosis se encuentra alterada, a favor de los primeros en los cerebros de los animales viejos y apoyaría la hipótesis de que el aumento de la apoptosis secundaria a una inflamación crónica podría jugar un papel importante en el daño cerebral secundario al envejecimiento.

El XN inhibió significativamente los niveles de IL-1 β y TNF- α , y redujo el desequilibrio entre factores pro- y anti-apoptóticos observado en el cerebro de ratones viejos. La restauración de este balance entre marcadores pro- y anti-apoptóticos, podría ser importante al reducir el paso a un estado patológico. Además, el XN indujo un aumento de la expresión de BDNF. Estos resultados sugieren que esta molécula podría ser un candidato atractivo para la modulación de la respuesta inflamatoria en el cerebro.

En resumen, el aumento de marcadores proinflamatorios y la alteración del equilibrio entre factores pro- y anti-apoptóticos, a favor de los primeros, podría contribuir a la pérdida de proteínas sinápticas. La administración de XN redujo parcialmente los efectos del envejecimiento. Estos resultados parecen sugerir para el XN un papel como agente nutricional y farmacológico eficaz que puede ser utilizado para mejorar las alteraciones cerebrales secundarias al envejecimiento.

Referencias

- Albrecht, S., Bourdeau, M., Bennett, D., Mufson, E. J., Bhattacharjee, M., & LeBlanc, A. C. (2007). Activation of caspase-6 in aging and mild cognitive impairment. *The American Journal of Pathology*, *170*, 1200-1209. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060974>
- Bishop, N. A., Lu, T., & Yankner, B. A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, *464*, 529-535. <http://doi.org/10.1038/nature08983>
- Colgate, E. C., Miranda, C. L., Stevens, J. F., Bray, T. M., & Ho, E. (2007). Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappa B activation in prostate epithelial cells. *Cancer Letters*, *246*, 201-209. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.02.015>
- Dröge, W., & Schipper, H. M. (2007). Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell*, *6*, 361-370. <http://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00294.x>
- Hedden, T., & Gabrieli, J. D. E. (2004). Insights into the ageing mind: A view from cognitive neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*, 87-96. <http://doi.org/10.1038/nrn1323>
- Legette, L. L., Moreno Luna, A. Y., Reed, R. L., Miranda, C. L., Bobe, G., Proteau, R. R., & Stevens, J. F. (2013). Xanthohumol lowers body weight and fasting plasma glucose in obese male Zucker fa/fa rats. *Phytochemistry*, *91*, 236-241. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.018>
- Lupinacci, E., Meijerink, J., Vincken, J.-P., Gabriele, B., Gruppen, H., & Witkamp, R. F. (2009). Xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) is an efficient inhibitor of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor- α release in LPS-stimulated RAW 264.7 mouse macrophages and U937 human monocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 7274-7281. <http://doi.org/10.1021/jf901244k>
- Petersen, R. C. (2004). Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *Journal of Internal Medicine*, *256*, 183-194. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01388.x>
- Rudzitis-Auth, J., Körbel, C., Scheuer, C., Menger, M. D., Laschke, M. W. (2012). Xanthohumol inhibits growth and vascularization of developing endometriotic lesions. *Human Reproduction*, *27*, 1735-1744. <https://doi.org/10.1093/humrep/des095>
- Sánchez-Mejía, R. O., Newman, J. W., Toh, S., Yu, G.-Q., Zhou, Y., Halabisky, B., ... Mucke, L. (2008). Phospholipase A₂ reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, *11*, 1311-1318. <https://doi.org/10.1038/nn.2213>
- Yen, T.-L., Hsu, C.-K., Lu, W.-J., Hsieh, C.-Y., Hsiao, G., Chou, D.-S., ... Sheu, J.-R. (2012). Neuroprotective effects of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*), in ischemic stroke of rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 1937-1944. <https://doi.org/10.1038/nn.2213>
- Zajc, I., Filipič, M., & Lah, T. T. (2012). Xanthohumol induces different cytotoxicity and apoptotic pathways in malignant and normal astrocytes. *Phytotherapy Research*, *26*, 1709-1713. <https://doi.org/10.1002/ptr.4636>