

Papel protector de los flavonoides de la cerveza frente a las alteraciones hepáticas inducidas por estrés oxidativo: estudio de los mecanismos moleculares implicados

Este trabajo ha sido realizado por el siguiente grupo de investigación:

INVESTIGADORES:

- **Javier González Gallego**

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad de León
Departamento de Fisiología, Universidad de León*

- **Dr. Jesús M. Culebras Fernández**

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad de León
Hospital de León*

- **Dr. José Mataix Verdú**

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada

- **Dra. María Jesús Tuñón González**

Departamento de Fisiología, Universidad de León

- **Dra. Sonia Sánchez Campos**

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad de León





Autores:

González Gallego, J. Culebras Fernández, J. M. Mataix Verdú, J. Tuñón González, M.J. Sánchez Campos, S.

Instituciones participantes

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad de León

Hospital de León

Departamento de Fisiología, Universidad de León

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada

Esponsor

Centro de Información Cerveza y Salud

Dirección para Correspondencia

XXXXX



SUMARIO

1	ANTECEDENTES	6
2	OBJETIVOS	9
3	METODOLOGÍA	10
	3.1. Animales y procedimiento experimental .	10
	3.2. Aislamiento y cultivo de hepatocitos .	10
	3.3. Procedimientos analíticos .	12
	3.4. Análisis estadísticos .	16
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
5	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	30
	• BIBLIOGRAFÍA	31
	• DIVULGACIÓN DE LOS RESULTADOS	35

1

Los flavonoides son compuestos fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en frutas y verduras y en diversas bebidas y que pertenecen al grupo de compuestos fitoquímicos que representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana.

Los flavonoides desempeñan un papel importante en la biología vegetal. Así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales tales como hierro y cobre (Formica y Regelson 1995).

Los flavonoides contienen un número variable de grupos hidroxilo fenólicos que les confieren una capacidad antioxidante y potencial terapéutico en enfermedades entre las que se incluyen la cardiopatía isquémica, la arteriosclerosis o el cáncer. Sus propiedades antirradicales libres se dirigen fundamentalmente hacia el OH^\bullet y el $\text{O}_2^{\cdot-}$, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la peroxidación lipídica (Jovanovic y cols 1998) y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas antiprostanoide y antiinflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos anti-trómbicos) y proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la formación de la placa de ateroma) (Pace-Asciak y cols 1995, Igura y cols 2001, Yang y cols 2000).

La cerveza contiene importantes cantidades de flavonoides entre los que destacan los polihidroflavanos (catequina y epicatequina), los antocianógenos (leucocianidina o leucopelargonidina) y los flavonoles (grupo de las quercetinas) (Charalambous 1981). Recientemente se han estudiado los isoflavonoides en muestras de cerveza embotelladas, encontrándose que cuatro de ellos totalizan hasta 29 nmol/l, lo que supone cantidades muy significativas de polifenoles biológicamente activos (Lapick y cols 1998).

Solo unos pocos estudios realizados hasta el momento han abordado el tema de los compuestos antioxidantes presentes en la cerveza y en otros tipos de bebidas. Investigadores del King's College de Londres han publicado una investigación acerca de la presencia de flavonoides en diversos tipos de bebidas y del papel potencial como antioxidante del ácido ferúlico que se encuentra en cervezas de baja graduación alcohólica (Bourne y cols 2000). En otro estudio reciente de la Universidad del Estado de Oregón se ha puesto de manifiesto que los flavonoides del lúpulo pueden inhibir monooxigenasas dependientes del citocromo P-450, lo que sugeriría un papel potencial en la modulación de la activación de carcinógenos (Henderson y cols 2000). El mismo grupo de investigadores ha confirmado que chalconas y flavanonas son inductoras de las quinona reductasas y podrían tener un papel preventivo en la progresión de los hepatomas (Miranda y cols 2000).

Investigadores de las Universidades de Roma y Perugia han observado, en modelos experimentales en ratones, que la cerveza podría atenuar la acción oxidativa del etanol (Gasbarrini y cols 1998) y han puesto de manifiesto en humanos que la cerveza es capaz de transferir sus compuestos fenólicos a los fluidos orgánicos con mayor facilidad que la cerveza sin alcohol, siendo mayor la capacidad antioxidante total del plasma en el primer caso (Ghiselli y cols 2000).

Aunque el posible papel protector de los flavonoides en el hígado se conoce escasamente, se ha puesto de manifiesto que la quercitina es capaz de inhibir la activación de las células estrelladas así como la producción de óxido nítrico, alterando vías de expresión de proteínas celulares (Kawada y cols 1998) y que, en modelos de isquemia-reperfusión, reduce la capacidad oxidante del anión superóxido (Huk y cols 1998). Nuestro grupo ha demostrado recientemente que la quercitina, al igual que los antioxidantes de carácter tiólico, reduce la fibrosis y el estrés oxidativo en modelos animales de cirrosis biliar (Pastor y cols 1998, Peres y cols 2000).

En alteraciones que cursan con una respuesta inflamatoria, los macrófagos, estimulados por factores tales como endotoxemia o isquemia/reperusión, desempeñan un papel fundamental. Los macrófagos activados liberan mediadores de la inflamación, incluyendo citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral (TNF α), así como especies reactivas de oxígeno (ERO) que pueden contribuir a la aparición de estrés oxidativo, especialmente en aquellos casos en que exista un desequilibrio con las defensas antioxidantes de carácter enzimático (catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa) y no enzimático (vitaminas antioxidantes, glutatión y probablemente flavonoides) (Palomero y cols 2001, Sánchez-Campos y cols 1998).

En situaciones que cursan con estrés oxidativo, este puede ser un estímulo importante para la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B, una molécula que a su vez exacerba los procesos inflamatorios y la lesión celular mediante el aumento en la expresión de citoquinas y de la óxido nítrico sintasa inducible (García-Ruiz y cols 1995). Esta última enzima estimula la formación de óxido nítrico, cuya reacción con especies reactivas tales como el anión superóxido produce la formación de peroxinitrito el cual contribuye a la lesión celular (Szabo y cols 1999).

OBJETIVOS

Numerosos estudios han demostrado en los últimos años que la protección frente al efecto deletéreo de las especies reactivas de oxígeno mediante la utilización de agentes antioxidantes puede contribuir a un mejor mantenimiento de la función del hígado (Peres y cols 2000). **El objetivo del proyecto propuesto es el análisis de los mecanismos celulares y moleculares del efecto protector de flavonoides presentes en la cerveza, utilizando un modelo experimental de inflamación hepática en la rata (inyección de lipopolisacárido).**

2

3

3.1. ANIMALES Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratas macho de raza Wistar de pesos comprendidos entre 225 y 250 g. Los animales, antes de realizar los experimentos, se mantuvieron en condiciones de humedad y temperatura constantes y fotoperíodo controlado (12 h luz-12 h oscuridad) y con libre acceso al agua y la comida (pienso comercial estándar A03, Panlab). Los protocolos seguidos con los animales en los procedimientos experimentales estaban de acuerdo con las indicaciones de la "Guide to the Care and Use of Experimental Animals" (Canadian Council on Animal Care) que, de hecho, es utilizada de manera rutinaria en nuestro laboratorio. La endotoxina (5 mg/kg de LPS, E. coli, serotipo 0127) se administró intraperitonealmente, realizándose los experimentos a las dos horas de la inyección.

3.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HEPATOCITOS

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso corporal, i.p.; Nembutal, Sigma). Tras colocarlos sobre el dorso en una mesa de operaciones se administra heparina por vía safena. Se abre la cavidad abdominal mediante incisión en forma de U y se desplazan los intestinos hacia la izquierda de la cavidad. Se realiza una ligadura en la vena cava inferior, justo por encima del nivel de la vena renal y 2 ligaduras más en la vena porta entre las que se inserta una cánula. Se abre el tórax mediante una incisión, bordeando el diafragma y se seccionan los nervios vago y frénico. Se realiza una ligadura en la vena cava inferior y se inserta una cánula a través de la aurícula derecha.

A través de la vena porta se realiza una perfusión de solución salina fosfata libre de calcio (PBS, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM

KH_2PO_4) durante 10 minutos a un flujo de 40 ml/min. Seguidamente, el perfundido se cambia por una solución de PBS con calcio (1 mM) y con colagenasa (30 mg/100 ml) (Sigma) que se perfunde durante 10 minutos. Una vez que la superficie del hígado aparece blanda, se retira el órgano y se dispersa el tejido. La suspensión celular se diluye con PBS con calcio y se filtra tres veces con mallas de nylon de tamaño de poro cada vez menores (500, 200 y 100 μm). Las células se centrifugan cuatro veces (50 x g durante 2 minutos) y se obtiene el precipitado celular, que se resuspende en el medio de cultivo de anclaje y se procede al conteo celular en cámara de Bürker.

La viabilidad celular se determina por exclusión con azul de tripan (Sigma Chemical Co.). Aproximadamente 2×10^6 hepatocitos recién aislados se colocan en placas de cultivo de 60 x 15 mm (Becton-Dickinson) en 3 ml de medio de anclaje, Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL), suplementado con 20 U/ml de penicilina, 20 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, 50 pg/ml de anfotericina B y un 10% de suero fetal bovino (FCS). Transcurridas tres horas de incubación a 37°C con una humedad del 95% y un 5% de CO_2 , el medio de anclaje fue reemplazado por otro en el que se disminuyó el porcentaje de FCS al 2% y al que se le añadió la concentración adecuada de LPS para la inducción de la inflamación *in vitro* (10 μg de LPS/ml de medio).

En dichas placas de cultivo, y de forma simultánea, se han analizado los efectos de la adición al medio de dos diferentes concentraciones (100 y 150 $\mu\text{g/ml}$) de un flavonoide representativo del grupo de los polihidroflavanos (catequina) y de otro correspondiente al grupo de los flavonoles (quercitina). Ambos compuestos muestran una elevada capacidad antioxidante.

Cada experimento se realiza en placas por quintuplicado. Los lisados de las células se someten a Western blotting, aislamiento de ARN y EMSA. Se realizan experimentos en paralelo con el fin de realizar por triplicado la determinación de la activación del NF- κ B. En estos experimentos las células se utilizan 2 ho-

ras después de haber añadido los flavonoides. Cada experimento se realiza por duplicado con hepatocitos obtenidos en distintos aislamientos.

3.3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Liberación de LDH.

La citotoxicidad se mide considerando el índice de lisis de la membrana, es decir, la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa de los hepatocitos dañados. La liberación de LDH al medio de cultivo se determina mediante la medida de la actividad enzimática en el medio y se expresa respecto al número de hepatocitos cultivados en dicho medio.

Formación intracelular de especies reactivas de oxígeno.

Tras el tratamiento del cultivo primario de hepatocitos con LPS y los flavonoides, se procede a su recogida para la determinación de la producción de H_2O_2 mediante citometría de flujo y microscopía confocal utilizando el fluoróforo 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (Sigma). Este colorante es un compuesto no polar estable que rápidamente difunde al interior de las células, donde los grupos acetato del mismo son eliminados de la molécula por la acción de esterasas intracelulares produciéndose diclorodihidrofluoresceína (DCFH), que es así retenida en el interior celular. El peróxido de hidrógeno intracelular y otros peróxidos de bajo peso molecular, en presencia de peroxidasa, oxidan al DCFH a un compuesto de mayor fluorescencia, el 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). De esta manera, la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de peróxidos producidos por las células. Al final del período de incubación con cada tratamiento, se lavan las células con PBS e inmediatamente se tratan con tripsina-EDTA. Una vez recuperadas las células, se la-

van de nuevo con PBS, tras lo cual se incuban con agitación durante 30 minutos en 2 ml de PBS que contenga 5 mM de DCFH-DA a 37°C. Las células se lavan posteriormente 2 veces con PBS para eliminar el DCFH-DA extracelular y se analizan en un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) (para la DCFH se utiliza una excitación de 488 nm y una emisión de 525 nm).

En los resultados de la citometría de flujo, la cuantificación del área de las poblaciones M1 (población celular con fluorescencia basal) y M₂ (fluorescencia positiva) se realiza en unidades arbitrarias de fluorescencia ya que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de especies de oxígeno reactivo presentes en el interior de las células. El resultado viene expresado como porcentaje de la población que muestra fluorescencia (M₂) respecto al total (M₁ + M₂). La inducción de la producción de especies reactivas de oxígeno como consecuencia del tratamiento con LPS se comprobó, asimismo, mediante microscopía confocal respecto a hepatocitos sin tratar, utilizando el mismo fluoróforo y el mismo protocolo de tratamiento de las células (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA).

Expresión del gen de la enzima oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS).

La determinación de la proteína iNOS se lleva a cabo por Western blot utilizando el sistema de Laemmli (1970). En primer lugar se realiza la homogeneización de una cantidad de tejido en tampón de lisis (NaCl 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%, Tris 20 mM; pH 8,0), al que se le añaden una mezcla de inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail tablets; Roche; ref. 1836170). Tras la homogeneización se incubaba durante 30 minutos a 4 °C y se centrifuga durante 30 minutos a 17000 xg y 4 °C, recogiendo a continuación el sobrenadante en alícuotas.

Se lleva a cabo la separación de las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y SDS introduciendo una muestra en cada línea del gel y

comparando en un mismo gel todos los grupos. Posteriormente se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y, tras bloquearse la membrana para evitar las uniones inespecíficas, se incuba con un anticuerpo anti-iNOS policlonal obtenido en conejo (NOS2, H-174; Santa Cruz Biotechnology) y con el anti-anticuerpo marcado con HPR, obtenido en cerdo (Inmunoglobulinas de conejo, ref. P0217, Dako), y finalmente se procede a su determinación por quimioluminiscencia (ECL, RPN2109, Amersham Pharmacia Biotech). La inmunocuantificación se realiza comparando densitométricamente el valor de las muestras control con la correspondiente a cada uno de los demás grupos considerados. La determinación se repite al menos tres veces con distintas muestras de cada grupo.

RT-PCR.

La determinación de la concentración de ARNm se realiza por el método que combina la transcriptasa reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Está basado en la capacidad de la transcriptasa reversa para sintetizar una cadena de ADN complementaria (ADNc), a partir de una secuencia molde de ARN. Para la reacción en cadena de la ADN polimerasa se sigue el procedimiento descrito por Saiki y cols. (1988) y Mullis y Faloona (1987), basado en el proceso natural de replicación del ADN con amplificación cíclica. Partiendo de una molécula de ADN diana, es posible amplificar una secuencia específica contenida en ella, mediante la utilización de oligonucleótidos iniciadores diseñados específicamente para cada una de las enzimas estudiadas. En nuestro estudio, procedimos a la cuantificación mediante RT-PCR de la enzima superóxido dismutasa mitocondrial (SODm). Para ello el ARN total de los hepatocitos se extrajo mediante el kit QuickPrep total RNA Extraction Kit (Amersham Pharmacia Biotech), procediendo a su cuantificación mediante el kit de Ribogreen (Molecular Probes). Posteriormente, el ADNc monocatenario se obtuvo a partir

de 2 μg de ARN total, utilizando 5 $\mu\text{mol/l}$ de primers inespecíficos (Ambion), 10 U de transcriptasa reversa AMV (Promega), en un tampón 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 (Ambion), 40 U/ml de inhibidor de ribonucleasa (Promega) y 2 mM de la mezcla de dNTP (Ambion) en un volumen final de 20 μl .

La transcripción reversa se llevó a cabo durante 15 minutos a 25°C y durante 90 minutos a 42°C, siendo posteriormente calentadas las muestras a 92°C durante 10 mn para finalizar la reacción. Con el ADNc obtenido se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando 2 μl del producto de RT. La mezcla consistió en 2,5 U de Taq polimerasa (Promega), los primers específicos de la SODm de rata a una concentración de 5 mmol/l, cuya secuencias son 5'-GCCTGTGGTTCCTTG CAG y 3'-(5'-3')-GCGCAGATCATGCAGCTG, que resulta en un fragmento amplificado de 365 pares de bases. El volumen final de reacción fue de 50 μl . Los viales se incubaron en un termociclador (Eppendorff-Netheler-Hinz GmbH) a 94°C 2 min, a 94°C 30 segundos, a 67°C 40 segundos, a 72°C 40 segundos, repitiendo 40 ciclos desde el paso segundo, finalizando con 10 minutos a 72°C. Para normalizar las señales de las diferentes muestras de ARN, amplificamos asimismo 2 μl del producto de RT con 0,1 nmol de primers específicos de la β -actina de rata (Biosource International), los cuales amplifican un segmento de 649 pares de bases. Los productos de PCR y los marcadores de peso (Boehringer Mannheim) se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% visualizando las bandas con bromuro de etidio. Los geles se analizaron mediante densitometría utilizando un Gelprinter junto con un sistema de fotodocumentación (TDI) y el software KS-300 (Imaging System).

Activación del factor de transcripción NF- κ B.

La activación del factor de transcripción NF- κ B se analiza en extractos nucleares mediante un ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA)

que consiste en la separación electroforética del complejo formado por el NF- κ B y una sonda específica de ADN marcada radiactivamente (Mauriz y cols 2001). Se utilizan oligonucleótidos de consenso para NF- κ B (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') y se marcan las sondas con 32 P mediante la polinucleótido quinasa T4. La reacción de unión se lleva a cabo mediante incubación de los extractos nucleares con poli(dI-dC) y oligonucleótido marcado (30.000 cpm). La mezcla se somete a electroforesis en gel de poliacrimida durante 90 minutos a 150 voltios. El gel se seca y autorradiografía a -70°C durante una noche. Finalmente se cuantifican las bandas mediante un analizador de imagen.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

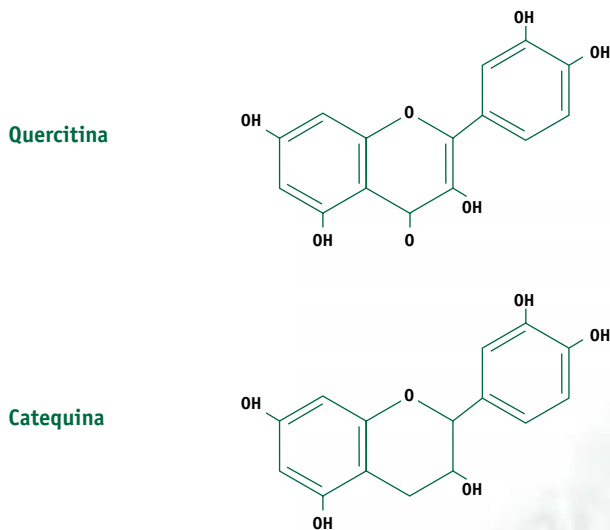
La valoración estadística de los resultados obtenidos se lleva a cabo mediante un análisis descriptivo de los datos y la contrastación de hipótesis nula por ANOVA, utilizando las pruebas idóneas en función del tamaño muestral y de la normalidad en la distribución de los valores de los datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4

En nuestro estudio se ha examinado el efecto antioxidante y antiinflamatorio de dos diferentes flavonoides de la cerveza en cultivo primario de hepatocitos. Los compuestos empleados han sido un polihidroxi flavano, la catequina, y un flavanol, la quercitina (Figura 1).

Figura 1. Estructura de los flavonoides investigados



Ambas moléculas muestran una elevado poder antioxidante que puede ponerse de manifiesto por su capacidad para eliminar los radicales libres generados en fases acuosas. Mediante el estudio de la capacidad antioxidante total como actividad antioxidante equivalente de Trolox (concentración de una solución del análogo hidrosoluble de la vitamin E con potencial antioxidante equivalente a una concentración estandar del compuesto) se han obtenido valores

de capacidad antioxidante de 4,7 mM para la quercitina y 2,4 mM para la catequina, superiores a los de vitaminas antioxidantes o carotinoides (Rice-Evans y Miller 1996).

El aislamiento de hepatocitos se llevó a cabo en ratas control y tratadas in vivo con LPS, obteniéndose al finalizar en proceso de extracción una viabilidad > 95%. La figura 2 muestra hepatocitos en cultivo primario procedentes de una rata no tratada, sometidos a un protocolo de tinción con xanteno/tiazina (Pánoptico rápido, QCA in vitro Diagnosticum).

Figura 2. *Cultivo primario de hepatocitos de rata sin tratar. Tinción con xanteno/tiazina. Microscopía óptica (x600).*

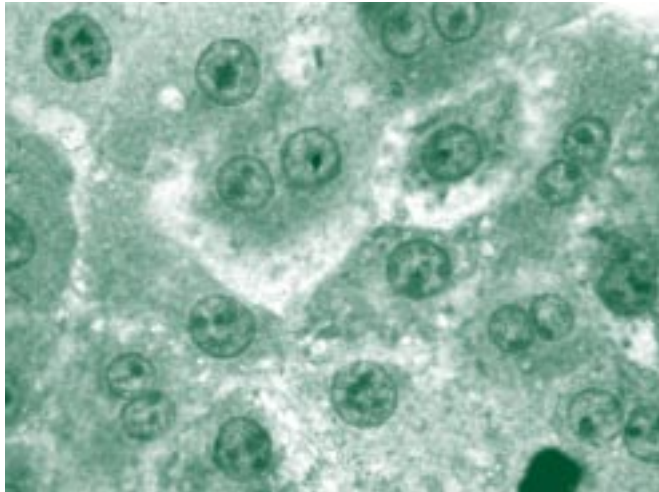
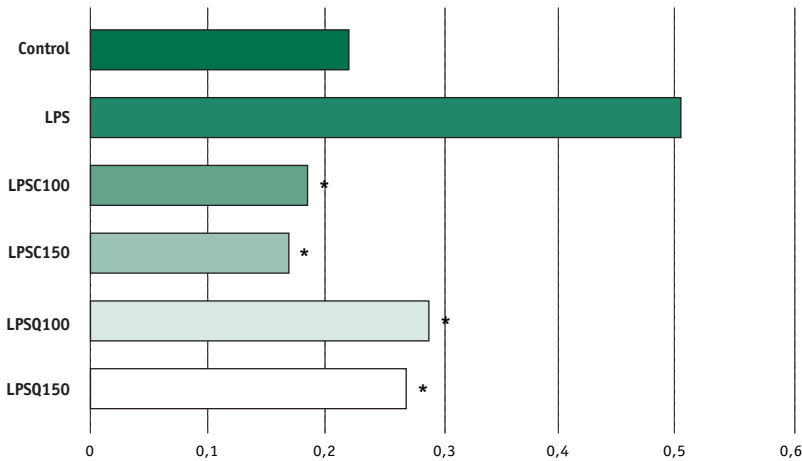
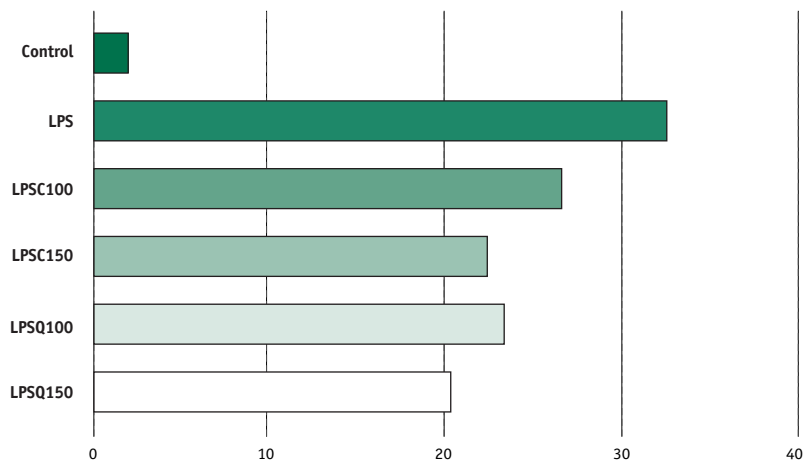


Figura 3. Liberación de LDH (UI/l) al medio de cultivo. * $p < 0,05$ respecto al grupo LPS.



En la figura 3 se representa la cantidad de LDH liberada al medio de cultivo en los diferentes tipos de experimentos. El daño celular inducido por el LPS se tradujo en un incremento del 113% en la liberación de LDH. Tanto la catequina como la quercitina indujeron descensos significativos en la concentración de LDH, de mayor cuantía para la catequina (LPSC₁₀₀ -60%, LPSC₁₅₀ -61%) que en el caso de la quercitina (LPSQ₁₀₀ -41%, LPSQ₁₅₀ -45%).

Figura 4. Formación de DCF (% de células M₂). **p*<0,05 respecto al grupo LPS.



La figura 4 muestra el porcentaje de la población celular total que mediante citometría de flujo mostraba formación de DCF (M₂) a partir del fluoróforo 2' 7'-dichlorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), como indicador de la producción de especies reactivas de oxígeno, observándose en la figura 5 los histogramas correspondientes a cada uno de los tratamientos, donde se diferencian dos poblaciones celulares, M₁ y M₂, según muestren fluorescencia o no. En las células tratadas con LPS un tercio de las células mostraban formación de fluoróforo (M₂). Con la dosis mayor de catequina (LPSC₁₅₀) dicho porcentaje se reducía al 24% y también se detectaban disminuciones significativas en el tratamiento con quercetina (LPSQ₁₀₀ 25%, LPSQ₁₅₀ -23%).

El incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno como consecuencia del tratamiento con LPS se comprobó asimismo de forma cualitativa mediante microscopía confocal utilizando el mismo fluoróforo (DCFH-DA) (Figura 6).

Figura 5. Citometría de flujo de hepatocitos aislados de rata incubados con DCFH-DA. A la derecha de la figura aparecen las imágenes de los dot plots correspondientes a cada tratamiento, en las que se muestra la población caracterizada por el tamaño y la complejidad celular. A la izquierda se muestran los histogramas correspondiente a cada tratamiento, mostrándose las separación de las poblaciones M_1 y M_2 según muestren o no fluorescencia.

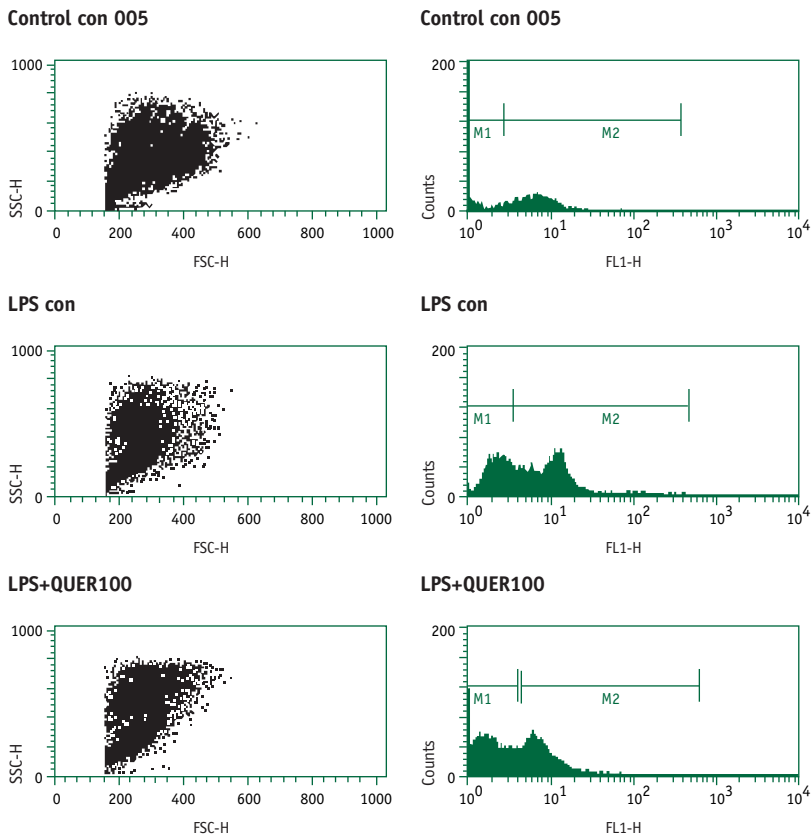
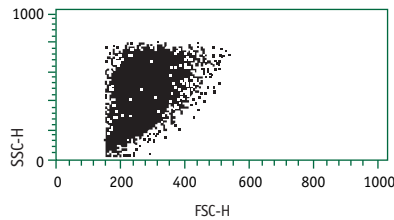
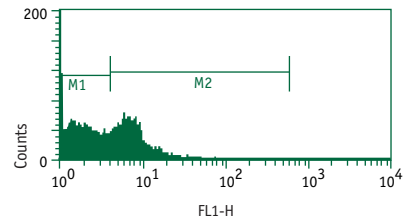


Figura 5 (Continuación). Citometría de flujo de hepatocitos aislados de rata incubados con DCFH-DA. A la derecha de la figura aparecen las imágenes de los dot plots correspondientes a cada tratamiento, en las que se muestra la población caracterizada por el tamaño y la complejidad celular. A la izquierda se muestran los histogramas correspondiente a cada tratamiento, mostrándose las separación de las poblaciones M_1 y M_2 según muestren o no fluorescencia.

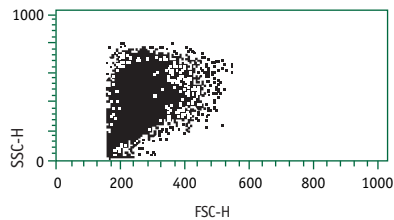
LPS+QUER150



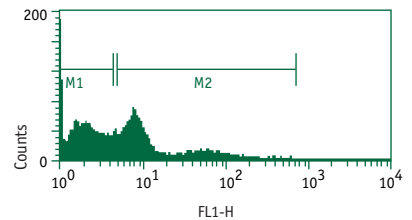
LPS+QUER150



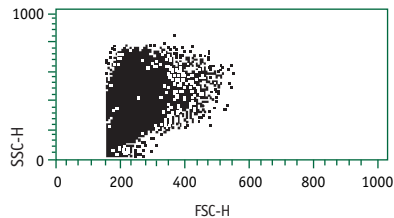
LPS+CAT100



LPS+CAT100



LPS+CAT150



LPS+CAT150

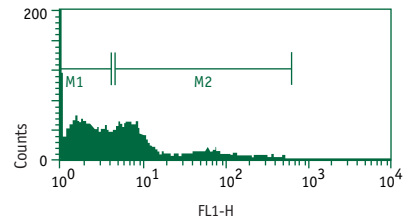
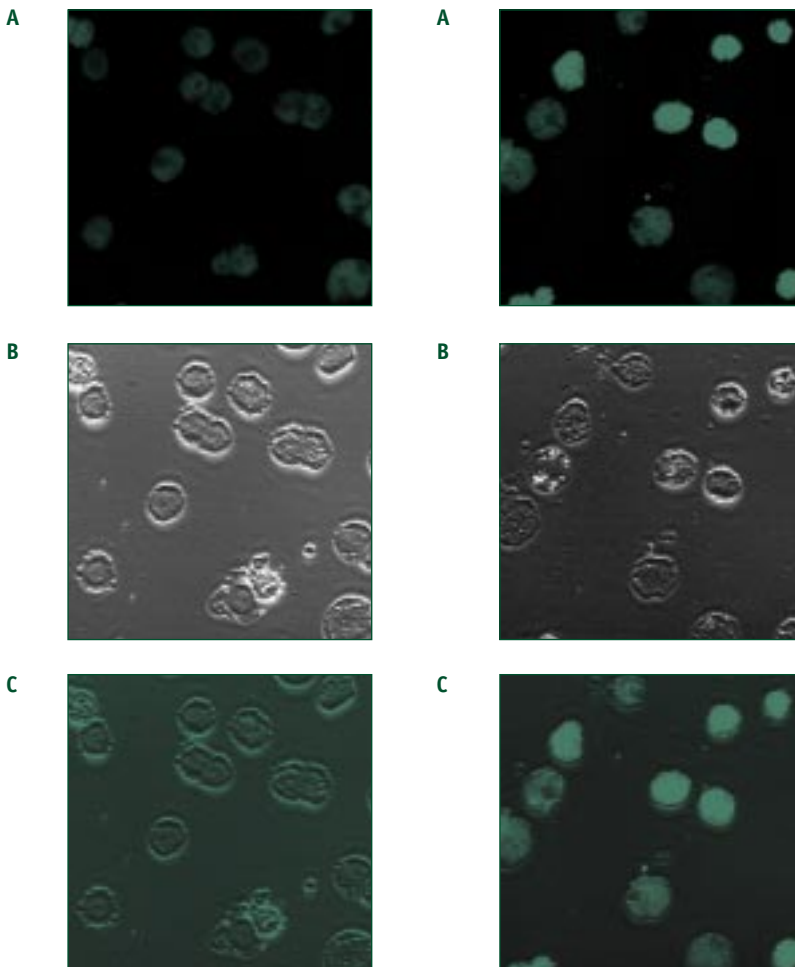
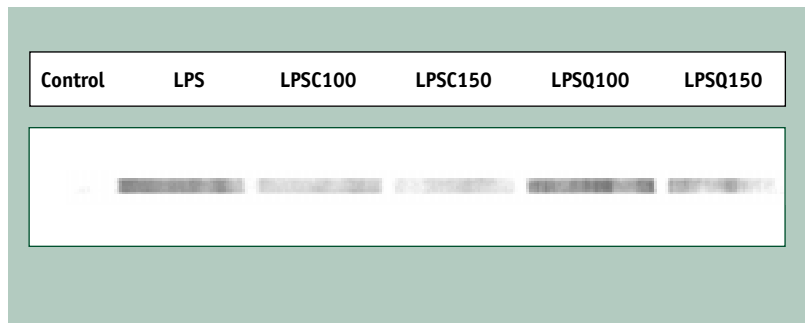


Figura 6. *Microscopía confocal de cultivo primario de hepatocitos control (línea 1) y tratados con LPS (línea 2) incubados con DCF-DA. Las imágenes A muestran la fluorescencia celular, proporcional a las especies reactivas de oxígeno, mientras que la imagen B es una imagen óptica sin excitación del fluoróforo. La imagen C es la integración de las imágenes A y B.*



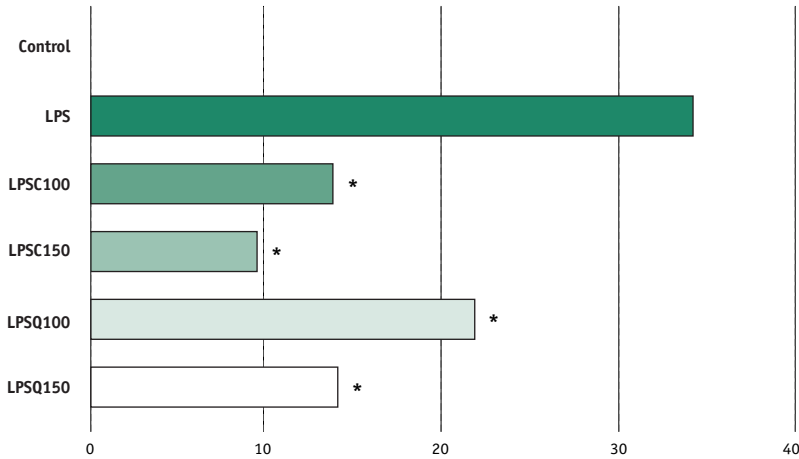
La expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se estudió en las células mediante Western blotting (Fig. 7).

Figura 7. Western blot de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en los diferentes grupos experimentales ($P_m=130$ kD).



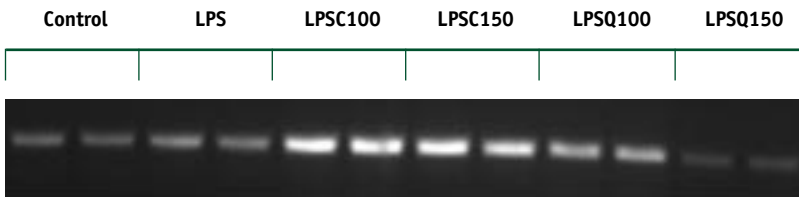
Los datos obtenidos indican que la marcada expresión de la enzima presente tras tratamiento con LPS se reduce de forma importante tras el tratamiento con catequina (LPSC₁₀₀ -57%, LPSC₁₅₀ -69%) y en menor medida con quercitina (LPSQ₁₀₀ -22%, LPSQ₁₅₀-55%) (Fig. 8).

Figura 8. Expresión de *iNOS*. (% de control). * $p < 0,05$ respecto al grupo LPS.



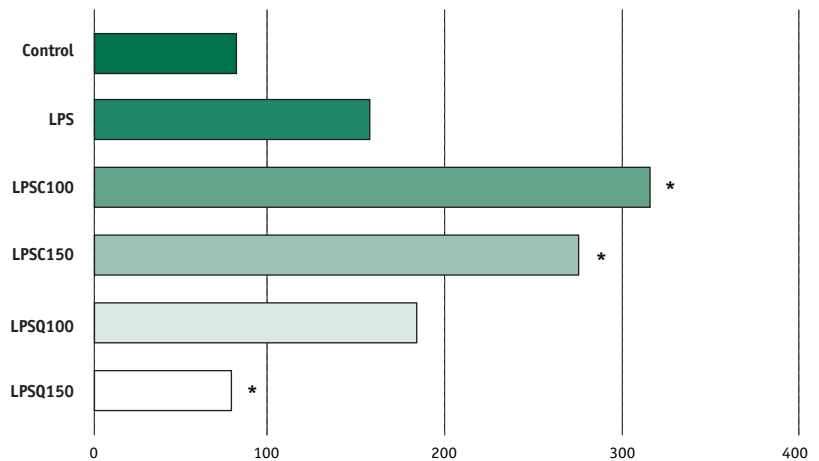
Al realizar una análisis de la expresión génica de la enzima superóxido dismutasa mitocondrial mediante RT-PCR se comprobó (Fig. 9) que el daño inducido por LPS cursaba con un incremento del 76% en la concentración del ARNm respecto a control.

Figura 9. RT-PCR de la superóxido dismutasa (*SOD*) en los diferentes grupos experimentales.



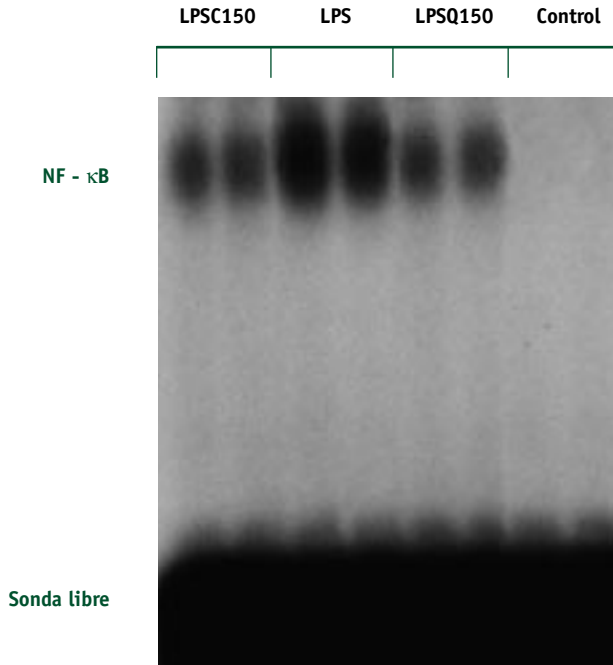
El tratamiento con catequina indujo aumento adicionales de la expresión del gen (LPSC₁₀₀ +158%, LPSC₁₅₀ +119%), mientras en el caso de la quercitina la dosis más alta (LPSQ₁₅₀) redujo significativamente el nivel del RNAm (-74%) (Fig. 10).

Figura 10. Expresión de SOD (% de control). * $p < 0,05$ respecto al grupo LPS.



En la figura 11 se observa el resultado del ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) como medida de la activación del factor de transcripción nuclear kappa B. El tratamiento con LPS indujo una marcada activación del factor de transcripción, que se reducía de forma importante tanto con la administración de catequina como de quercitina.

Figura 11. Activación de NF- κ B en los diferentes grupos experimentales.



La administración de LPS es un modelo estandarizado y bien conocido de daño inflamatorio en el cual se produce una liberación de citoquinas inflamatorias, especies reactivas de oxígeno (ERO) y óxido nítrico, todos los cuales desempeñarían un papel importante en los mecanismos patogénicos (Mauriz y cols 2000). Nuestros datos confirman estos aspectos en el cultivo primario de hepatocitos, pues se detecta un aumento en la formación de ERO por citometría de flujo, una mayor expresión de la iNOS y un incremento de la liberación de LDH al medio de cultivo.

Como cabría esperar del carácter antioxidante de los flavonoides estudiados, tanto la quercitina como la catequina disminuyen de forma significativa la producción de ERO, lo que, debido a una reducción del daño oxidativo a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Mauriz y cols 2001), contribuiría a explicar la disminución del daño celular y la menor liberación de LDH.

Las ERO se mantienen en niveles fisiológicos óptimos gracias a los sistemas de defensa antioxidantes y en situaciones que cursan con estrés oxidativo, se produce una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa que puede contribuir al daño celular (Pastor y cols 1997). En nuestro estudio, el tratamiento con LPS se acompañó de un aumento en la expresión del gen de la SOD manganeso dependiente, fenómeno que coincidiría con la previa descripción de una correlación entre activación de NF- κ B e inducción de dicho gen (Xu y cols 1999); mientras que la mayor producción de óxido nítrico causaría una inhibición en la transducción o modificaciones postransduccionales de la enzima (Drapier y cols 1993). Solo la administración de quercitina fue capaz de reducir la expresión de la SOD, en coincidencia con el mayor efecto inhibitorio sobre la producción de ERO.

Además de la toxicidad directa, el estrés oxidativo producido por las ERO es capaz de iniciar o amplificar el proceso inflamatorio a través de genes implicados en la respuesta inflamatoria. Uno de tales genes es el del NF- κ B (Wulczyn y cols 1996). Cuando dicho factor se activa se produce su translocación al núcleo y la unión a una región promotora de los genes diana, por lo que esta molécula puede desempeñar un importante papel en el bloqueo terapéutico de los procesos inflamatorios.

La activación de NF- κ B resulta, a su vez, en aumento de la expresión de las citoquinas proinflamatorias (Bowie y cols 2000). El NF- κ B se activa por factores diversos incluyendo factores de crecimiento o citoquinas (Nanji y cols

1999), pero uno de los estímulos principales son las ERO y se sabe que la vitamina E o el aumento de expresión de las enzimas antioxidantes puede bloquear la activación del factor de transcripción (Nilakantan y cols 1998). Nuestros datos ponen de manifiesto que el daño inducido por LPS cursa con activación del factor de transcripción y que la menor producción de ERO inducida por la administración de las flavonoides se acompaña de una inhibición de la activación de NF- κ B.

El factor nuclear kappa B es esencial para la inducción del gen de la iNOS en respuesta a citoquinas (Hur y cols 1999) y en distintos modelos experimentales se ha comprobado que la activación de NF- κ B cursa con un aumento en los niveles del ARNm de la iNOS, pudiendo bloquearse ambos efectos mediante moléculas antioxidantes como la glicina (Mauriz y cols 2001). En nuestros experimentos, la inhibición en la activación de NF- κ B fue proporcional a la menor expresión génica de la iNOS y por tanto, a la producción de óxido nítrico.

Los mecanismos patogénicos implicados en los procesos inflamatorios no se conocen por completo y existe un alto grado de sinergismo y redundancias en las vías implicadas. Aunque la relación causal entre los efectos de los flavonoides de la cerveza detectados en nuestro estudio y los cambios patológicos no se puede establecer con toda certeza, la activación de NF- κ B y los efectos de las especies reactivas de oxígeno serían mecanismos importantes y ambos se bloquean de forma evidente.

5


- Los resultados obtenidos hasta el momento ponen claramente de manifiesto que los flavonoides estudiados, el polihidroflavano catequina y el flavonol quercitina, ambos presentes en concentraciones apreciables en la cerveza, tienen un claro efecto protector frente a las alteraciones de carácter oxidativo e inflamatorio en modelos de hepatocitos aislados.
- A las dosis estudiadas ambos flavonoides reducen el daño celular, identificado por la liberación de LDH al medio de cultivo, de forma muy significativa.
- Asimismo, se produce una inhibición del estrés oxidativo, puesta de manifiesto por la menor fluorescencia del DCF por citometría de flujo.
- El tratamiento con ambos flavonoides reduce la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible y disminuye la activación del factor de transcripción nuclear kappa B.
- Los efectos indicados muestran una cierta relación dosis-efecto, aunque no se detectan diferencias claras en el papel protector de ambos flavonoides.
- Estos datos confirman los efectos beneficiosos de flavonoides constituyentes de la cerveza sobre la salud y su papel positivo en las alteraciones de tipo inflamatorio. No obstante, sería necesaria una continuación de la investigación para una identificación en profundidad de los mecanismos moleculares implicados, con ampliación del rango de concentraciones a estudio, utilización de modelos adicionales de daño orgánico y análisis de los efectos de otros flavonoides presentes en la cerveza. Asimismo sería importante identificar la interacción entre los efectos positivos de los flavonoides y la presencia de altas y bajas concentraciones de alcohol.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Bourne L, Paganga G, Baxter D, Hughes P, Rice-Evans C. Absorption of ferulic acid from low alcohol beer. *Free Radical Research* 32, 273-280, 2000.
- 2 Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappa B activation: a reassessment of the evidence on the light of recent discoveries. *Biochemical Pharmacology* 59, 13-23, 2000.
- 3 Drapier J, Hirling H, Wietzerbin J, Kaldy P, Kuhn LC. Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *EMBO Journal* 12, 3643-3649, 1993.
- 4 Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemistry and Toxicology* 33, 1061-1080, 1995.
- 5 García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Role of oxidative stress generated from mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription nuclear factor kB: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Molecular Pharmacology* 48, 825-834, 1995.
- 6 Gasbarrini A, Addolorato G, Simoncini M, Gasbarrini G, Fantozzi P, Mancini F, Montanari L, Nardini M, Ghiselli A, Scaccini C. Beer affects oxidative stress due to ethanol in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 43, 1332-1338, 1998.
- 7 Ghiselli A, Natella F, Guidi A, Montanari L, Fantozzi P, Scaccini C. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutrition and Biochemistry* 11, 76-80, 2000.
- 8 Henderson MC, Miranda CL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR. In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenilated flavonoids from hops. *Humulus lupulus*. *Xenobiotica* 30, 235-251, 2000.

- 9 Huk I, Brovkovich V, Nanobash V, Weigel G, Neumayer C, Partyka L y cols. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *British Journal of Surgery* 85, 1080-1085, 1998.
- 10 Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, Lee JH. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF- κ B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261, 917-922, 1999.
- 11 Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Letters* 171, 11-16, 2001.
- 12 Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG, Hara Y. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. In: Rice Evans C, Packer L, eds. *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, Nueva York, 137-161, 1998.
- 13 Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 27, 1265-1274, 1998.
- 14 Lapcik O, Hill M, Hampl R, Wahala K, Adlercreutz H. Identification of isoflavonoids in beer. *Steroids* 22, 830-836, 1998.
- 15 Mauriz JL, Matilla B, Culebras JM, González P, González-Gallego J. Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagic shock in the rat. *Free Radical Biology & Medicine* 31, 1236-1244, 2001.

- 16 Miranda CL, Aponso GL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR. Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductases in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Letts* 149, 21-29, 2000.
- 17 Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR, Su G.L. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 30, 934-943, 1999.
- 18 Nilakantan V, Spear BT, Glauert HP. Liver-specific catalase expression in transgenic mice inhibits NF-kB activation and DNA synthesis induced by the peroxisome proliferator ciprofibrate. *Carcinogenesis* 19, 631-637, 1998.
- 19 Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta* 235, 207-219, 1995.
- 20 Palomero J, Galán AI, Muñoz ME, Tuñón MJ, González-Gallego J, Jiménez R. Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporin in rats: Changes in liver glutathione and antioxidant enzymes. *Free Radical Biology & Medicine* 30, 836-845, 2001.
- 21 Pastor A, Collado PS, Almar M, González-Gallego J. Antioxidant enzyme status in biliary-obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *Journal of Hepatology* 27, 363-367, 1997.
- 22 Peres W, Tuñón MJ, Mato S, Collado PS, González-Gallego J. Hepatoprotective effects of the flavonoid quercetin in rats with biliary obstruction. *Journal of Hepatology* 33, 742-750, 2000.

- 
- 23** Rice-Evans CA, Miller NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions* 24, 790-795, 1996.
- 24** Sánchez-Campos S, López-Acebo, González P, Culebras JM, Tuñón MJ, González-Gallego J. Cholestasis and alterations of glutathione metabolism induced by FK506 in the rat. *Transplantation* 68, 84-88, 1998.
- 25** Sendra JM, Carbonell JV. Evaluación de las propiedades nutritivas, funcionales y sanitarias de la cerveza, en comparación con otras bebidas. Centro de Información Cerveza y Salud, Madrid, 1999.
- 26** Szabo C, Billiar TR. Novel roles of nitric oxide in haemorrhagic shock. *Shock* 12, 1-9, 1999.
- 27** Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF- κ B/Rel and I κ B gene families: mediators of immune response and inflammation. *Journal of Molecular Medicine* 74, 749-769, 1996.
- 28** Xu Y, Kiningham KK, Devalaraja MN, Yeh C, Majima H, Kasarksis, EJ, St Clair DK. An intronic NF- κ B element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . *DNA Cell Biology* 18, 709-722, 1999.
- 29** Yang K, Lamprecht SA, Liu Y, Shinozaki H, Fan K, Leung D y cols. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis* 21, 1655-1660, 2000.

DIVULGACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos se presentarán, contando con la conformidad de la Asociación de Cerveceros de España, en el Congreso de la International Association for the Study of the Liver que tendrá lugar en Madrid del 17 al 21 de Abril y donde ya ha sido aceptada una comunicación titulada:

Effect of the flavonoid catechin on IL-1 β -induced damage in rat hepatocyte primary culture. M.J. Tuñón, S. Sánchez-Campos, S.Martínez, J.M. Culebras, J. Mataix, J. González-Gallego.

Asimismo, el Dr. González-Gallego coordinará una mesa redonda e impartirá una ponencia invitada sobre PAPEL PROTECTOR DE LOS FLAVONOIDEOS en el XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral y Reunión Científica de la Sociedad Española de Nutrición, que se celebrarán en León de 14 al 17 de mayo de 2001. Los responsables del presente proyecto Dres Culebras Fernández y González Gallego son, respectivamente, Presidentes del Comité Organizador y del Comité Científico del citado Congreso y proponen, con la previa autorización de la Asociación de Cerveceros de España, elaborar diversas comunicaciones y posters con los resultados más relevantes del presente estudio para su presentación en dicha reunión.

Por otra parte, se está redactando un artículo de carácter divulgativo sobre los beneficios potenciales de los flavonoides para su publicación en la revista Nutrición Hospitalaria, órgano oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral y de la cual es editor el Dr. Culebras Fernández.

Por último, los estudios sobre el papel protector de los flavonoides de la cerveza constituirían el tema de la tesis doctoral de un alumno, Susana Martínez Flores, del Programa de Doctorado BIOMEDICINA de la Universidad de León.

En cualquier publicación derivada del presente proyecto y en la difusión de los resultados se hará siempre referencia al Convenio del cual se han derivado los mismos.

