



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Comparación del efecto del tratamiento crónico
con distintos polifenoles sobre los niveles de
SIRT1 y señalización asociada en el cerebro de
rata.**

Laura Aguiló Bonet

Grado de Biología

Año académico 2015-16

DNI del alumno: 43214244G

Trabajo tutelado por David Moranta Mesquida.
Departamento de Biología

Se autoriza a la Universidad a influir mi Trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Palabras clave del trabajo:

Resveratrol, silimarina, naringenina, quercetina, polifenol, estrés oxidativo, NF-kB, envejecimiento

Índice

1. Resumen.....	4
1. Abstract.	5
2. Introducción.	6
2.1 Envejecimiento a nivel poblacional.....	6
2.2 Efectos del envejecimiento sobre el cerebro.....	6
2.3 Teorías del envejecimiento.	7
2.4 Neuroinflamación en el envejecimiento.	8
2.5 Terapias contra el envejecimiento.	8
2.6 Resultados previos.	10
3. Objetivos.....	11
4. Material y métodos.	12
4.1 Animales de experimentación.....	12
4.2 Tratamientos farmacológicos y fármacos.	12
4.5 Análisis de proteínas en muestras cerebrales por <i>Western Blot</i>	13
4.6 Análisis estadístico.	17
5. Resultados.	18
5.1. Efecto del tratamiento crónico con polifenoles: resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina sobre los niveles de SIRT1.	18
5.2. Efecto del tratamiento crónico con polifenoles: resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina sobre la vía de señalización NF- κ B.	19
6. Discusión.....	21
7. Conclusiones.....	23
8. Bibliografía.	24

1. Resumen.

El aumento de la esperanza de vida en los últimos años ha sido un gran avance en los países desarrollados, pero también ha sido la causa de que la población envejezca e incremente el número de casos de enfermedades asociadas a la edad. Actualmente se investiga en desarrollar estrategias y hábitos que consigan un envejecimiento saludable y una mayor calidad de vida. Entre estas estrategias, se ha demostrado que una dieta rica en alimentos con elevada cantidad de compuestos polifenoles consigue retrasar el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento. Aunque no se conocen bien las causas moleculares implicadas en el proceso de la vejez, se ha señalado como causa fundamental, el estrés oxidativo y la activación de la inflamación. En este sentido, los polifenoles, gracias a su propiedad antioxidante y antiinflamatoria, pueden ser moléculas clave para prevenir el envejecimiento.

El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos protectores de los tratamientos con polifenoles sobre los cambios que ocurren durante el envejecimiento a nivel cerebral, así como analizar los mecanismos de acción implicados. Para ello se realizaron diversos tratamientos crónicos con los polifenoles resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas. Después de los tratamientos y sacrificio de los animales, se analizaron mediante western blot, los niveles de inmunoreactividad de diferentes proteínas/vías de señalización (NF- κ B y SIRT1) implicadas en envejecimiento y/o inflamación. Se comprobó que el envejecimiento genera un cierto deterioro cognitivo y motor, provocando cambios en los niveles de proteínas como la SIRT1 o la NF- κ B acetilada en regiones cerebrales implicadas en los procesos de aprendizaje y memoria, como es el caso del hipotálamo. Y se comprobó que estos cambios son contrarrestados por los tratamientos crónicos con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina.

En conjunto los resultados parecen indicar que la administración crónica de polifenoles contribuye a contrarrestar el estado proinflamatorio cerebral característico del envejecimiento; lo que constituye uno de los mecanismos importantes para su efecto neuroprotector.

1. Abstract.

The increase in life expectancy in recent years has been a breakthrough in developed countries, but has also been the cause of the aging population and increase the number of cases of age-related diseases. Nowadays it is investigated to develop strategies and habits to achieve healthy aging and a better quality of life. Among these strategies, have been shown that a diet rich in foods high amount of polyphenols compounds slow cognitive decline associated with aging sets. Although it's unknown the molecular causes of aging, there are two fundamental cause, oxidative stress and activation of inflammation. In this sense, polyphenols, thanks to its antioxidant and antiinflammatory property may be the key molecules to prevent aging.

The aim of this study was to determine the protective effects of treatments polyphenols on the changes that occur during aging in the brain, and to analyse the mechanisms of action involved. For this purpose, we treat the rats with various chronic treatment of polyphenols, resveratrol, silymarin, quercetin and naringenin. After the treatments and the sacrifice of the animals, we analysed by western blot the immunoreactivity levels of different proteins/signalling pathways (NF - kB and SIRT1) involved in aging and/or inflammation. It was found that aging creates some cognitive and motor impairment, causing changes in the levels of proteins such as SIRT1 or NF -kB acetylated in brain regions involved in learning and memory processes, such as the hypothalamus. And it was found that these changes are counterbalanced by chronic treatment with resveratrol, silymarin, quercetin and naringenin.

Altogether the results suggest that chronic administration of polyphenols helps counteract the characteristic brain proinflammatory state of aging; which is one of the important mechanisms for neuroprotective effect.

2. Introducción.

2.1 Envejecimiento a nivel poblacional.

Uno de los grandes problemas sanitarios a día de hoy, es el envejecimiento de la población debido a la mejora del sistema sanitario y al aumento de la esperanza de vida. Este envejecimiento poblacional lleva asociados problemas sanitarios, ya que también se ha visto aumentado el número de personas que padecen enfermedades neurodegenerativas graves, que impiden la autonomía y reducen la calidad de vida durante la vejez.

Hoy en día, el porcentaje de personas mayores a 65 años representa un 7,6% de la población total, pero se prevé que este porcentaje irá en aumento a medida que pasen los años, aumentando a 10.2% en 2030 y a 16.2% en 2050 (Fig. 1).

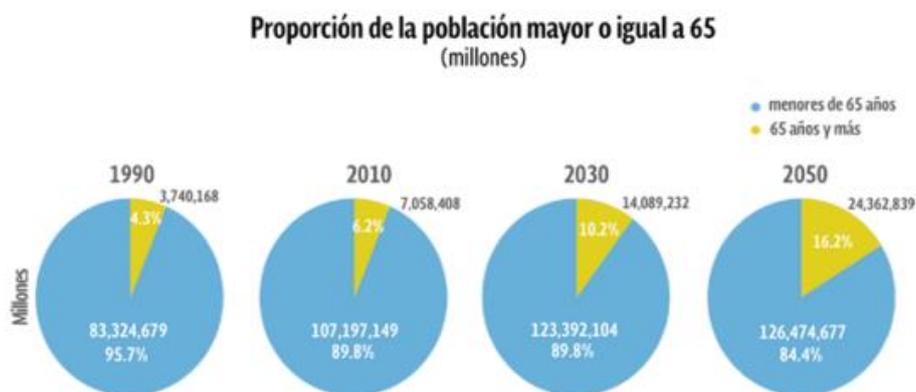


Fig. 1. Aumento de la población mayor o igual a 65 años en los últimos años y aproximación del crecimiento en los próximos años. Font: Consejo Nacional de Población, CONAPO (2010).

La cuestión es cómo se llega a éste punto, si se estudia la evolución de la población durante los últimos siglos, se observa que a finales del siglo XIX y a lo largo del siglo XX la tasa de natalidad, sobre todo en los países desarrollados, disminuye de forma drástica, por la cual cosa tenemos menos bebés. Además, por otro lado, los avances en medicina han permitido que la esperanza de vida aumente bastante, de manera que el número de ancianos se ve aumentado (Conapo, 2010).

2.2 Efectos del envejecimiento sobre el cerebro.

El envejecimiento es un fenómeno multifactorial que se caracteriza por la disminución de las funciones fisiológicas a medida que pasa el tiempo (Mandavilli *et al.*, 2002), es un proceso universal, de carácter intrínseco y progresivo (Viña *et al.*, 2008).

Este proceso de envejecimiento afecta a todo el cuerpo, pero nosotros nos vamos a centrar en los efectos que presenta sobre el cerebro. Con la edad el cerebro presenta cambios tanto morfológicos, es decir, relacionados con la estructura cerebral, cambios moleculares y cambios neurofisiológicos, en relación a la fisiología, que conllevan a un deterioro cognitivo y daños neurodegenerativos (Junqué y Jurado, 1994).

A nivel morfológico se han encontrado cambios de peso y volumen cerebral. Se ha visto que en personas de ambos sexos, a partir de la década de los 60 se produce una disminución del 2% en el volumen de los hemisferios cerebrales, causando en un 40% de los ancianos atrofia cerebral (Junqué

y Jurado, 1994). A nivel neurofisiológico la técnica que más se ha utilizado para obtener información sobre el metabolismo cerebral ha sido el flujo sanguíneo cerebral regional, con el que se ha llegado a la conclusión que hay una cierta disminución a medida que va avanzando la edad (La Rue, 1992). Y a nivel molecular se ha relacionado el envejecimiento con una disminución de los neurotransmisores, al menos, en los sistemas catecolaminérgicos y colinérgicos (Lapiente *et al.*, 1998). Estas alteraciones en su conjunto, conducen a una pérdida de atención, memoria, retención de nueva información, velocidad de procesamiento y de memoria a largo plazo (Park y Reuter-Lorenz, 2009).

2.3 Teorías del envejecimiento.

Durante los últimos años, la investigación relacionada con el envejecimiento ha estado en auge y se han propuesto muchas teorías para explicar por qué envejecemos y cómo lo hacemos. Por la naturaleza multicausal del envejecimiento, es difícil determinar que una sola teoría pueda explicar todos los mecanismos (Viña *et al.*, 2008; Miquel, 2006).

Entre las teorías existentes, destacan la teoría de Pearl, que relaciona el envejecimiento con el desgaste del metabolismo (Pearl, 1928), el concepto de Minot, que define el proceso de envejecimiento como el proceso que pagan los metazoos por la diferenciación celular (Minot, 1907). Así como la teoría del error catastrófico en la síntesis de proteínas (Orgel, 1963), que no ha podido ser comprobada mediante experimentación científica (Miquel, 2006).

En la actualidad la teoría más aceptada es la teoría del estrés oxidativo, basada en la hipótesis de que los radicales libres resultantes de la respiración aeróbica, causan un daño oxidativo que se va acumulando en las proteínas, lípidos y ADN. Y además coincide con las teorías de Harman y Gerschman, sobre el papel clave que presenta el ADN mitocondrial como diana principal de los radicales libres (Mandavilli *et al.*, 2002).

2.3.3 Teoría del estrés oxidativo.

La teoría del estrés oxidativo se basa en que los radicales libres que se producen en la respiración aeróbica causan un daño oxidativo, este daño se va acumulando y a la larga esto conlleva a una pérdida de los mecanismos homeostáticos y a la pérdida de la capacidad funcional de la célula (Harman, 1956).

Un radical libre se define como la especie química capaz de existir independientemente y que contenga en la capa electrónica más externa uno o más electrones no apareados. Los radicales libres son inestables y más reactivos que las especies no-radicales (Korc *et al.*, 1995). El concepto de radical libre aplicado en los sistemas biológicos hace referencia normalmente a los radicales libres derivados del oxígeno (ROS).

Durante la respiración aeróbica se genera de forma constante pequeñas cantidades de sustancias reactivas de oxígeno, que en el caso de que no sean neutralizadas pueden producir daño oxidativo a nivel molecular (Sohal *et al.*, 2002). En la mayoría de las células aerobias el oxígeno se consume y es reducido a agua mediante la respiración mitocondrial. Durante este proceso, a veces, puede ocurrir que pequeñas cantidades de oxígeno se metabolizan por otras vías y se produzca una reducción univalente, esto hace que se generen una serie de compuestos intermediarios que constituyen los ROS y estos son: el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, dando finalmente agua (Fig. 2) (Korc *et al.*, 1995).

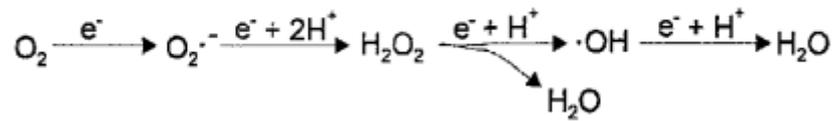


Fig. 2. Esquema de la reducción univalente del oxígeno (Korc et al., 1995)

De esta forma se puede decir que el estrés oxidativo es el desequilibrio entre la cantidad de radicales libres y los mecanismos antioxidantes que protegen a la célula, lo que conlleva a la producción de un daño celular (Bankson *et al.*, 1993).

La teoría del estrés oxidativo sugiere que la intensidad de producción mitocondrial de radicales de oxígeno es menor en los animales longevos que en los de vida corta (Barja, 2005). Por tanto, una intervención terapéutica, como podría ser la administración de antioxidantes, podría retrasar el daño asociado a la edad y al estrés oxidativo (Viña *et al.*, 2008).

2.4 Neuroinflamación en el envejecimiento.

La neuroinflamación se define como la activación del sistema inmune en el cerebro en respuesta a agentes biológicos o químicos, de origen endógeno o ambiental (Streit *et al.*, 2006). Estudios demuestran que, con la edad, la activación del sistema inmune en mamíferos se ve alterada, lo que se denomina *inflammaging* (inflamación asociada al envejecimiento) (Salminen *et al.*, 2008).

La inflamación excesiva va asociada normalmente a enfermedades neurodegenerativas como podrían ser el Alzheimer o el Parkinson. Esto se debe a que en una situación de inflamación hay un aumento de estrés oxidativo, y por tanto se liberan más radicales libres que provocan una situación de mayor daño oxidativo (Spencer et al., 2012).

Entre las vías de señalización que se ven implicadas en la inflamación asociada al envejecimiento, tenemos la vía de NF-κB en la que nosotros nos centraremos. El NF-κB se activa por varios estímulos como lipopolisacáridos bacterianos, virus, estrés oxidativo, luz ultravioleta, radiación ionizante y drogas genotóxicas (Echeverri R y Mockus S, 2008).

El NF-κB se encuentra en el citoplasma en forma inactiva unido a proteínas inhibitoras, en el momento que llega el estímulo en este caso, los ROS producidos por el estrés oxidativo, se fosforilan las proteínas inhibitorias y se activa el NF-κB (Echeverri R y Mockus S, 2008).

2.5 Terapias contra el envejecimiento.

Como hemos explicado, a medida que aumenta el estrés oxidativo, el proceso de envejecimiento se acelera, ya que el ratio prooxidante/antioxidante aumenta. Si la principal causa del proceso de envejecimiento son las especies reactivas del oxígeno, se pueden utilizar nutracéuticos antioxidantes para reducir el nivel de los ROS y retrasar el proceso de envejecimiento (Lee *et al.*, 2004). Por tanto, los antioxidantes son cualquier sustancia que es capaz de retrasar, prevenir o eliminar el daño oxidativo de una molécula (Gutteridge y Halliwell, 2010).

Existen gran variedad de antioxidantes, las células están dotadas de mecanismos de protección adecuados contra cualquier efecto perjudicial de los radicales libres. Existen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), glutato peroxidasa, glutato reductasa o la tioredoxina, también encontramos vitaminas que actúan como antioxidantes (vitamina C) y luego están los compuestos no enzimáticos en los que se incluyen los carotenoides y los polifenoles (Devasagayam *et al.*, 2004).

En nuestra dieta los antioxidantes más abundantes son los polifenoles, siendo sus principales fuentes las frutas y las bebidas derivadas de plantas (zumos de frutas, té, cafés o vino rojo). Los vegetales, los cereales, el chocolate y las legumbres secas también forman parte de la ingesta total de polifenoles (Scalbert et al., 2005). Los mecanismos antioxidantes de los polifenoles se basan en la habilidad de donar hidrógeno y la quelación de iones metálicos, propiedad proporcionada por la presencia de un número variable de grupos hidroxilo fenólicos (Martínez-Flores *et al.*, 2002). Dentro de los polifenoles, los flavonoides son el grupo con mayor actividad antioxidante (Lee *et al.*, 2004), éstos retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

Se postula que los compuestos polifenólicos actúan como miméticos de la restricción calórica (RC), estrategia que consiste en una reducción de la ingesta de calorías sin déficits nutricionales y que hace ya más de 70 años demostró aumentar significativamente la esperanza de vida en ratas de laboratorio (McCay *et al.*, 1935). La restricción calórica induce a un derramamiento de grasa corporal de tejido adiposo blanco, una disminución de la temperatura corporal y un aumento de la sensibilidad a la insulina. Se ha sugerido que entre otras funciones, la restricción calórica ayuda a reducir el daño oxidativo, lo que resulta en una vida útil más larga (Picard *et al.*, 2004). Desde que surgió la hipótesis de que la restricción calórica podía aumentar la esperanza de vida, se han llevado a cabo numerosos estudios con diferentes especies animales e incluso con levaduras, y se ha visto que aumentan hasta un 50% su esperanza de vida (Koubova y Guarente, 2003).

Una de las causas de envejecimiento en la levadura se cree que es la acumulación de círculos de ADN ribosomal extracromosómico (rDNA) debido a la recombinación dentro de repeticiones homólogas (Sinclair y Guarente, 1997). La recombinación en este locus está reprimida por el gen Sir2 (Kaeberlein *et al.*, 1999) y se ha visto que un aumento de la dosis de Sir2 impide la recombinación en el locus rDNA y aumenta la vida útil (Heydari et al., 2007). Sir2 por tanto es una histona que juega un papel regulador clave en la duración de la vida útil en la levadura (Kaeberlein *et al.*, 1999).

El beneficio de RC en levaduras requiere NAD⁺ y Sir2 (Lin et al., 2004), ya que se ha visto que la actividad enzimática de Sir2 es dependiente del NAD⁺ (Guarente *et al.*, 2000). Varios estudios indican que Sir2 podría ser un mediador crítico de los efectos de RC en la vida útil de la levadura (Lin et al., 2000).

En los mamíferos se expresan hasta siete homólogos de Sir2 y se les conoce como sirtuinas (Frye, 2000). Las sirtuinas son desacetilasas NAD⁺ dependientes (Guarente *et al.*, 2000) que, aparentemente, regulan la actividad de muchas otras proteínas relacionadas con el metabolismo energético, supervivencia celular y longevidad (Michan y Sinclair, 2007).

Las sirtuinas, en especial SIRT1, se han estudiado por el papel que juegan en la restricción calórica, la prevención en las enfermedades asociadas con la edad y el mantenimiento de la homeostasis metabólica (Michan y Sinclair, 2007). La restricción calórica incrementa la expresión de SIRT1 en múltiples tejidos (Cohen *et al.*, 2004a).

Además, la proteína SIRT1 tiene un papel regulador sobre la vía de señalización de NF-κB, que puede inhibir la señal de NF-κB, disminuyendo el proceso de inflamación en el envejecimiento (Oeckinghaus y Ghosh, 2009). Por lo que activadores de SIRT1 como son algunos polifenoles pueden reducir la respuesta inflamatoria (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Durante los últimos años parece adquirir fuerza la idea de que muchos de los efectos de los compuestos polifenólicos son modulados por sirtuinas (Guarente *et al.*, 2000). Por este motivo, en este trabajo nos centraremos en cuatro polifenoles diferentes para comparar el efecto que estos tienen

sobre los niveles de SIRT1 y la señalización asociada al cerebro (NF- κ B). Estos cuatro polifenoles son el resveratrol que es un estibenoide, un tipo de fenol natural y un potente antioxidante que se encuentra en la uva roja, las moras y en los cacahuets (Tyhák *et al.*, 2011). La quercetina, se trata de un flavonol, un tipo de flavonoide y se encuentra especialmente en la cebolla (Yang *et al.*, 2008). La naringina que es una flavona, un tipo de flavonoide que se encuentra principalmente en las naranjas y los tomates (Li *et al.*, 2016). Y finalmente la silimarina que se encuentra en el cardo marino. (Fig. 3)

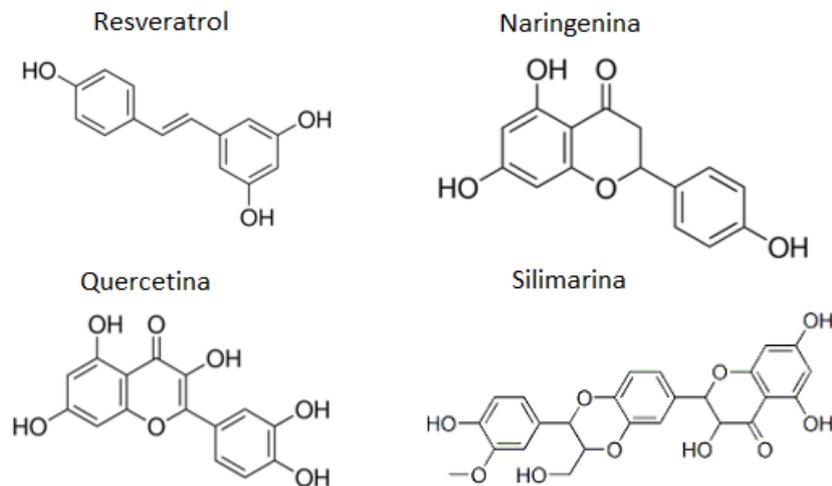


Fig. 3. Estructura molecular de los polifenoles a estudiar.

2.6 Resultados previos.

Los datos mostrados en el presente trabajo son parte de la tesis doctoral de Fiorella Sarubbo que realizó tratamientos crónicos (30 días) con los distintos compuestos polifenólicos en ratas viejas (18 meses; más detalles en el apartado de materiales y métodos, más adelante). Durante estos tratamientos crónicos se realizaron distintas pruebas conductuales a los animales para analizar distintas capacidades cognitivas (radial maze, reconocimiento de objetos, laberinto de Barnes). Estas pruebas conductuales demostraron que los animales viejos presentan un empeoramiento de las capacidades cognitivas, como por ejemplo la memoria de trabajo y el aprendizaje. Además, una vez finalizados los tratamientos, los animales fueron sacrificados, sus cerebros diseccionados y se analizaron el estado de sistemas monoaminérgicos en distintas regiones cerebrales (más detalles en el apartado materiales y métodos), como por ejemplo el hipocampo (región implicada en los procesos de memoria y aprendizaje). Estos análisis se realizaron por HPLC. En estas regiones cerebrales y en concreto en el hipocampo se observó que el envejecimiento cursa con un declive en los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico (además de en el sistema dopaminérgico en otras regiones cerebrales); declive que se ve contrarrestado por los tratamientos crónicos con los distintos polifenoles. Estos tratamientos con polifenoles también produjeron una mejora de las capacidades cognitivas de estos animales viejos.

3. Objetivos.

- 1- Revisión del conocimiento actual sobre los efectos del envejecimiento a nivel cerebral y sobre el efecto neuroprotector de compuestos polifenoles.
- 2- Profundizar en el conocimiento de las técnicas de análisis cuantitativo de proteínas por western-blot.
- 3- Analizar muestras cerebrales, específicamente de hipocampo, generadas en el laboratorio de Fisiología provenientes de tratamientos crónicos en ratas con distintos polifenoles. Comparar el efecto que los diferentes polifenoles tienen sobre SIRT1 y NF-kappaB.
- 4- Analizar e interpretar los resultados obtenidos y correlacionarlo tanto con los datos bioquímicos como con las pruebas cognitivas.

4. Material y métodos.

Este trabajo forma parte de la tesis doctoral de Maria Fiorella Sarubbo, los protocolos utilizados me han sido proporcionados por ella y mi tutor del trabajo de final de grado, David Moranta Mesquida. En este trabajo, nos hemos centrado en el procedimiento de la técnica de Western-blot y su posterior análisis, que nos servirá para determinar el mecanismo de acción de los polifenoles a estudiar.

4.1 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas macho albinas (*Rattus norvegicus*) de dos edades diferentes. Las ratas jóvenes tenían 3 meses (250-350 gr) y las viejas tenían entre 18 y 20 meses (500-550 gr). Estos animales fueron criados en el estabulario de la Universidad de les Illes Balears (Tipo II, Institute for Laboratory Animal Research (ILAR)).

Los animales se mantuvieron en cajas de polipropileno translucidas individuales, con ciclos de 12h de luz/oscuridad, bajo condiciones controladas de temperatura (20-22°C) y humedad (50-60%). Recibieron agua y una dieta estándar de tipo A04 (Panlab®) recomendada para roedores cuya aportación calórica era de 2900 kcal/kg.

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo siguiendo las directrices de la guía ética del Consejo Europeo (European Communities Council Directive 86/609/EEC), cuyos protocolos han sido aprobados por el Comité Local Bioético de la Universidad de les Illes Balears (UIB), España.

4.2 Tratamientos farmacológicos y fármacos.

Para comprobar si el efecto de los antioxidantes es beneficioso a nivel cerebral durante el envejecimiento, se utilizaron diferentes polifenoles: resveratrol, silimarina, quercetina, y naringenina. Para comprobar su efecto, durante el tratamiento se realizaron diferentes pruebas conductuales *in vivo*, entre ellas: *radial maze*, reconocimiento de objetos, laberinto de Barnes y *rotarod*. Finalizados los tratamientos, las ratas fueron sacrificadas y se les diseccionó el cerebro. A partir de estas muestras cerebrales, se analizó como habían afectado estos fármacos a la síntesis y los niveles de monoaminas en el hipocampo, que tiene relación con las funciones cognitivas y motoras. Los resultados tanto de las pruebas conductuales y de los niveles de síntesis y acumulación de monoaminas se muestran en la introducción, en el apartado de resultados previos.

Se realizaron diferentes tratamientos crónicos que consistieron en recibir por vía intraperitoneal una dosis diaria de fármaco, dicha dosis era de 20 mg/kg y siempre a la misma hora, entre las 8:00- 9:00 a.m. Dichas dosis eran preparadas diariamente y en disoluciones con aceite de maíz. Los controles recibían aceite de maíz (1ml/kg vía intraperitoneal), durante el mismo tiempo que las ratas no control.

Tratamientos crónicos con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas (de entre 18 y 29 meses de edad y peso entre 500-550g). Periodo de 30 días de tratamiento y como controles se utilizaron animales del mismo peso, edad y cepa, además de ratas jóvenes (3 meses de edad y peso entre 250-350 g) de la misma cepa, para comprobar el efecto de la edad.

Un día después de la última inyección del tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación a primera hora de la mañana, entre las 7:00-8:00 a.m. Además, media hora antes de ser sacrificados se les inyectó NSD 1015 (100 mg/kg, i.p.) que actúa como inhibidor de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, para así poder estudiar bien la modulación de la síntesis de monoaminas.

A los animales se les extrajo el cerebro y se diseccionó el hipocampo, que en un breve periodo de tiempo fue congelados y guardados a -80°C .

4.5 Análisis de proteínas en muestras cerebrales por *Western Blot*.

Para la detección y cuantificación de las distintas proteínas a estudiar, se procesó el hipocampo, de los animales sometidos a distintos tratamientos. El hipocampo es una de las principales regiones del cerebro, está directamente relacionada con el funcionamiento de la memoria y de las emociones. Con la edad se va perdiendo la memoria y el hipocampo se ve afectado por el envejecimiento, es por este motivo, que realizaremos el análisis de proteínas de esta parte del cerebro.

4.5.1. Preparación de muestras.

Para el procesamiento, se homogenizaron entre 100-150 mg de hipocampo a máxima velocidad, en una proporción de 1:15 peso/volumen de tampón de homogenización (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 2% SDS), que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa. Seguidamente, las muestras fueron sonicadas tres veces durante 5s.

Una alícuota del homogenado fue congelada a -80°C para su utilización en la determinación del contenido proteico según el método del ácido bicinónico. El resto de muestras fueron diluidas 1:1 con tampón de carga (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1,5% SDS; 10% glicerol; 2,5% 2-mercaptoetanol; 0,1% azul de bromofenol), hasta conseguir que las muestras tuvieran una concentración de proteínas final igual a $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Finalmente se desnaturalizaron por calor mediante baño maría a 95°C durante 5 minutos y se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Las muestras se prepararon en tandas de 10 muestras de las que, al menos, dos procedían de animales control, controlando el tiempo de procesado y manteniendo las muestras a una temperatura de 4°C durante el procedimiento.

4.5.2. Determinación del contenido proteico de las muestras.

Para la determinación del contenido proteico se utilizó el método del ácido bicinónico (BCA), la razón por la cual se utilizó esta metodología, es porque en las muestras había detergente aniónico SDS, y éste método es compatible con una concentración de hasta 1% de SDS (Smith *et al.*, 1985).

Se realiza una reacción de Biuret, en la que el enlace peptídico de las proteínas reacciona con el ión cobre II (Cu^{2+}), de esta manera, en un medio alcalino, se reduce a cobre I (Cu^{+}). Dos moléculas de ácido bicinónico reaccionan con una molécula de cobre I para dar coloración púrpura al medio, este complejo es soluble en agua y posee un máximo de absorbancia a 562nm de longitud de onda.

Se preparó una curva patrón y las muestras en una placa multipocillos, para proceder a la lectura de su absorbancia. La curva patrón se hizo a partir de una disolución conocida de albúmina bovina ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), cuyo intervalo de concentración fue de 0,05 a $0,7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Las muestras a cuantificar que nos interesaban, se diluyeron con agua bidestilada ($20 \mu\text{l}$ de muestra con $20 \mu\text{l}$ agua bidestilada). A continuación, se añadieron tanto a las muestras como a la recta patrón 2 ml de reactivo BCA.

Las muestras se procesaron por triplicado y la recta patrón por duplicado. La placa se incubó a 37°C durante 30 min y se dejó reposar a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, para evitar la degradación de los compuestos presentes en ella. Los valores de absorbancia se midieron en un espectrofotómetro a 562 nm. Este espectrofotómetro proporciona automáticamente los valores

proteicos de las muestras al extrapolar sus absorbancias con las de la curva patrón mediante regresión no lineal.

4.5.3. Electroforesis.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE nos permite realizar la separación de las proteínas (Laemmli, 1970) y fue la técnica que se utilizó en este experimento.

Se utilizan geles de poliacrilamida porque son soportes restrictivos que evitan la convección, minimizan la difusión y participan en el proceso de separación de muestras. El SDS interacciona con la mayoría de las proteínas por absorción no específica, y forma complejos con características similares independientemente de la proteína que sea. Cada molécula de SDS proporciona una carga negativa por la cual, las cargas de las propias proteínas quedan anuladas y así todos los complejos proteína/SDS están cargados de forma uniforme. La movilidad electroforética en estas condiciones, depende de la masa molecular de cada proteína. El peso molecular de la proteína se puede determinar mediante comparación con la movilidad electroforética de un control de peso molecular conocido.

Se utilizaron geles con sistema de tampón discontinuo en los que podemos distinguir dos zonas: un gel de concentración de muestras (*stacking*), no restrictivo, compuesto por 4% acrilamida-bisacrilamida, 166 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,2% persulfato amónico y 0,08% N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED); y un gel de resolución o separación (*running*) compuesto por un 8% de acrilamida-bisacrilamida, 0,75 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,05% persulfato amónico y 0,05% TEMED.

En los geles se cargaron de 5 hasta un máximo de 30 μ l de muestra, cargando un volumen final de 30 μ g/ μ l de proteínas en cada muestra. También se cargaron 3 pocillos con un "pool" de 20 μ l (30 μ g/ μ l de proteínas) formado por la mezcla de diferentes muestras de hipocampo de ratas jóvenes. Se utilizaron peines de 15 pocillos, donde sólo los pocillos de ambos extremos se dejaron sin rellenar. En cada gel se cargaron 5 μ l de un marcador estándar de pesos moleculares adecuado para la determinación de los pesos moleculares e identificación de la banda electroforética correspondiente a la proteína en estudio, en este estudio el marcador utilizado fue Prestained SDS-PAGE Standard-Broad-Range (Bio-Rad) constituido por 8 proteínas preteñidas con azul de bromofenol que abarca un rango de pesos moleculares entre 6,4 y 200 kDa.

Una vez las muestras fueron cargadas en el gel de concentración, se sometieron a una corriente continua de 80 V y ya dentro del gel de resolución la intensidad de la corriente se aumentó hasta los 110 V. La electroforesis duró unos 120 minutos, aunque depende del peso molecular de la proteína a estudiar. El tampón de electroforesis en el que estaban inmersos los geles estaba compuesto por: 0,3% Tris base; 1,44% glicina; 0,1% de SDS, el pH de este tampón es de 8,5-8,6.

4.5.4. Electrotransferencia (*western blot*).

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (diámetro de poro de 0,45 μ m) aplicando un campo eléctrico perpendicular al plano del gel, este proceso es conocido como *western blot*. Para la identificación de las proteínas, se utilizaron anticuerpos, técnica que recibe el nombre de *immunoblotting*. Esta técnica se basa en la capacidad que poseen los anticuerpos a reconocer de forma específica determinadas proteínas que actúan como antígenos.

Para realizar la electrotransferencia, el gel y la membrana de nitrocelulosa se colocan empareados entre un conjunto de hojas de papel de filtro y esponjas, sujeto por un armazón de plástico, y

sumergido en el tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl, pH 8,4; 60 mM glicina; 20% metanol). El proceso de transferencia se realizó a 10 voltios durante 45 min. (Fig. 4)

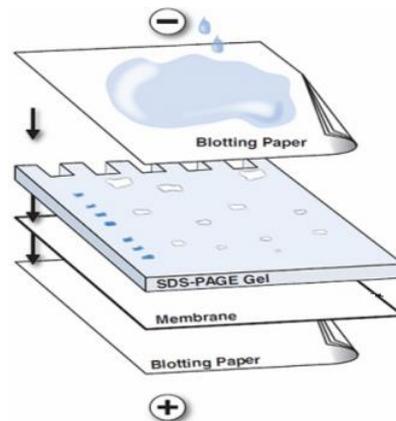


Fig. 4. Esquema representativo de los elementos de la electrotransferencia.

Pasado ese tiempo, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente en una solución bloqueadora, la cual contenía tampón TBS (5% de leche en polvo desnatada y 0,1% Tween 20, monolaureato de polioxietilensorbitan). Las proteínas de esta solución bloqueadora se tienen que unir de forma inespecífica a todas las porciones de membrana que no han absorbido proteínas procedentes del gel tras la electrotransferencia. Esto evitará la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana e incrementará la probabilidad de que sólo se unan a sus respectivos antígenos.

Después del bloqueo, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante 13-16h a 4°C con una suave y continua agitación, con el anticuerpo primario contra las formas fosforiladas de cada proteína analizada. Se repite el mismo proceso para las proteínas totales. Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) que reconoce la serina 310 acetilada de la proteína de 65 kDa **NF-κB** p65 (acetyl K310), fue suministrado por Abcam (USA) (número de catálogo: ab52175, lote: GR45081-2S).

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la proteína de 65 kDa **NF-κB** (p65), que reconoce la serina (ser276) independientemente de su estado de fosforilación, fue suministrado por Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA) (número de catálogo: sc-372, lote: L1610).

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) que detecta la proteína de 110 kDa, fue suministrado por Millipore (Alemania) (número de catálogo: 07-131, lote: 2428681). Este anticuerpo detecta tanto la banda de 110 kDa correspondiente a **SIRT1**.

El anticuerpo monoclonal (isotipo IgG1 de ratón) que detecta la proteína de 55 kDa **α-tubulina**, fue suministrado por Pierce (USA) (número de catálogo: PA186602, lote: PJ1886651).

Tras una serie de lavados de la membrana en tampón TBS, se incubaron con el anticuerpo secundario, que reconoce de forma específica el anticuerpo primario utilizado, durante dos horas. El anticuerpo secundario está conjugado con el enzima peroxidasa de rábano, que fue subministrado por Cell Signaling Technology, Inc (USA, número de referencia: PA186602, lote: PJ1886651).

Por último, se realizaron 3 lavados de 5 min con tampón TBS-tween (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Na₂HPO₄, 1,38 mM KH₂PO₄ pH 7,4, tween 20) y se procedió a la detección de la señal quimioluminiscente.

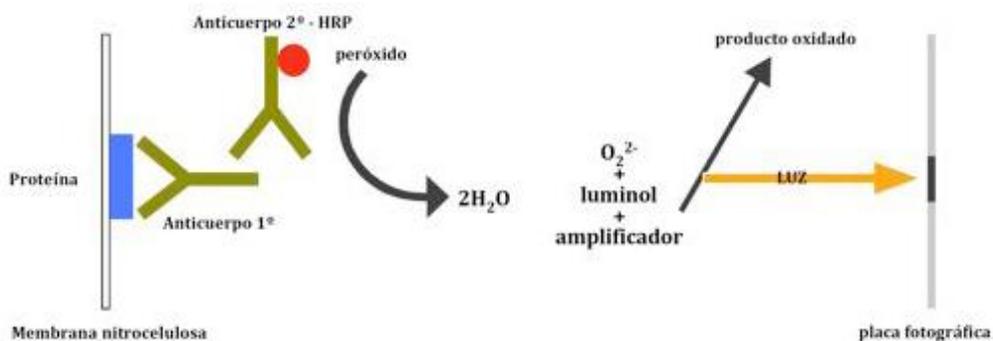
Para la detección inmunológica de las proteínas totales, se utilizaron las mismas membranas de nitrocelulosa en las que antes se habían detectado las formas fosforiladas de estas proteínas. Para ello, se utilizó la técnica de *stripping immunoblot*, que permite eliminar el sistema de detección inmunológico utilizado previamente y reutilizar las membranas para la detección de otras proteínas.

Para realizar *stripping* se mantienen las membranas durante 15 min a 37 °C en el tampón de stripping (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 100 mM 2-mercaptoetanol; 2% SDS). A continuación, se realizan sucesivos lavados con tampón TBS-tween 20 (3-4 lavados de unos 5 min), hasta eliminar completamente el tampón de *stripping*. Luego se vuelve a bloquear las uniones inespecíficas mediante una solución bloqueadora realizada con tampón TBS. Para finalizar se coloca el anticuerpo primario y el secundario siguiendo el mismo protocolo que antes.

4.5.5. Sistema de detección.

La inmunoreactividad fue detectada mediante un sistema de quimioluminiscencia amplificada. Se pusieron las membranas de nitrocelulosa durante un minuto a temperatura ambiente y con los reactivos de revelado que contenían luminol y ácido cumárico en dos soluciones: Solución 1: 2.5 mM luminol, 0.4 mM ácido p-cumárico, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5). Solución 2: 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 0.2mM H₂O₂. Se combinaron ambas soluciones en una proporción 1:1. La enzima peroxidasa de rábano (presente en el anticuerpo secundario) cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno, entonces es cuando el luminol pasa a ser un compuesto inestable y decae con emisión de luz. Un agente fenólico de amplificación es capaz de amplificar más de cien veces la intensidad de esta luz que es emitida (Fig. 5.a). La señal quimioluminiscente emitida llega a un máximo de intensidad entre los 5-20 primeros minutos y posteriormente decae lentamente con una semivida de emisión de unos 60 min (Fig. 5.b). La mezcla de ambas soluciones de revelado, se repartió sobre las membranas y se incubó durante un minuto en la oscuridad. A partir de ese momento, se analizó la emisión de luz por parte de las membranas mediante el sistema de captura de imágenes por quimioluminiscencia GeneGnome XRQ (Syngene, USA).

A)



B)

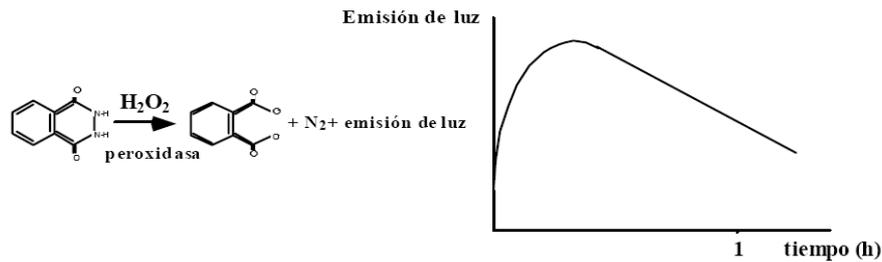


Fig. 5. Sistema de detección de proteínas por quimioluminiscencia mediante sistema ECL.

4.5.6. Cuantificación fotodensitométrica.

Para analizar las imágenes se utilizó un programa llamado *NIHImage program*, desarrollado por U.S National Institutes of Health y que es gratuito. Con dicho programa obteníamos los valores de densidad óptica integrada (DOI) que es la suma de los píxeles que forman la banda inmunoreactiva.

La cuantificación de las muestras se realizó al menos 4 veces en diferentes geles, cada gel cargado con diferentes muestras cerebrales de ratas control o tratadas con los distintos fármacos. Para normalizar los valores de DOI dentro de cada membrana, se compararon en el mismo gel los niveles de inmunodensidad de la proteína que nosotros estábamos estudiando respecto a un control interno *pool* formado por un mix de muestras cerebrales que se cargaba en cada gel por triplicado. Finalmente, se calculó la variación en la inmunoreactividad de cada rata sometida a cada tratamiento específico respecto a las muestras ratas jóvenes (100%) en distintos geles. Y se usó el valor promedio como la estimación final.

4.6 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el software GraphPad Prism 7, para hacer el análisis de la variancia se utilizó el test de una vía ANOVA seguido de un test para analizar la diferencia de cada grupo dos a dos, test de Bonferroni, así como las gráficas correspondientes. Se consideró estadísticamente significativo un nivel mínimo de probabilidad inferior a 0,05 ($P \leq 0,05$) y los resultados se han expresado como media \pm error estándar.

5. Resultados.

En este estudio se realizaron una serie de tratamientos crónicos con distintos polifenoles (resveratrol, quercetina, naringenina y silimarina) en ratas viejas. Estos tratamientos consistían en una administración diaria durante un periodo de 30 días (más detalle en el apartado de material y métodos). El objetivo de este estudio era analizar el efecto protector que ejercían los polifenoles administrados de forma exógena en ratas viejas, con síntomas de envejecimiento cerebral y correlacionarlo con el efecto que tienen sobre los niveles de SIRT1 y la señalización asociada al cerebro (NF- κ B). A continuación, se explican los resultados obtenidos a partir de las pruebas realizadas.

5.1. Efecto del tratamiento crónico con polifenoles: resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina sobre los niveles de SIRT1.

En los últimos años, gran cantidad de autores han considerado que la proteína SIRT1 tenía un papel clave tanto en los procesos de envejecimiento como en la inflamación a través de proteínas como NF- κ B (Oeckinghaus y Ghosh, 2009). Se considera que un descenso en los niveles de expresión de SIRT1 o su inhibición pueden ser la causa del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento (Herskovits y Guarente, 2013). En este trabajo partíamos de la hipótesis de que los polifenoles contrarrestarían este descenso de SIRT1 en ratas viejas, para comprobarlo, se analizaron por *western blot* los niveles de la proteína SIRT1 tras 30 días de tratamiento con polifenoles.

En los resultados se observó en primer lugar, que en ratas viejas había una reducción significativa de SIRT1 respecto a las ratas jóvenes, indicando así, que el envejecimiento provoca un descenso de SIRT1 (Fig. 6).

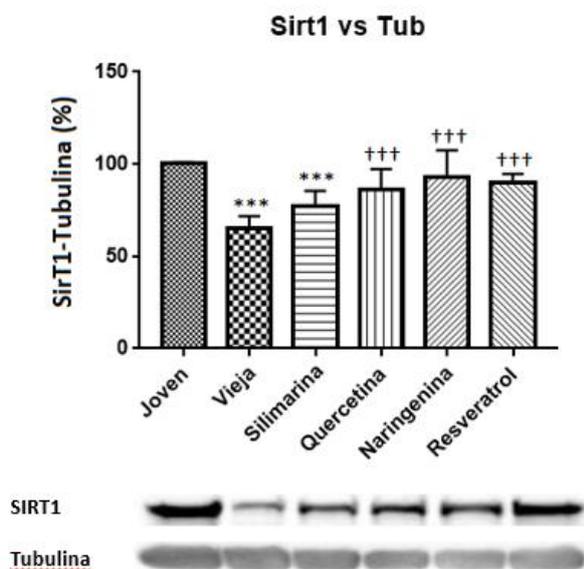


Fig. 6. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con silimarina, quercetina, naringenina y resveratrol en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad de SIRT1 (110 kDa) en hipocampo. Se utilizaron como controles animales jóvenes y viejos a los que se les administró aceite de maíz. Las barras representan la media \pm error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes control. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido por el test de Bonferroni, que detectó diferencias significativas entre los grupos de animales jóvenes, viejos y tratados con silimarina, quercetina, naringenina y resveratrol: *** $p \leq 0,001$ comparando con las ratas jóvenes control, y +++ $p \leq 0,001$ comparando con las ratas viejas control. En la parte inferior de las gráficas se encuentra un inmunoblot representativo de la inmunodensidad de la proteína SIRT1 de 110 kDa, y de la proteína α -tubulina en cada uno de los grupos experimentales.

Por otro lado, se observó que tanto el tratamiento con resveratrol, naringenina y quercetina restauraban de forma significativa los niveles de SIRT1 en ratas viejas. En cambio, en el tratamiento de silimarina, se puede observar que existe un ligero aumento de la proteína respecto a las ratas viejas, pero no es un aumento significativamente importante (Fig. 6). Este aumento no significativo del

tratamiento con silimarina no impide afirmar que los tratamientos con polifenoles muestran un efecto beneficioso en la recuperación de los niveles de SIRT1 durante el envejecimiento.

5.2. Efecto del tratamiento crónico con polifenoles: resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina sobre la vía de señalización NF-κB.

Como hemos dicho antes, el envejecimiento lleva asociado un proceso de inflamación denominado *inflammaging* (Salminen *et al.*, 2008). La vía del factor nuclear NF-κB es considerada como la vía de señalización proinflamatoria típica (Friedman *et al.*, 2002). Además, en el cerebro se ha descrito la implicación de NF-κB en procesos relacionados con la memoria (Spencer *et al.*, 2012).

NF-κB está formado por un complejo heterodimérico, y se encuentra en el citoplasma en forma inactiva (Siebenlist *et al.*, 1994). En el citoplasma, el dímero de NF-κB se une con la proteína inhibitoria IκB y de esta forma todo el complejo está inactivo. Los ROS activan el estado redox de las proteínas quinasas que fosforilan IκB, de forma que se fosforila y se separa del complejo NF-κB, activándolo y permitiendo que entre en el núcleo. Ya dentro del núcleo, NF-κB se puede acetilar, se une a elementos de la región promotora y aumenta la transcripción mediante la inmovilización de histonas acetiltransferasas (HAT), que facilitan una configuración de cromatina abierta lo que permite que los factores de transcripción basal y la ARN polimerasa II se unan con mayor facilidad y se inicie la transcripción (Mayo *et al.*, 2003).

En este trabajo hemos analizado los niveles de inmunoreactividad de la proteína NF-κB en su forma normal y en su forma acetilada en el hipocampo de ratas jóvenes (3 meses), viejas (20 meses) y viejas tratadas con polifenoles: resveratrol, quercetina, naringenina y silimarina (20 mg/kg/día, i.p, 30 días).

Si comparamos primero los resultados obtenidos entre las ratas jóvenes y las viejas, podemos ver que en relación a la vía de señalización NF-κB se mantienen niveles similares de inmunoreactividad de la proteína NF-κB en el hipocampo tanto en ratas jóvenes y viejas (Fig. 7.a).

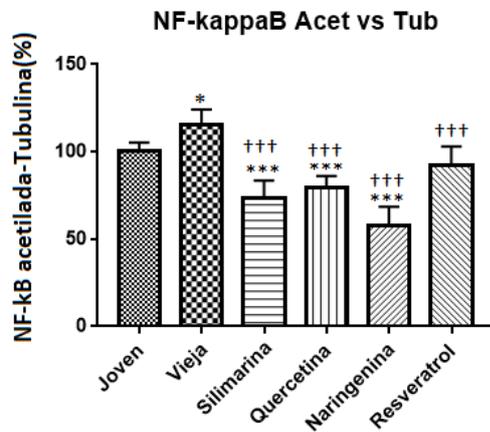
Por otro lado, en el caso de la NF-κB acetilada, se detectaron diferencias significativas debidas a la edad. Las ratas viejas presentaban una mayor inmunoreactividad de la forma acetilada de NF-κB en comparación a las ratas jóvenes. (Fig. 7.b) Como los niveles totales de NF-κB se mantienen constantes, puede afirmarse que durante el envejecimiento se produce un incremento en la forma acetilada de NF-κB, y que este no es debido a un incremento en la cantidad total de la proteína.

Centrándonos en los resultados obtenidos tras el tratamiento crónico con los distintos polifenoles, observamos que en el caso de la proteína NF-κB, el tratamiento con resveratrol es el único que no alteró la inmunoreactividad de NF-κB en ratas viejas. El resto de tratamientos (quercetina, silimarina y naringenina) sí presentaron unos niveles de NF-κB significativamente menores en comparación tanto a las ratas jóvenes como a las ratas viejas. (Fig. 7.a)

Por otro lado, en el caso de la proteína NF-κB acetilada, habíamos dicho que con el envejecimiento se observa un incremento de inmunodensidad de la forma acetilada que se ve revertido tras el tratamiento con polifenoles. Los cuatro tratamientos muestran una disminución significativa de NF-κB acetilada en comparación a las ratas viejas. Las ratas tratadas con resveratrol presentan niveles próximos a los que presentan las ratas jóvenes, lo que nos lleva a pensar que el resveratrol, ya sea de forma directa o indirecta, induce la desacetilación de NF-κB. Los otros tratamientos, no solo se observa que revierten el incremento de la forma acetilada provocada por el envejecimiento, sino que además reducen sus niveles por debajo de los niveles de las ratas jóvenes (Fig. 7.b).

El hecho de observar que tras el tratamiento con quercetina, silimarina y naringina, los niveles tanto de NF-κB y acetilada son significativamente menores en comparación a los niveles de las ratas jóvenes control, nos da a pensar que estos cambios son debidos a los cambios en los niveles de proteína total (NF-κB total) y no a la proporción ni de la forma normal ni acetilada.

a)



b)

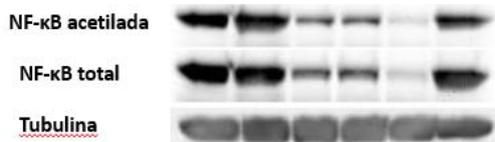
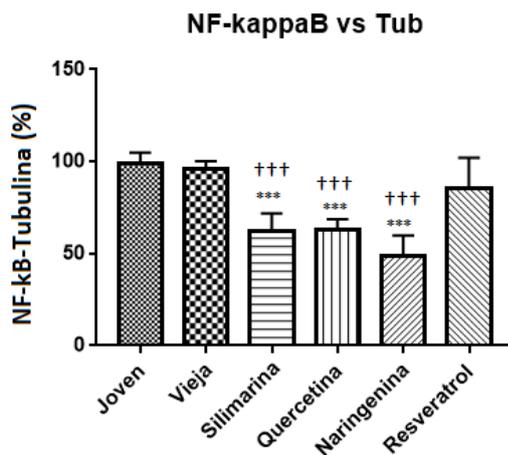


Fig. 7. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con silimarina, quercetina, naringenina y resveratrol en ratas viejas sobre la vía de señalización NF-κB. Se utilizaron como controles animales jóvenes y viejos a los que se les administró aceite de maíz. Las barras representan la media ± error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes control. **A)** Representación gráfica de los niveles de proteína NF-κB. **B)** Representación gráfica de los niveles de proteína NF-κB acetilada. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido por el test de Bonferroni, que detectó diferencias significativas entre los grupos de animales jóvenes, viejos y tratados con silimarina, quercetina, naringenina y resveratrol: * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ comparando con las ratas jóvenes control, y ††† $p \leq 0,001$ comparando con las ratas viejas control. En la parte inferior de las gráficas se encuentra un inmunoblot representativo de la inmunodensidad de NF-κB acetilada, NF-κB y de la proteína α-tubulina en cada uno de los grupos experimentales.

6. Discusión.

El envejecimiento es un fenómeno común en todos los organismos y se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones y los sistemas del cuerpo (López-Otín *et al.*, 2013). Como hemos explicado anteriormente, una de las teorías más aceptadas sobre la causa del envejecimiento sería la acumulación de daño oxidativo (Barja, 2005) y el exceso de los procesos de inflamación (Streit *et al.*, 2006). La neuroinflamación es un mecanismo de defensa que ayuda a proteger el SNC contra infecciones y agentes proinflamatorios (Spencer *et al.*, 2012). En mamíferos, a medida que se aumenta la edad, la activación del sistema inmune se ve alterada y existe lo que se denomina inflamación asociada al envejecimiento (Salminen *et al.*, 2008). Con el objetivo de prevenir o atenuar los síntomas del envejecimiento, muchas de las estrategias están orientadas a reducir la neuroinflamación, ya que ésta actúa como factor clave en el proceso de envejecimiento cerebral.

Entre otros mecanismos celulares que son capaces de modular los polifenoles, está la regulación de proteínas implicadas en el envejecimiento e inflamación, como las sirtuinas. Es por este motivo, que los polifenoles (sustancias antioxidantes) tienen un elevado potencial neuroprotector y pueden ser utilizados para prevenir los síntomas del envejecimiento (Pandey y Rizvi, 2009).

En este trabajo nos hemos centrado en dos proteínas que se ha visto que se ven modificadas tras el tratamiento con polifenoles, por una parte, SIRT1 y, por otra, NF- κ B tanto en su forma normal como acetilada. Primero hablaremos de como la edad afecta a ambas proteínas y luego nos centraremos en el efecto que los polifenoles tienen sobre ellas.

En los resultados obtenidos se observa que disminuye de forma significativa la presencia de SIRT1 en ratas viejas respecto a las jóvenes. Esto es importante ya que en los últimos años diversos estudios han considerado que un descenso de la expresión de SIRT1 pueden contribuir al envejecimiento y a la inflamación (Herskovits y Guarente, 2013). Las sirtuinas son desacetilasas de histonas y proteínas no histonas, motivo por el cual pueden regular la expresión de genes mediante mecanismos epigenéticos. SIRT1 en mamíferos regula la estabilidad genómica, la vía de señalización de NF- κ B y la homeostasis de la glucosa a través de la desacetilación de histonas (Kawahara *et al.*, 2009).

La vía de señalización NF- κ B, está implicada en la transcripción de algunos genes proinflamatorios (Salminen *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que con el envejecimiento aumentan de forma significativa los niveles de NF- κ B acetilada en el hipocampo, ya que se encontró más NF- κ B acetilada en las ratas viejas que en las jóvenes. La acetilación de NF- κ B hace que esta proteína esté activa durante más tiempo y se dé mayor transcripción de genes proinflamatorios. Estos resultados coinciden con investigaciones anteriores, que indican que un exceso de actividad en la vía NF- κ B es uno de los signos transcripcionales del envejecimiento (Quivy y Van Lint, 2004). Relacionado con esto, se ha descrito que una posible manera de ralentizar el envejecimiento, sería inhibir la señalización de NF- κ B, de manera que, se reduciría el estado proinflamatorio que ocurre al envejecer (Salminen *et al.*, 2008).

Esto nos lleva a pensar si existe algún tipo de correlación entre NF- κ B y SIRT1. En el año 2004 Yeung y sus colaboradores fueron los primeros en mostrar que SIRT1 puede interactuar con una proteína del complejo NF- κ B. La interacción entre ambas es muy interesante en la regulación del envejecimiento, ya que SIRT1 podría promover la longevidad inhibiendo la activación de NF- κ B (Yeung *et al.*, 2004).

El mecanismo responsable del descenso de SIRT1 asociado al envejecimiento se desconoce, pero se cree que podría ser el daño oxidativo (Wu *et al.*, 2006). De esta manera, cabría esperar que un tratamiento con antioxidantes en ratas viejas, en este caso, polifenoles, reduciría el estrés oxidativo y

por tanto los niveles de SIRT1 serían similares a los de ratas jóvenes tras el tratamiento. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que efectivamente, los tratamientos con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina aumentan los niveles de SIRT1 en el hipocampo de ratas viejas, obteniendo unos valores próximos a los de ratas jóvenes. Como hemos dicho, el estrés oxidativo está relacionado con el deterioro cognitivo en el envejecimiento, por lo que la activación de SIRT1 a través de tratamientos con polifenoles puede ser una forma de prevenir enfermedades relacionadas con este deterioro como el Parkinson o el Alzheimer por ejemplo.

Cabe destacar que se ha visto que los polifenoles, como el resveratrol y la quercetina por ejemplo, activan SIRT1 tanto de forma directa o indirecta *in vitro* e *in vivo* (Cohen et al., 2004). La activación de SIRT1 por parte de los polifenoles, tiene efectos beneficiosos sobre el estrés oxidativo, la inflamación y la regulación de la restricción calórica, entre otros procesos. Polifenoles como la quercetina y el resveratrol se ha visto que aumentan los niveles y la actividad de SIRT1 mediante la inhibición de NF- κ B (Chung *et al.*, 2010).

Al ver que los tratamientos con resveratrol, silimarina, naringenina y quercetina modulaban los niveles de SIRT1 se pensó que también podrían modular a la vez los niveles de NF- κ B, ya que SIRT1 regula la vía de señalización mediante la desacetilación de histonas. Se realizaron tratamientos con distintos polifenoles sobre NF- κ B en el hipocampo de ratas viejas para conocer así su efecto.

Por una parte, se vio que el resveratrol reduce los niveles de NF- κ B acetilada, sin modificar los niveles totales de NF- κ B. Por otra parte, se observó que los tratamientos con silimarina, quercetina y naringenina provocaban una disminución de NF- κ B acetilada, pero éstos sí que reducían significativamente los niveles totales de NF- κ B.

Estos resultados nos indican que el resveratrol no modula los niveles de NF- κ B pero sí modula la acetilación de ésta. En cambio, los otros polifenoles parece que modulan principalmente los niveles de NF- κ B totales y que los cambios de acetilación que observamos en los resultados son debidos a los cambios en los niveles totales de la proteína. Una posibilidad es que el resveratrol podría actuar eliminando el residuo acetilado de NF- κ B a través de SIRT1 que es una desacetilasa.

En conjunto los resultados sugieren que el envejecimiento provoca un aumento del estado proinflamatorio en el hipocampo, incrementando la acetilación de NF- κ B. Sin embargo, los tratamientos con los polifenoles parecen contrarrestar estos efectos del envejecimiento, reduciendo así la inflamación mediante la disminución de los niveles totales de NF- κ B, que se traduce a un descenso de la transcripción de genes proinflamatorios, en el caso del tratamiento con quercetina, silimarina y naringenina. Estos resultados se ven reforzados por estudios previos que consideran que los polifenoles actúan atenuando la neuroinflamación en ratones viejos (Spencer *et al.*, 2012). En cambio, el resveratrol, ha mostrado unos resultados prometedores que permitirían tratar esta inflamación asociada al envejecimiento mediante fármacos, aunque son necesarios más estudios.

Los resultados obtenidos muestran que los polifenoles tienen unas propiedades beneficiosas, tienen potencial para reducir la sobreactivación de la neuroinflamación asociada al envejecimiento, disminuyendo la expresión y la acetilación de NF- κ B, mediante el aumento de SIRT1 en el hipotálamo de ratas. Este aumento de SIRT1 implica además una mejora en las funciones cognitivas (Bishop *et al.*, 2010), ya que el hecho de que los polifenoles contrarresten la neuroinflamación protege a los sistemas monoaminérgicos cerebrales, y éstos son unos de los responsables de la protección de las capacidades cognitivas (resultados previos obtenidos de estos mismos tratamientos crónicos).

7. Conclusiones.

- 1- El envejecimiento disminuye los niveles de SIRT1 en el hipocampo (área implicada en los procesos de memoria y aprendizaje). Los tratamientos crónicos con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina tienen efectos beneficiosos y previenen esta bajada en el hipocampo de ratas viejas.
- 2- El envejecimiento aumenta los niveles de NF- κ B acetilada y sin afectar a los niveles totales de NF- κ B en el hipocampo. El tratamiento con resveratrol disminuye este incremento de NF- κ B acetilada sin modificar los niveles de NF- κ B total, cosa que nos indica que el resveratrol actúa eliminando el residuo acetilado. En cambio, los tratamientos con el resto de polifenoles modulan los niveles de NF- κ B totales y por tanto, los cambios observados en la acetilación son debidos a este cambio en los niveles de la proteína total.
- 3- La reducción del estado neuroinflamatorio durante el envejecimiento podría ser el responsable de los efectos protectores de estos tratamientos con polifenoles sobre los sistemas monoaminérgicos cerebrales, que a su vez contribuyen a la protección y mantenimiento de las capacidades cognitivas observadas en resultados previos.

8. Bibliografía.

- Bankson D, Kestin M, Rifai N. 1993. Role of free radicals in cancer and atherosclerosis. *Clin Lab Med.* 13:463-480.
- Barja G. 2005. Relación entre el estrés oxidativo mitocondrial y la velocidad del envejecimiento. *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* 40:243-249.
- Bishop NA, Lu T, Yankner BA. 2010. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature.* 464:529-35.
- Chung S, Yao H, Caito S, Hwang J-W, Arunachalam G, Rahman I. 2010. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch. Biochem. Biophys.* 501:79-90.
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, *et al.* 2004. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science.* 305:390-2.
- Devasagayam T, Tilak J, Bloor K, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele R. 2004. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *J Assoc Physicians India.* 52:794-804.
- Echeverri R NP, Mockus S I. 2008. Nuclear factor kB (NF-KB): signalosoma and its importance in cancer and inflammatories diseases. *Rev. la Fac. Med.* 56:133-146.
- Frye RA. 2000. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273:793-798.
- Guarente L, Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependenthistone deacetylase. *Nature.* 403:795-800.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393:561-564.
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology.* 11: 298-300.
- Herskovits AZ, Guarente L. 2013. Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. *Cell Res.* 23:746-758.
- Heydari AR, Unnikrishnan A, Lucente LV, Richardson A. 2007. Caloric restriction and genomic stability. *Nucleic Acids Res.* 35:7485-96.
- Junqué C, Jurado MA. 1994. Envejecimiento y demencias. Barcelona: Martínez Roca.
- Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 13:2570-80.
- Kawahara TLA, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, McCord RA, Ongaigui KCL, Boxer LD, *et al.* 2009. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell.* 136:62-74.
- Korc DI, Bidegain M, Martell M. 1995. Radicales libres Bioquímica y sistemas antioxidantes Implicancia en la patología neonatal. *Rev Med Uruguay* 11:121-135.
- Koubova J, Guarente L. 2003. How does calorie restriction work?. *Genes Dev.* 17:313-21.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.

- Lapuente FR, Pedro J, Navarro S. 1998. Cambios neuropsicológicos asociados al envejecimiento normal. 14:27-43.
- Lee J, Koo N, Min DB. 2004. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 3:21-33.
- Li Q, Wang Y, Zhang L, Chen L, Du Y, Ye T, Shi X. 2016. Naringenin exerts anti-angiogenic effects in human endothelial cells: Involvement of ER α /VEGF/KDR signaling pathway. *Elsevier.* 111:78-86.
- Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* 289:2126-8.
- Lin S-J, Ford E, Haigis M, Liszt G, Guarente L. 2004. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev.* 18:12-16.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194-217.
- Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B. 2002. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat. Res.* 509:127-51.
- Martínez-Flores S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17:271-278.
- Mayo MW, Denlinger CE, Broad RM, Yeung F, Reilly ET, Shi Y, Jones DR. 2003. Ineffectiveness of histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis involves the transcriptional activation of NF-kappa B through the Akt pathway. *J. Biol. Chem.* 278:18980-18989.
- McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. 1935. The Effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size one figure. *J. Nutr.* 10:63-79.
- Michan S, Sinclair D. 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem. J.* 404:1-13.
- Miquel J. 2006. Integración de teorías del envejecimiento (parte I). *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* 41:55-63.
- Oeckinghaus A, Ghosh S. 2009. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1:000034.
- Pandey KB, Rizvi SI. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2:270-278.
- Park DC, Reuter-Lorenz P. 2009. The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annu. Rev. Psychol.* 60:173-196.
- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L. 2004. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature.* 429:771-776.
- Quivy V, Van Lint C. 2004. Regulation at multiple levels of NF-kB-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochem. Pharmacol.* 68:1221-1229.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20:933-956.
- Salminen A, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K. 2008. SIRT1 longevity factor suppresses NF-kB - driven immune responses: regulation of aging via NF-kB acetylation?. *BioEssays.* 30:939-942.

- Sinclair DA, Guarente L. 1997. Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell* 91:1033-1042.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, *et al.* 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
- Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. 2002. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis 1,2. *Free Radic. Biol. Med.* 33:575-586.
- Spencer JPE, Vafeiadou K, Williams RJ, Vauzour D. 2012. Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol. Aspects Med.* 33:83-97.
- Streit WJ, Streit WJ, Kreutzberg GW, Raivich G, Kreutzberg GW, Moran LB, Graeber MB, Streit WJ, *et al.* 2006. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci.* 29:506-510.
- Tyihák E, Király-Véghely Z, Móricz AM. 2011. Multiple beneficial effects of resveratrol and their chemical-biochemical basis. *Nat. Prod. Commun.* 6:631-638.
- Viña J, Borrás C, Miquel J. 2008. Theories of ageing. *IUBMB Life* 59:249-254.
- Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. 2006. Dietary curcumin counteracts the outcome of traumatic brain injury on oxidative stress, synaptic plasticity, and cognition. *Exp. Neurol.* 197:309-317.
- Yang J-Y, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ, Baile CA. 2008. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci.* 82:1032-1039.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. 2004. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 23:2369-2380.