

Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central de Las Villas
Instituto de Angiología y Cirugía Vascular
Centro de Química Farmacéutica

VIMANG, UN POTENCIAL PROTECTOR DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD

Dra. Sulay Loy, Dr. Rafael Simón y Dr. René Delgado

RESUMEN

Se investigó si el VIMANG, un extracto de la corteza del tallo de la *Mangifera indica* L., protege a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación *in vitro* mediada por iones de Cu^{++} . Para esto las lipoproteínas de baja densidad obtenidas por ultracentrifugación a partir de muestras de sangre de voluntarios sanos, fueron oxidadas por incubación con CuSO_4 , a 37 °C durante 3 h, en presencia de diferentes dosis de VIMANG (0,0001-0,1 % w/v), como un modelo para investigar las propiedades antioxidantes de este producto. La peroxidación lipídica fue medida como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Las dosis de VIMANG ensayadas mostraron una acción antioxidante potente. Solo la dosis menor permitió una discreta formación de peróxidos lipídicos en las lipoproteínas de baja densidad al cabo de las 3 h de incubación, al compararse con las lipoproteínas de baja densidad controles. El resultado obtenido constituye una evidencia del posible uso del VIMANG como antioxidante en la prevención o retardo de la aterosclerosis.

DeCS: PERÓXIDOS LIPÍDICOS; LIPOPROTEÍNAS LDL; ATEROSCLEROSIS/ETIOLOGÍA; ATEROSCLEROSIS/prevención y control; PLANTAS MEDICINALES; EXTRACTOS VEGETALES/uso terapéutico; MANGIFERA INDICANS; ANTIOXIDANTES/ uso terapéutico.

La aterosclerosis es un proceso complejo y multifactorial. Existen varios determinantes en la patogénesis de esta condición y factores que desempeñan un papel importante en las diferentes etapas de la evolución de la placa aterosclerótica. Ha sido sugerido que las modificaciones

oxidativas de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) tienen un importante papel en el inicio y desarrollo de esta enfermedad.¹ Las LDL oxidadas son captadas por macrófagos a través de receptores *scavenger*,² y comienza la formación de las células espumosas,

precursoras de la aterosclerosis temprana.³ La presencia de cantidades catalíticas de metales causa la oxidación de las LDL en sistemas *in vitro*.⁴⁻⁶ Diversos estudios han demostrado que la oxidación de las LDL es retardada por antioxidantes como la vitamina E, β -carotenos y ubiquinol contenidos en esta lipoproteína, de igual modo que extractos de plantas medicinales con propiedades antioxidantes retardan este proceso en sistemas *in vitro* así como la aparición de la aterosclerosis en modelos animales *in vivo*.⁷

El VIMANG es un extracto de la *Mangifera indica* L. desarrollado por el Centro de Química Farmacéutica (CQF), cuyas propiedades antioxidantes han sido establecidas. Entre sus componentes se destacan los polifenoles, terpenoides, esteroides, ácidos grasos y microelementos. Martínez y otros demostraron su capacidad inhibitoria de la peroxidación lipídica en cerebro de rata⁸ y en microsomas hepáticos.⁹

El propósito de este estudio fue determinar la capacidad del VIMANG de inhibir la oxidación de las LDL *in vitro*, cuyos resultados preliminares constituyen la base de otros de mayor complejidad con el objetivo de establecer su posible utilidad en la prevención de la aterosclerosis.

MÉTODOS

Extracto de la planta

El extracto fue obtenido a partir de la corteza del tallo de la *Mangifera indica* L. Se preparó por decocción con agua durante 1 h, se concentró por evaporación y se secó por atomización para obtener un polvo carmelita fino.

Separación de LDL

Se obtuvo sangre de voluntarios sanos en tubos plásticos que contenían EDTA (1mg/mL), se centrifugó y se mezclaron los plasmas para obtener un *pool*, el cual se sometió a una ultracentrifugación secuencial por el método de Habel¹⁰ con una centrifuga Beckman L-8M. Inicialmente el plasma se ajustó a una densidad $< 1,006$ g/mL con BrK y se centrifugó durante 18 h a 32 000 rpm y 10 °C para remover a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Una vez tomada estas se ajustó la densidad a 1,063 g/mL y se centrifugó durante 20 h a 40 000 rpm y 10 °C. Las LDL obtenidas fueron dializadas con agitación frente a tampón fosfato salino (PBS, siglas en inglés) con 3 cambios durante 18 h a 4 °C, y posteriormente filtradas (filtros Sartorius de 0,2- μ m).

Determinación de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas en las LDL mediante el método de Lowry.¹¹

Oxidación de las LDL

Se incubaron LDL (0,2 mg/mL) a 37 °C con CuSO_4 (25 mM/L) y con concentraciones crecientes de VIMANG: 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 % (w/v), durante 3 h. Paralelamente, como control se incubaron LDL con CuSO_4 (25 mM/L) en las mismas condiciones.

Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

El contenido de peróxidos lipídicos de las LDL oxidadas se determinó como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico por el método de Buege y otros.¹² Las LDL

oxidadas fueron incubadas con 2 mL de una mezcla de ácido tricloroacético (15 % w/v), ácido tiobarbitúrico (0,37 %) y ácido clorhídrico (25 mol/L). La solución fue calentada durante 20 min en baño de agua a 100 °C. Se adicionaron 2,5 mL de n-butanol y los tubos se centrifugaron a 3 000 rpm durante 10 min. La absorbancia a 532 nm fue medida contra un blanco de n-butanol. Se realizaron mediciones a los tiempos 0, 1, 2 y 3 h. Para contrarrestar el efecto de la coloración del VIMANG durante el procedimiento, se preparó un blanco reactivo para cada una de las dosis, el cual se midió frente al n-butanol.

RESULTADOS

Las dosis de VIMANG estudiadas mostraron una alta capacidad antioxidante. En el rango de dosis ensayadas entre 0,001 y 0,1 % w/v, la inhibición de la oxidación de las LDL alcanzó 100 % en todos los tiempos, con respecto al control (fig.).

Solo la dosis de 0,0001 % w/v inhibió en menor medida la peroxidación lipídica a las 3 h de iniciarse la incubación con CuSO_4 ;

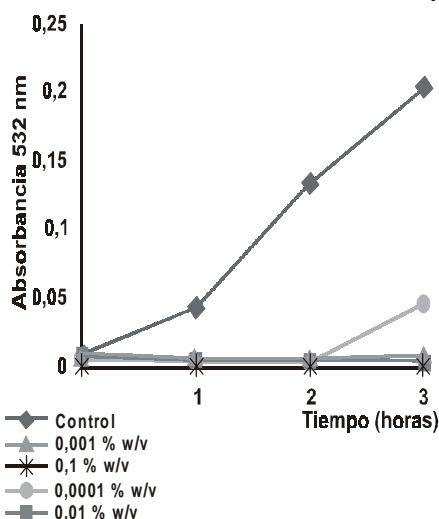


Fig. Efecto inhibitorio de las dosis de Vimang sobre la peroxidación lipídica de LDL inducida por CuSO_4 .

sin embargo, la inhibición alcanzó 80 % aproximadamente, lo cual también se puede considerar como un excelente efecto antioxidante a esta dosis baja.

DISCUSIÓN

Previamente Martínez y otros¹⁰ han demostrado que dosis entre 0,00075 y 0,02 % (w/v) inhiben la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos iniciada por los sistemas ADP/Fe/NADPH o ácido ascórbico /Fe, lo que evidencia un efecto protector del extracto.

Los modelos de oxidación de las LDL con CuSO_4 se basan en la capacidad que tienen los iones de cobre de unirse a la molécula de apo B, e iniciar la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados, debido probablemente a una descomposición catalizada por el cobre de los hidróxidos lipídicos presentes en las LDL, que los conducirá a la formación de un radical peroxil, que puede iniciar una nueva cadena de reacciones de oxidación.

En el presente estudio de manera preliminar se demuestra que el VIMANG es capaz de limitar la oxidación de las LDL a una concentración mucho más baja (0,0001 vs. 0,00075 % w/v) que la utilizada por los autores antes señalados.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el VIMANG tiene un importante efecto antioxidante al proteger a las LDL de la oxidación *in vitro*. Sin embargo, no está claro si este efecto antioxidante está dado bien porque impide la acción catalítica del cobre o porque limita el proceso de generación de radicales peroxilos.

El VIMANG inhibe la formación de peróxidos derivados de los lípidos en las lipoproteínas de baja densidad.

SUMMARY

An investigation was carried out to know if Vimang, an extract from the cortex of the stem of *Mangifera indica* L., protects low density lipoproteins from the *in vitro* oxidation mediated by ions of Cu^{++} . To this end, low density lipoproteins obtained by ultracentrifugation from blood samples of sound volunteers, were oxidized by incubation with CuSO_4 at 37 °C during 3 hours in the presence of different doses of Vimang (0.0001-0.1 % w/v), as a model to investigate the antioxidant properties of this product. The lipid peroxidation was measured as reactive substances to tiobarbituric acid, The assayed doses of Vimang showed a potent antioxidant action. Only the lowest dose allowed a discrete formation of lipid peroxides in low density lipoproteins after 3 hours of incubation on comparing them with the low density lipoproteins controls. The final result is an evidence of the possible use of Vimang as an antioxidant in the prevention or delay of atherosclerosis.

Subject headings: LIPOPROTEINS, LDL; ATHEROSCLEROSIS/etiology; ATHEROSCLEROSIS/prevention & control; PLANTS, MEDICINAL; PLANT EXTRACTS/therapeutic use; *Mangifera indica*; ANTIOXIDANT/therapeutic use.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Westhuyzen J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Update Ann Clin Lab Sci* 1997;27(1):1-10.
2. Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg D. Macrophage oxidation of low-density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* 1986;6:505-10.
3. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CH, White RT, Protter AA. CD-36 is a receptor for oxidized LDL. *J Biol Chem* 1993;268:11811-6.
4. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3883-7.
5. Aviram M, Rosenblat M, Etzioni A, Lecvy R. Activation of NADPH oxidase is required for macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Metabolism* 1996;45:1069-79.
6. Aviram M, Fuhrman B. LDL oxidation by arterial wall macrophages depends on the oxidative status in the lipoprotein and in the cells: role of prooxidants vs. antioxidants. *Mol Cell Biochem* 1998;188:149-59.
7. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1062-76.
8. Martínez G, Delgado R, León OS, Pérez G, Garrido G, Núñez AJ. Evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®). *Phytother Res.* 1999.
9. Martínez G, Giuliani A, León OS, Pérez G, Núñez AJ. Effect of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®) on proteins and hepatic microsomes peroxidation. *Phytother. Res.* 1999.
10. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;51:1486-94.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
12. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. In: Fleicher S, Parker L, eds. *Methods in enzymology*. Vol. 52. London: Academic Press, 1978;302-9.

Recibido: 28 de septiembre de 2001.

Aprobado: 20 de marzo de 2002.

Dr. Rafael Simón. Instituto de Angiología, Calzada del Cerro No. 1551, municipio Cerro, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléfonos: 576493 y 776495.