

Beneficio de la Suplementación de la Vitamina E en Ratas Hipercolesterolémicas

RAQUEL ORÉ, RUBEN VALDIVIESO, INÉS ARNAO y SILVIA SUÁREZ
*Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. Facultad de Medicina.
Universidad Nacional Mayor de San Marcos.*

RESUMEN

OBJETIVO: Evaluar el efecto protector de la vitamina E (500 mg/Kg de dieta) sobre la generación de radicales libres, involucrados en la formación de placas de ateroma. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se usó como modelo experimental ratas machos Sprague-Dawley, durante 3 meses, separados en cuatro grupos: 1) dieta control, 2) dieta control más vitamina E, 3) dieta hipercolesterolémica (3%) más vitamina E, y 4) dieta hipercolesterolémica sola. Se evaluó el perfil lipídico y la peroxidación lipídica en suero y tejido aórtico. **RESULTADOS:** La dieta hipercolesterolémica, en ausencia o presencia de vitamina E (12 mg/día), produce incremento significativo ($p < 0,05$) de los niveles de triglicéridos, colesterol total y LDL; y una disminución significativa de HDL ($p < 0,05$), respecto al control. En el grupo 4 hubo una elevación significativa de los niveles de peroxidación lipídica ($p < 0,05$) en suero y tejido aórtico, comparado con los demás grupos. **CONCLUSIÓN:** La vitamina E ejerce un papel protector sobre la peroxidación lipídica sérica y en tejido aórtico, aun cuando no mejora el perfil lipídico.

Palabras claves: Aterosclerosis; Vitamina E; Peroxidación de lípido, Investigación.

VITAMIN E SUPPLEMENTATION BENEFITS IN HYPERCHOLESTEROLEMIC RATS SUMMARY

OBJECTIVE: To assess the vitamin E protective effects against free radicals generation, as it is involved in atheroma plate formation. **MATERIAL AND METHODS:** We used adult Sprague-Dawley rats as experimental models during three months, arranged into four groups: 1) Control diet group; 2) Control diet plus vitamin E (500 mg/Kg of food) group; 3) cholesterol-rich diet (3%) plus vitamin E group, and 4) cholesterol-rich diet group. Lipid profile and lipid peroxidation were measured both in serum and aortic tissue. **RESULTS:** The cholesterol-rich diet caused a significant increase ($p < 0,05$) in serum triglycerides, and total and LDL cholesterol levels and a significant decrease in HDL cholesterol ($p < 0,005$) levels despite vitamin E (12 mg/day) supplementation. Group IV showed a significant increase ($p < 0,005$) in lipid peroxidation in serum and aortic tissue. **CONCLUSIONS:** Vitamin E provided protection against both serum and aortic tissue lipid peroxidation but does not improve the lipid profile.

Key words: Atherosclerosis; Vitamin E; Lipid Peroxidation, Research.

Correspondencia:

*Dra. Raquel Oré Sifuentes
Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición
Facultad de Medicina - UNMSM
Av. Grau 755. Lima 1, Perú
E-mail: raquelos@latinmail.com*

INTRODUCCIÓN

La hipercolesterolemia produce daño endotelial, pero los mecanismos que causan esta injuria no están completamente aclarados. Probablemente el endotelio, células musculares lisas, neutrófilos, monocitos y plaquetas puedan ser la fuente de radicales libres (RL), los cuales generarían el estrés oxidativo (1-4).

El daño oxidativo que se produce por el desequilibrio entre fenómenos antioxidantes/proxidantes parece crucial en el origen de la aterosclerosis, y esto aumenta la posibilidad que los antioxidantes -como la vitamina C, betacaroteno y en especial el alfatocoferol (vitamina E)- puedan prevenir o retardar el desarrollo de esta enfermedad (5).

Esta vitamina E constituye el mejor sistema de neutralización de RL generados en medios lipídicos, siendo muy efectiva para prevenir la lesión causada por los RL en las membranas celulares o en las lipoproteínas (6).

Estudios recientes sugieren que la génesis de la lesión ateromatosa de la pared arterial involucra la incorporación de la LDL oxidada a los monocitos-macrófagos arteriales, que se convierten así en células espumosas, núcleo fundamental del ateroma (6,7). Secundariamente proliferan otros tipos celulares, especialmente células musculares lisas, originando la placa de ateroma madura.

Este LDL oxidado no es reconocido por el receptor de LDL, sino por un grupo de receptores llamados *scavenger* o "basureros", a los que inicialmente se les atribuyó un papel protector, por su capacidad de captar el exceso de LDL circulante. Sin embargo, en la actualidad se indica que son estos receptores los que tendrían una actividad proaterogénica (8-11).

De las evidencias antes mencionadas, es posible sugerir que la hipercolesterolemia puede incrementar la formación de RL, los que tendrían efectos citotóxicos y causarían peroxidación lipídica de la membrana.

El objetivo del presente trabajo es estudiar el papel antioxidante de la vitamina E en animales de experimentación sometidos a una dieta rica en colesterol (3%), teniendo como referencia el perfil lipídico y la disminución de la formación de malondialdehído, usado como marcador de lipoperoxidación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Se usó ratas machos Sprague-Dowley (20) de un peso aproximado de 160-180 g, los cuales fueron colocados en jaulas independientes. Las condiciones ambientales fueron: temperatura promedio 22-25°C, humedad 75% y un fotoperíodo de 12 horas.

Los animales de experimentación fueron separados en 4 grupos como sigue: Grupo I, dieta control; Grupo II, dieta control + vitamina E (500 mg/Kg de dieta); Grupo III, dieta hipercolesterolémica (3%) + vitamina E, y Grupo IV, dieta hipercolesterolémica.

El consumo de alimentos y peso fue controlado diariamente durante el período que duró el experimento. Después de 3 meses, los animales, previo ayuno de 14 horas, fueron anestesiados y luego sacrificados, colectándose la sangre y el tejido aórtico.

Preparación del homogenizado del tejido aórtico

El tejido aórtico fue extraído rápidamente y homogenizado al 10% en un Potter Elvehjem con tampón fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 7,0.

Métodos analíticos

1. Triglicéridos y colesterol total: Métodos enzimáticos, según Trinder (12).
2. LDL: Se determinó por precipitación selectiva mediante el uso de heparina. Dicho valor se obtiene por diferencia entre los valores de colesterol total y los de VLDL y HDL (12).

3. HDL: Se obtiene precipitando selectivamente las lipoproteínas LDL y VLDL, y quedando la HDL en solución, en la cual se determina el colesterol (12).
4. Malondialdehído (MDA): Se determinó en suero fresco y tejido aórtico, según el método de Buege (13) con algunas modificaciones. El fundamento es la reacción de MDA, producto de lipoperoxidación con el TBA; la formación del complejo MDA-TBA tiene absorbancia a 535 nm.

Se presenta los valores estadísticos como media, desviación estándar y la prueba significativa *t* de Student por la diferencia de medias (14).

RESULTADOS

Los grupos III y IV, que correspondieron a ratas con dietas ricas en colesterol, presentaron niveles altos en el perfil lipídico, existiendo diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto a los grupos controles I y II. Esto es más evidente cuando se determina la relación LDL/HDL, en la que el incremento es 320% (Tabla 1).

Los valores de lipoperoxidación en suero y tejido aórtico se presentan en la Tabla 2, en la que se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) en los grupos que recibieron suplemento de vitamina E (grupos II y III) al ser comparados con sus respectivos controles (grupos I y IV).

Tabla 2.- Niveles de lipoperoxidación en suero y tejido aórtico según tipo de dieta.

Grupo	MDA sérico 10 ⁻⁶ M	MDA tejido aórtico mmol/g 10 ⁻⁶
I	3,96 ± 0,22*	2,40 ± 0,13*
II	2,69 ± 0,14*	1,19 ± 0,10*
III	3,54 ± 1,12 [§]	1,04 ± 0,08 [§]
IV	6,27 ± 0,19 [§]	5,16 ± 0,19 [§]

Grupos: I Dieta Control.
 II Dieta Control + Vit E,
 III Dieta Hipercolest. + Vit E.
 IV Dieta Hipercolest. + Vit

MDA: Malondialdehído

Diferencia significativa: * $p < 0,05$ § $p < 0,005$

Esta reducción fue, en general, mayor en el tejido aórtico (50%) que a nivel sérico (32%), cuando se comparó el grupo II con su control.

El efecto más notorio del suplemento vitamínico en la prevención de la lipoperoxidación se observó en el grupo III, en donde la disminución fue 50% y 80% en la determinación sérica y aórtica, respectivamente (Figura 1).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, examinamos si el suplemento de vitamina E (12 mg/día) a ratas hipercolesterolémicas podría mejorar las defen-

Tabla 1.- Perfil lipídico en ratas según tipo de dieta.

Grupo	TG mg/dL	CT mg/dL	HDL mg/dL	LDL mg/dL	LDL/HDL
I	1,00 ± 0,06*	0,99 ± 0,04*	0,36 ± 0,03*	0,62 ± 0,03*	1,73
II	0,99 ± 0,08 [§]	0,92 ± 0,02 [§]	0,29 ± 0,06 [§]	0,60 ± 0,01 [§]	2,04
III	1,45 ± 0,03 [§]	1,19 ± 0,06 [§]	0,16 ± 0,04 [§]	1,07 ± 0,04 [§]	6,60
IV	1,21 ± 0,15*	1,18 ± 0,07*	0,18 ± 0,01*	1,00 ± 0,05*	5,50

Grupos: I Dieta Control;
 III Dieta Hipercolesterolemica + Vit E;

II Dieta Control + Vit E;
 IV Dieta Hipercolesterolemica.

Diferencia significativa: * $p < 0,05$ § $p < 0,005$

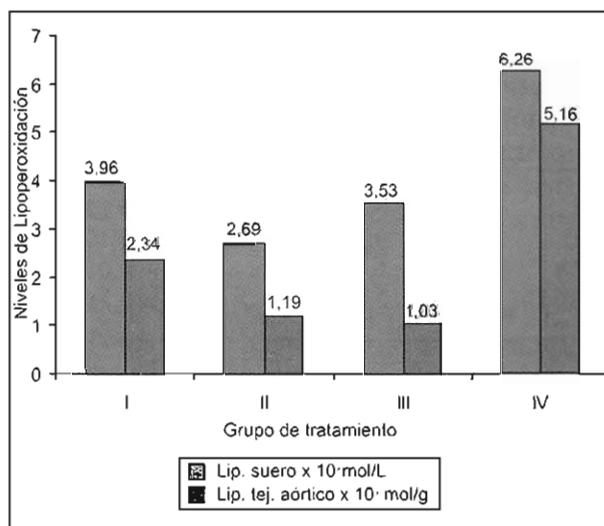


Figura 1.- Niveles de lipoperoxidación en suero y tejido aórtico según grupo de tratamiento.

sas antioxidantes y así evitar la oxidación de la LDL, lo cual ha sido propuesto como factor relevante en la aterogénesis.

Después de 3 meses de tratamiento, se observó en suero un incremento de colesterol total, LDL y triglicéridos en el grupo de animales que recibieron una dieta alta en colesterol (3%), en presencia y ausencia de vitamina E. El incremento de colesterol total podría deberse al aumento de los componentes de la LDL, que sería oxidada y tardaría en depurarse del torrente sanguíneo⁽¹⁵⁾. De esta manera, la LDL oxidada atraviesa el endotelio y es captada por los macrófagos, generando las placas de ateroma. Sin embargo, la LDL es una molécula compleja, constituida por una parte proteica, lípidos neutros y apolares y antioxidantes lipofílicos representados fundamentalmente por la vitamina E y el betacaroteno. Teniendo en cuenta que en nuestro trabajo se administró vitamina E, ésta se acumularía en la LDL y de esta manera la protegería frente a la "oxidación" causada por los radicales libres.

Datos reportados por Witzum⁽¹⁾ demuestran que un suplemento adecuado de vitamina E au-

menta su contenido en la LDL, protegiéndola frente a la oxidación. Sin embargo, en el ser humano se requiere suplementos de vitamina E de 1-2 g/día para saturar a la LDL y así disminuir la susceptibilidad a la peroxidación lipídica.

Esta última hipótesis estaría apoyada por los resultados obtenidos en nuestra investigación, ya que ambos grupos que recibieron un suplemento de vitamina E (con dieta hipercolesterolémica y con dieta normal), muestran marcada disminución de la lipoperoxidación ($p < 0,005$), comparado con los grupos que no recibieron suplemento de vitamina E. Por lo tanto, el suplemento de vitamina E puede favorecer la capacidad antioxidante en el suero y proteger contra la lipoperoxidación *in vivo*.

El nivel de triglicéridos es crucial en la modulación del comportamiento metabólico de las lipoproteínas; así, una hipertrigliceridemia supone un incremento en los niveles de lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL y quilomicrones), lo cual tiene una profunda repercusión en la cantidad, calidad y en la función de las lipoproteínas transportadoras de colesterol (LDL y HDL).

En el ser humano se ha encontrado actividad de una proteína transferidora de colesterol (CETP) que promueve el intercambio de ésteres de colesterol y triglicéridos entre los diferentes tipos de lipoproteínas, de tal manera que capta los ésteres de colesterol de la HDL y los entrega -a cambio de triglicéridos- a las lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL y quilomicrones). Estas HDL que recibieron triglicéridos adquieren menor tamaño y menor densidad, disminuyendo su vida media, por lo que son rápidamente retiradas de la circulación^(16,17).

Un fenómeno similar se observa en el grupo de animales que recibieron colesterol más suplemento de vitamina E, lo cual nos lleva a pensar que las ratas también presentarían la CETP, la cual probablemente originaría una HDL rica en triglicéridos, que sería rápidamente depurada del torrente sanguíneo, disminuyendo sus niveles con respecto al grupo control.

Datos reportados por Diez (18) muestran que un suplemento de vitamina E a conejos Watanabe (genéticamente hiperlipidémicos) y a hamsters que recibieron una dieta hipercolesterolémica sólo redujeron la aterosclerosis, mientras que los cambios en el perfil lipídico fueron confusos.

Estas diferencias halladas entre nuestros resultados y los reportados por Diez pueden deberse a las diferentes dosis de vitamina E usadas, al modelo experimental y al tiempo del tratamiento para inducir la aterosclerosis.

El efecto protector de la vitamina E en el desarrollo de la aterosclerosis (15) también ha sido demostrado en conejos, los que recibieron una dieta hipercolesterolémica (2%) más vitamina E (50 mg/Kg), encontrándose una prevención en la formación de lesiones ateroscleróticas en la aorta.

Una de las estructuras más sensibles al daño oxidativo causado por los radicales libres son las membranas lipídicas, lo cual puede ser medido por la formación de productos generados en la lipoperoxidación, tanto *in vivo* como *in vitro*. En nuestro caso, medimos productos secundarios de la degradación lipídica, es decir, la formación de malondialdehído (MDA).

En general, hubo una menor formación de MDA en el tejido aórtico que a nivel sérico en los grupos que recibieron suplemento con vitamina E, siendo esta disminución más acentuada en el grupo hipercolesterolémico.

Los valores más altos de lipoperoxidación se observó en el grupo IV, tanto a nivel sérico como aórtico. En cambio, las ratas que consumieron una dieta rica en colesterol + vitamina E (grupo III) presentaron valores de lipoperoxidación que tienden a alcanzar los del grupo control (grupo I).

Estos hallazgos son similares a los de otros estudios realizados en nuestro laboratorio en ratas diabéticas [datos no publicados].

Los valores disminuidos de lipoperoxidación observados en animales que recibieron vitamini-

na E demostrarían una mayor resistencia de la LDL a la "oxidación" y de este modo la lipoperoxidación disminuye en el torrente sanguíneo.

En conclusión, la administración de vitamina E a animales hipercolesterolémicos no mejoró el perfil lipídico. Sin embargo, los niveles de malondialdehído en suero y tejido aórtico disminuyeron significativamente en los animales que recibieron una dieta con suplemento de vitamina E, lo cual sugiere que la vitamina E protegió de la lipoperoxidación a los animales que recibieron una dieta rica en colesterol más vitamina E.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a la Mg. Doris Huerta Canales por la revisión del manuscrito y a la Sra. Vilma Cabezas Arroyo por su apoyo logístico.

El presente trabajo fue financiado por el Fondo Especial de Desarrollo Universitario de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos - 1996 [Partida N° 6010508].

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Witztum JL. La oxidación como hipótesis de la aterosclerosis. *Lancet [Ed. en Español]* 1995;26(2):113-6.
- 2) Salonen JT, Nyyssonen K, Salonen R, Porkkatas Arotoho E, Toumainan T, Diezfalusy V, Björkhem I. Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis. *Circulation* 1997;5:840-4.
- 3) Huynn L. Combination therapy of cholesterol reduction and L-arginine supplementation controls accelerated vein graft atheroma. *Ann Vasc Surg* 1999;13:484-93.
- 4) Hiltunen T, Luoma J, Nikkari T, Yla-Herttuala S. Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions. *Circulation* 1988;97:1079-86.
- 5) Miller III ER, Appel LJ, Risby TH. Effect of dietary patterns on measures of lipid peroxidation. *Circulation* 1998;98:2390-5.
- 6) Bonet Serra B, Viana M, Arribas, E, Herrera C. Efectos teratogénicos de la diabetes. Papel de los radicales libres. *Endocrinología* 1998;45:292-7.

- 7) **Bernedo L.** Intervienen los triglicéridos en la patogenia de la aterosclerosis. *Caduceus* 1998;1(3):8-14.
- 8) **De Rosa JF.** Estado actual de la terapéutica antioxidante: oxidación y antioxidante. *Rev Fed Arg Cardiol* 1998;27:496-8.
- 9) **De la Masa MP, Hirsch B, Garrido A.** Nuevas piezas en el puzzle de la aterosclerosis. *Rev Med Chile* 1999;127:966-1003.
- 10) **Lapenna D, De Gioio S, Ciofani G, Mezzeti A, Ucchino S, Calafiore A, Napolitano AM, Hio CD, Cumerullo F.** Glutathione-related antioxidant. Defenses in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998;97:1930-4.
- 11) **Gonzales MR, Sanz I, Rojas N, Silva V, Kirsten B, Bustamante M.** Efecto inmunosupresor in vitro de las lipoproteínas de baja densidad. *Rev Med Chile* 1999; 127:1305-11.
- 12) **Trinder.** *Vademecum de laboratorio.* Rosario- Argentina. Wiener. 1998.
- 13) **Buege JA, Aust SD.** *Methods in Enzymology* 52:302-10. NY:Academic Press. 1987.
- 14) **Moya CG, Saravia A.** *Probabilidad e Inferencia Estadística.* 2ª Edición. 1988.
- 15) **Ozer NK, Azzi A.** Effect of vitamin E on the development of atherosclerosis. *Toxicology* 2000;148(2-3):179-85.
- 16) **Can Bruce R, Chovinard A, Tall AR.** Plasma lipid transfer. Protein, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr* 1998;18:297-330.
- 17) **Gamboa R, Lina A.** Lipoprotein y riesgo cardiovascular. *Diagnóstico* 1999;38(3):124-33.
- 18) **Diez MN, Frei B, Vita JA, Keaney Jr JF.** Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997;7:408-14.