

ARTICULO**Efectos del Pycnogenol y Vitamina E, sobre la actividad de la Glutación Peroxidasa y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica.**

Leticia Figueira¹, Julio César González M^{1,2,3}, Molly Armas² y Aldo Reigosa^{2,3}.

¹Laboratorio de Investigaciones del postgrado de la Escuela de Bioanálisis.

²Departamento de Morfofisiopatología de la Escuela de Bioanálisis

³Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas (CIMBUC); Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

Correspondencia: Julio C. González

E-mail: jcgonzal@uc.edu.ve

Recibido: Julio 2009 **Aceptado:** Octubre 2010

RESUMEN

Los antioxidantes han sido empleados para retardar o inhibir la aterosclerosis. El objetivo del presente estudio fue comparar el efecto del Pycnogenol (Pyc) y la Vitamina E (Vit E) por separado y en combinación, sobre la actividad de la Glutación peroxidasa (GPx) y la formación de ateromas en conejos. Se estudiaron 50 conejos machos divididos en 5 grupos: Grupo1: conejarina y vegetales, Grupo2: huevo y conejarina, Grupo3: huevo, conejarina y Pyc, Grupo4: huevo, conejarina y Vit E, Grupo5: huevo, conejarina, Pyc y Vit E. Las dosis fueron: Pyc (5mg/día), Vit E (200mg/día). El período experimental duró 12 semanas. Se determinó perfil lipídico por métodos enzimáticos, actividad de GPx por cinética y Vit E por HPLC en 0, 6ta y 12va semana. Los conejos fueron sacrificados y se les realizó estudio histológico de su aorta. Los resultados revelaron aumento de la GPx en los grupos 2, 3, 4 y 5 con respecto al control desde la 6ta semana de experimentación ($p<0,05$). Hubo retardo e inhibición de lesiones ateroscleróticas en los conejos suplementados con antioxidantes. En conclusión en condiciones de hiperlipidemia con o sin suplementación de antioxidantes, existe incremento en la actividad de GPx; asimismo, la suplementación de antioxidantes disminuye y evita la progresión de ateromas.

Palabras clave: Pyc, Vit E, GPx, Aterosclerosis, Antioxidantes.

ABSTRACT**Effect of Pycnogenol and Vitamin E, on Glutathione Peroxidase Activity and atheroma formation, in rabbits exposed to a hyperlipidaemic diet.**

Antioxidants have been used to slow down or inhibit atherosclerosis. The objective of the present study was to compare the effect of Pycnogenol (Pyc), and Vitamin E (Vit E), separately and combined, on serum Glutathione peroxidase activity (GPx), and on the formation of aortic lesions in rabbits. 50 rabbits were studied: Group1: "conejarina" (commercial rabbit food) and vegetables; Group2: egg and conejarina, Group3: egg, conejarina and Pyc, Group4: egg, conejarina and Vit E, Group5: egg, conejarina, Pyc and Vit E. The doses were: Pyc (5mg/day), Vit E (200mg/day). The experiment lasted 12 weeks. Lipid profile was done by enzymatic methods, GPx by kinetic method and Vit E by HPLC, in weeks 0, 6 and 12. Histological study of rabbit's aorta was done. GPx in groups

2, 3, 4 and 5 increased, compared with controls, from week 6 and 12 of experimentation ($p < 0,05$). There was delayed and inhibition of aortic lesions in groups 3, 4 and 5. In conclusion, under hyperlipidaemic conditions, with or without antioxidants supplementation, activity of GPx is increased. Antioxidants reduce and prevent the progression of atheromas.

Key words: Pyc, Vit E, GPx, Atherosclerosis, Antioxidants.

INTRODUCCIÓN

La aterosclerosis es una enfermedad inmuno inflamatoria crónica que afecta la pared de los vasos sanguíneos (1-3). Existen varias evidencias que indican que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en la patogénesis y desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, entre las que se incluyen la aterosclerosis (4). Sin embargo, la susceptibilidad de las células a los daños producidos por los radicales libres, es función del balance general entre el grado de estrés oxidativo y la capacidad de defensa de los antioxidantes (5,6). Este sistema de defensa, está compuesto tanto por vitaminas como vitamina E (Vit E) y el pycnogenol (Pyc), como por enzimas antioxidantes como la glutación peroxidasa (GPx). La Vit E es un antioxidante liposoluble, cuya forma más abundante en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es el α -tocoferol (α -TOC) (7,8). Diversos estudios indican que la Vit E puede disminuir la oxidación de las LDL y retardar la progresión de la aterosclerosis (9). Por su parte, el Pyc es un flavonoide natural hidrosoluble, extraído de la corteza del Pino marino Francés, el cual ha demostrado tener propiedades antioxidantes, anti inflamatorias, y disminuye la formación de ateromas en animales de experimentación (9,10). La GPx es un término que describe a una familia de enzimas (EC1.11.1.9.), que tienen actividad peroxidasa. Esta enzima constituye un importante sistema de defensa antioxidante; siendo una de las defensas endógenas más importantes del organismo frente a la producción de radicales libres (11,12). Por lo tanto, tomando en cuenta que la evolución y progresión de la aterosclerosis puede ser interrumpida o disminuida por la acción de los antioxidantes (13), y que la GPx es un antioxidante cuya deficiencia conlleva a la disfunción endotelial (14), en este estudio se comparó el efecto que tiene el Pyc y la Vit E por separado y su combinación, sobre la actividad de la GPx y sobre la formación de ateromas en conejos macho Nueva Zelanda expuestos a una dieta hiperlipidémica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra y diseño experimental. Se utilizaron 50 conejos macho raza Nueva Zelanda de doce semanas de edad con un peso entre 1,350 – 1,400 Kilogramos, provenientes del Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC, Caracas, Venezuela). Después de una semana de ambientación en el Bioterio Experimental de la Universidad de Carabobo (UC) (Valencia, Venezuela), los conejos fueron divididos aleatoriamente en 5 grupos de 10 conejos. Cada conejo fue alimentado diariamente de la siguiente manera: **Grupo 1 (control):** 150 gramos de zanahoria y lechuga, 150 gramos de conejarina (Protinal, Venezuela). **Grupo 2:** un huevo completo hervido y 150 gramos de conejarina. **Grupo 3:** un huevo completo hervido, 150 gramos de conejarina y 5 mg Pyc. **Grupo 4:** un huevo completo hervido, 100 gramos de conejarina y 200 mg de Vit E (DL- α -TOC acetato). **Grupo 5:** un huevo completo hervido, 100 gramos de conejarina, 5 mg Pyc y 200 mg de Vit E. Los antioxidantes suministrados fueron mezclados con el alimento, y se vigiló a diario el consumo del mismo.

Todos los conejos consumieron agua a libre demanda. El periodo experimental tuvo una duración de doce semanas. Todos los conejos fueron pesados antes, durante y después de la experimentación. Los procedimientos de cuidado de los animales fueron llevados a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (15). El experimento fue realizado rigurosamente según las normas éticas del Bioterio Central de la UC. Estos animales estuvieron bajo la vigilancia del personal del bioterio a lo largo del estudio.

Análisis químico de los alimentos: Conejarina G granulada marca Protinal: Maíz, sorgo, afrechillo de trigo, harinas de maíz, ajonjolí, algodón, girasol y soya, concha de arroz, bagacillo de caña, pasto deshidratado, melaza, grasa estabilizada, carbonato y fosfato de calcio, sal, minerales "trazas" (cobalto, cobre, hierro, manganeso, yodo y zinc) suplementos de las vitaminas A, B₂, B₁₂, C, D₃, E, ácido pantoténico y niacina, antioxidante, suplemento antibiótico y anticoccidial. Proteína cruda 12%, grasa cruda 1%, fibra cruda 20%, extracto libre de nitrógeno 42%. **Huevo** (16): Cada huevo contiene aproximadamente 300 mg de colesterol en su yema. El porcentaje de colesterol en cada ración de alimento para los grupos 2,3,4,5 fue de 0,12%.

Determinaciones bioquímicas: Las muestras de sangre fueron extraídas por punción intracardiaca bajo anestesia a todos los conejos previo ayuno de 14 horas en la semanas 0, 6ta y 12da. Las muestras de suero fueron conservadas en congelación a -70°C hasta el momento del procesamiento. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) por métodos enzimáticos colorimétrico directo (Wiener Lab, Argentina). El colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) se realizaron por extracción y posterior determinación enzimática (Wiener Lab, Argentina). La actividad de la GPx fue determinada por ensayo cinético (Cayman Chemical, EEUU). El α -TOC se determinó por separación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) isocrático de fase reversa (17), se usó el equipo HPLC Hewlett – Packard equipado con columna Sherisorb C-18, empleando como fase móvil metanol – agua (95:5 v/v). Con detección a 202 nm. La concentración de α -TOC sérico fue corregida con los niveles de CT.

Preparación de tejidos y tipificación histológica de las lesiones ateroscleróticas: Los conejos fueron sacrificados por dislocación cervical, posteriormente se procedió a realizar la autopsia de dichos animales, extrayendo la aorta para ser examinada. Las muestras de tejido extraídas, fueron fijadas en formaldehído al 10 % en PBS durante 24 horas y procesadas según la técnica de rutina y posteriormente teñidas con hematoxilina- eosina (18), para luego ser observados por microscopía óptica. Las lesiones fueron tipificadas de acuerdo a la clasificación de la American Heart Association (19).

Análisis de los Datos: Se calculó el promedio y desviación estándar para las variables estudiadas. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro. Se empleó la correlación de Pearson para relacionar el perfil lipídico y los niveles de α -TOC con los niveles de la actividad de la GPx. Se utilizó el análisis de varianza para comparar los valores de las variables sujetas a estudio, empleando el análisis de Kruskal – Wallis para comparar grupos independientes y el análisis de Friedman para comparar grupos relacionados, y una tabla de asociación para clasificar el grado de ateroma. Se consideró significativo $p < 0,05$. Se utilizó el programa Statistix versión 8.

RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas en los pesos basales entre los grupos de conejos sujetos a estudio. A partir de la 2da hasta la 12da semana de experimentación hubo un incremento significativo en el peso de los conejos de los grupos 2,3,4 y 5 con respecto al grupo 1, y con respecto a sus pesos basales ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas en los pesos de los conejos entre los grupos 2,3,4 y 5 a lo largo del experimento (Datos no mostrados). No se observaron diferencias significativas en las concentraciones séricas basales de CT, c-HDL, c-LDL y TG entre los grupos de conejos sujetos a estudio. El CT, c-HDL, c-LDL y TG en el grupo 1 permaneció sin cambios significativos a lo largo del estudio. En la 6ta y 12da semana de experimentación se apreció un aumento significativo en la concentración de CT, c-HDL, c-LDL y TG en los grupos 2,3,4 y 5 con respecto al grupo 1. Para los grupos 2,3,4 y 5 los valores de CT, c-HDL, c-LDL y TG variaron desde el inicio hasta el final del experimento ($p < 0,05$) (Tabla 1).

Tabla 1 Valores promedio y desviación estándar del perfil lipídico

Semana cero					
Variables (mg/dL)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Colesterol	85 ± 8 ^A	88 ± 13 ^A	94 ± 9 ^A	88 ± 10 ^A	89 ± 7 ^A
C-HDL	28 ± 5 ^A	28 ± 2 ^A	29 ± 2 ^A	30 ± 3 ^A	28 ± 2 ^A
C-LDL	52 ± 7 ^A	59 ± 9 ^A	61 ± 6 ^A	58 ± 10 ^A	55 ± 7 ^A
Triglicéridos	91 ± 11 ^A	91 ± 8 ^A	86 ± 7 ^A	85 ± 10 ^A	91 ± 10 ^A
Sexta semana					
Variables (mg/dL)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Colesterol	89 ± 8 ^A	694 ± 113 ^B	688 ± 112 ^B	613 ± 99 ^B	625 ± 118 ^B
C-HDL	30 ± 3 ^A	52 ± 6 ^B	53 ± 5 ^B	51 ± 5 ^B	58 ± 8 ^B
C-LDL	63 ± 6 ^A	627 ± 109 ^B	625 ± 117 ^B	577 ± 125 ^B	562 ± 119 ^B
Triglicéridos	83 ± 9 ^A	141 ± 16 ^B	146 ± 18 ^B	147 ± 23 ^B	142 ± 17 ^B
Decima segunda semana					
Variables (mg/dL)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Colesterol	86 ± 7 ^A	1095 ± 178 ^B	1052 ± 173 ^B	1005 ± 181 ^B	1059 ± 162 ^B
C-HDL	33 ± 2 ^A	70 ± 11 ^B	66 ± 15 ^B	68 ± 11 ^B	72 ± 9 ^B
C-LDL	61 ± 6 ^A	1008 ± 161 ^B	962 ± 166 ^B	930 ± 170 ^B	980 ± 155 ^B
Triglicéridos	87 ± 9 ^A	157 ± 21 ^B	156 ± 31 ^B	156 ± 22 ^B	162 ± 16 ^B
Valores p					
Colesterol	0,3813	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
C-HDL	0,0583	0,0001	0,0004	0,0001	0,0001
C-LDL	0,4786	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Triglicéridos	0,7408	0,0002	0,0002	0,0002	0,0001

Las medias de los grupos en cada semana con diferentes letras son estadísticamente diferentes. Análisis de Kruskal – Wallis. $p < 0,0$ Valores p: Comparación de cada grupo con respecto a sus valores basales

No se observaron diferencias en los niveles de GPx, α -TOC en el grupo 1 a lo largo del experimento. Para la 6ta y 12da semana, los valores de α -TOC son diferentes en los grupos 4 y 5 con respecto al 1 y 2 ($p < 0,05$). Al corregir el α -TOC con el CT (α -TOC/CT), se evidenció que los grupos 2 y 3, difieren de los grupos 1,4 y 5 en la 6ta y 12va semana de estudio ($p < 0,05$). El α -TOC/CT varió en los grupos 2,3,4 y 5 a lo largo del estudio. Los valores de la actividad de la GPx encontrados en los grupos 2,3,4 y 5 difieren de los encontrados en el grupo 1 tanto en la 6ta como en la 12va semana de experimentación. Asimismo para los grupos 2,3,4 y 5, los valores de la actividad de GPx variaron desde el inicio hasta el final de la investigación ($p < 0,05$). (Tabla 2).

Tabla 2 Valores promedio y desviación estándar de α -TOC, α -TOC/CT, GPx

Semana cero					
Variables	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
α -TOC ($\mu\text{g/dL}$)	1132,40 $\pm$ 78,22 ^A	1130,20 $\pm$ 59,41 ^A	1172,80 $\pm$ 72,56 ^A	1123,90 $\pm$ 78,44 ^A	1126,30 $\pm$ 71,24 ^A
α -TOC/CT	13,67 $\pm$ 1,44 ^A	13,08 $\pm$ 1,79 ^A	12,71 $\pm$ 1,64 ^A	13,15 $\pm$ 1,25 ^A	12,56 $\pm$ 1,47 ^A
GPx (nmol/min/mL)	71,00 $\pm$ 3,71 ^A	71,60 $\pm$ 14,49 ^A	78,40 $\pm$ 10,42 ^A	77,20 $\pm$ 9,92 ^A	73,70 $\pm$ 14,04 ^A
Sexta Semana					
Variables	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
α -TOC ($\mu\text{g/dL}$)	1133,70 $\pm$ 77,72 ^A	1176,10 $\pm$ 102,84 ^A	1738,90 $\pm$ 365,65 ^{AB}	5379,80 $\pm$ 1858,20 ^B	5039,90 $\pm$ 1859,00 ^B
α -TOC/CT	13,06 $\pm$ 0,65 ^A	1,66 $\pm$ 0,25 ^B	1,84 $\pm$ 0,39 ^B	9,26 $\pm$ 1,42 ^A	8,90 $\pm$ 2,96 ^A
GPx (nmol/min/mL)	74,14 $\pm$ 3,49 ^A	127,87 $\pm$ 10,69 ^B	111,12 $\pm$ 17,80 ^B	107,84 $\pm$ 13,44 ^B	107,79 $\pm$ 20,36 ^B
Décima segunda semana					
Variables	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
α -TOC ($\mu\text{g/dL}$)	1141,20 $\pm$ 90,90 ^A	1200 $\pm$ 227,70 ^A	1734,70 $\pm$ 216,23 ^{AB}	4770,20 $\pm$ 749,49 ^B	4518,20 $\pm$ 901,84 ^B
α -TOC/CT	13,59 $\pm$ 1,51 ^A	1,16 $\pm$ 0,34 ^B	1,14 $\pm$ 0,28 ^B	5,33 $\pm$ 1,80 ^A	4,67 $\pm$ 0,68 ^A
GPx (nmol/min/mL)	73,66 $\pm$ 7,29 ^A	129,24 $\pm$ 15,28 ^B	107,57 $\pm$ 12,66 ^B	106,06 $\pm$ 9,41 ^B	106,29 $\pm$ 12,96 ^B
Valores p					
α -TOC	0,4966	0,4066	0,002	0,0005	0,0006
α -TOC/CT	0,3012	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
GPx	0,7165	0,0006	0,0022	0,0018	0,0005

Las medias de los grupos en cada semana con diferentes letras son estadísticamente diferentes. Análisis de Kruskal – Wallis. $p < 0,0$ Valores p: Comparación de cada grupo con respecto a sus valores basales. Análisis de Friedman. $p < 0,05$

No se observó asociación significativa entre las variables sujetas a estudio en los diferentes grupos de conejos en las distintas semanas de experimentación.

En cuanto a los cortes histológicos, se observó que ningún conejo del grupo 1 evidenció lesiones ateroscleróticas. Todos los conejos del grupo 2 evidenciaron lesiones de tipo III (Fig. 1) y IV (Fig. 2).

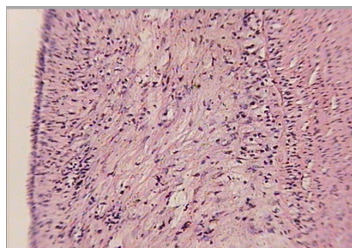


Fig. 1. Corte histológico de la aorta de un conejo perteneciente al grupo 2. Lesión Tipo III. Se observa en la íntima arterial cúmulos de lípidos extracelulares. Tinción hematoxilina – eosina. 100X.

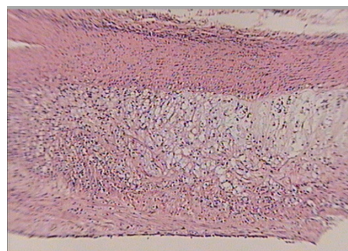


Fig. 2. Corte histológico de la aorta de un conejo perteneciente al grupo 2. Lesión Tipo IV. Se observa en la íntima arterial cúmulos de lípidos intracelulares y extracelulares en mayor extensión. Tinción hematoxilina – eosina. 50 X.

Por su parte, en los grupos 3,4 y 5 algunos conejos no presentaron lesiones y otros evidenciaron lesiones de grado variable. (Tabla 3).

Tabla 3 Distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta

GRUPO	Sin ateroma	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
1	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (60%)	4 (40%)	0 (0%)
3	4 (40%)	1 (10%)	5 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	4 (40%)	3 (30%)	1 (10%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
5	3 (30%)	3 (30%)	2 (20%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del Pyc y la Vit E sobre la actividad de la GPx y la formación de ateromas en conejos, evidenciándose que al inicio del experimento todos los grupos de conejos fueron semejantes entre sí, pues no se observaron diferencias en las variables estudiadas. Se pudo observar que la dieta suministrada a los grupos 2,3,4 y 5 fue hiperlipídica; pues se apreció incremento en la concentración de CT y TG en estos grupos a partir de la 6ta semana de experimentación, tal y como se ha encontrado en otros estudios (1,9). Es importante hacer notar que el consumo de antioxidantes (Pyc y Vit E) no evitó la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, lo cual ha sido previamente reportado (9,20); esta situación es atribuible a que los conejos no pueden incrementar la excreción de esteroides, observándose incremento en el perfil lipídico. Otros estudios han reportado, que los antioxidantes como el α -TOC y el Pyc, poseen efectos hipolipemiantes en pacientes y en modelos animales (21,22), sin embargo esta situación no se evidenció en el presente estudio.

En cuanto a la relación α -TOC/CT, se encontró que el Pyc bajo nuestras condiciones de estudio, no tuvo efecto sobre la regeneración de la Vit E, ya que la relación α -TOC/CT encontrada en el grupo suplementado con Pyc, fue menor que en el grupo control, estos resultados son consistentes con los reportados previamente (9). Algunos estudios han demostrado que el Pyc es capaz de regenerar a la Vit E y de protegerla de la oxidación, funcionando como un coantioxidante; ya que la quercetina (un componente del Pyc) es capaz de donar un átomo de hidrógeno al radical tocoferil (23). Por su parte, tanto la administración combinada de Vit E y Pyc, como la suplementación única de Vit E en la dieta, restableció la relación α -TOC/CT a niveles encontrados en el grupo control, este efecto es debido a la suplementación de la Vit E en la dieta, y no a un efecto ejercido por el Pyc. Es importante tener presente que bajo condiciones de hiperlipidemia y sin la administración exógena de antioxidantes, existe una disminución en la relación de α -TOC/CT. Ha sido descrito que la hipercolesterolemia ocasiona un estado de estrés oxidativo, donde la oxidación de la LDL se encuentra incrementada; por lo que la falta de suplementación de antioxidantes puede favorecer un estado pro oxidante, con niveles elevados de marcadores de oxidación en suero (9,24).

En el presente estudio se enfocó en la influencia que tienen los antioxidantes estudiados sobre la actividad de la GPx como marcador de defensa antioxidante, en donde se observaron niveles elevados de su actividad en los grupos 2,3,4 y 5 con respecto al control; dicho incremento en la actividad antioxidante pudo ser debida a la condición de hiperlipidemia presente en estos grupos de conejos, lo cual ocasiona un estado de estrés oxidativo (25). Es conocido que la GPx es una enzima antioxidante endógena, que juega un papel muy importante en los procesos de óxido – reducción intracelulares al catalizar las reacciones que ayudan a destruir los lipoperóxidos (11,12), la deficiencia celular de esta enzima conlleva la disfunción endotelial asociada posiblemente a incremento del estrés oxidativo (14), por su parte su expresión y actividad se incrementan por los radicales libres de oxígeno (26); nuestros hallazgos coinciden con esta aseveración, ya que se evidenció incremento en la actividad de GPx en los grupos a los que se les administraron dieta con lípidos, con y sin antioxidantes; por lo tanto este aumento en la actividad de la GPx pudo ser inducida por el estrés oxidativo, como una medida de defensa para combatirlo y reducirlo, ya que el mismo está implicado en el desarrollo y evolución de la aterosclerosis (25).

Asimismo, otros estudios han demostrado incremento en la actividad de la GPx en presencia de antioxidantes, ya que algunos investigadores han reportado incrementos en la actividad de la GPx y de los niveles de glutación en presencia de Pyc (10). La administración de dieta hipercolesterolémica (0,5%) suplementada con DL- α -TOC acetato en conejos durante tres meses, incrementa la actividad de GPx y disminuye los marcadores de oxidación, con respecto a los conejos que no fueron suplementados con α -TOC (27); sin embargo, en este estudio, no se encontraron diferencias en la actividad de la GPx entre los grupos de conejos que fueron alimentados con lípidos en su dieta (0,12%) con o sin antioxidantes, demostrando que bajo nuestras condiciones no hubo diferencias en la inducción de la actividad de la enzima entre los grupos 2,3,4 y 5. La administración de antioxidantes en los grupos 3,4 y 5 disminuyó el grado y la presencia de lesiones ateroscleróticas con respecto al grupo 2 que recibió lípidos en su dieta; sugiriendo que a pesar de no existir diferencias en la actividad de la GPx (defensa antioxidante)

entre estos grupos de conejos, posiblemente existe una menor concentración de marcadores de oxidación, como la lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox), en los conejos suplementados con antioxidantes, como ya se ha reportado previamente (9). Es relevante tener presente que la GPx ha demostrado ser una defensa antioxidante muy importante, pues su sobreexpresión ha demostrado inhibir el daño del ventrículo izquierdo después de infarto del miocardio (28). Por lo tanto, nuestros hallazgos pueden sugerir que en condiciones de hiperlipidemia sin complicaciones (de eventos cardiovasculares), existe un aumento en la actividad de GPx, con la finalidad de disminuir el estrés oxidativo; sin embargo se debería evaluar este marcador en fases más avanzada de aterosclerosis; ya que se ha demostrado disminución en la actividad de la enzima en ratas que han sufrido infarto del miocardio (29).

Los radicales libres y la oxidación de las LDL están implicados en el desarrollo de la lesión aterosclerótica, de igual manera se ha demostrado que el uso farmacológico de antioxidantes inhibe el desarrollo de placas en animales de experimentación (13). En cuanto a la formación de lesiones ateroscleróticas, se pudo apreciar que la dieta con lípidos administrada a los conejos, fue aterogénica, pues indujo lesiones ateroscleróticas de grado intermedio y avanzado en los conejos que consumieron únicamente esta dieta; por su parte, como es de esperar los conejos del grupo 1, no evidenciaron lesiones, pues consumieron partes iguales de conejarina y verdura, tal y como lo hemos reportado previamente (1,20). La administración de antioxidantes fue capaz de inhibir el proceso de formación y evolución de las lesiones ateroscleróticas; y en el presente estudio se demostró que el Pyc y la Vit E juntas y por separado, fueron efectivas en disminuir la formación y progresión de lesiones en conejos sometidos a dieta hiperlipidémica bajo nuestras condiciones de estudio, con respecto al grupo de conejos que consumieron únicamente dieta con lípidos, tal y como ha sido reportado previamente (9). De hecho, los conejos suplementados con Pyc, Vit E o su combinación, no presentaron lesiones ateroscleróticas y/o presentaron lesiones de grado más leve, a los encontrados en el grupo 2; estos efectos antiaterogénicos han sido asociados con los efectos antiinflamatorios y antioxidantes que tienen la Vit E y Pyc; ya que el α -TOC disminuye la infiltración de macrófagos a la lesión aterosclerótica, y disminuye la apoptosis de los macrófagos y la ruptura de la placa, teniendo por lo tanto efecto estabilizador de la placa, asimismo disminuye la expresión de moléculas de adhesión celular, citoquinas, quimioquinas inflamatorias y marcadores de oxidación (30). Por su parte el Pyc, inhibe la expresión de la molécula de adhesión intercelular -1 en células endoteliales humanas, e inhibe la activación del factor nuclear Kappa B, mediador central de la inflamación que modula la expresión de moléculas de adhesión celular; asimismo el Pyc disminuye la expresión de marcadores de oxidación e inflamación (9,10,31).

Es importante tener presente que a pesar de, que la dosis de Vit E dadas en nuestro estudio fue moderada - alta (200 mg/día) y que cada ración de alimento contenía 0,12% de colesterol (bajo porcentaje de colesterol), se encontró menor inhibición de la progresión de las lesiones ateroscleróticas, con respecto al grupo suplementado únicamente con Pyc. Diversas investigaciones empleando modelos animales, han evaluado la efectividad que tiene la Vit E en evitar la formación de lesiones ateroscleróticas. Un estudio en conejos suplementados con bajas dosis de vitamina E (10 mg de α -TOC + 0,5% de colesterol) durante 12 semanas, reportaron discreta disminución en el desarrollo de lesiones, en comparación con el grupo que

sólo consumió 0,5% de colesterol (32). De igual manera la administración de altas dosis de vitamina E (0,5% en su dieta) demostró disminuir la aterosclerosis en conejos (33); Asimismo, otros estudios describen que modestas dosis de α -TOC en conejos (157 mg/día) preserva la función

vasodilatadora, mientras que elevadas concentraciones (1571 mg/día) se asocia con disfunción endotelial y mayor proliferación de la íntima (34); por lo tanto, estos hallazgos indican que el porcentaje de colesterol en la dieta, dosis y tiempo de experimentación, son variables que influyen en los resultados antes descritos en este modelo animal

En conclusión se tiene que bajo condiciones de hiperlipidemia, en presencia o ausencia de antioxidantes, la actividad de la GPx se encuentra incrementada; sin embargo, el Pyc y la Vit E administrada por separado o en conjunto, fueron efectivas en inhibir y retardar la formación y progresión de lesiones ateroscleróticas bajo nuestras condiciones de estudio.

AGRADECIMIENTOS. *El proyecto fue financiado por el Laboratorio Clínico Julio González. Agradecemos a María De Freitas y Manuel Dinis por su valiosa colaboración y ayuda, al Bioterio Experimental de la UC por facilitarnos las instalaciones para llevar a cabo el experimento. Y al Bioterio Central por su asistencia técnica.*

BIBLIOGRAFIA

1. González J, Figueira L, Reigosa A. Selectina-E, VCAM-1, FNT- α , IL-6, PCR y Fibrinógeno plasmático como marcadores de inflamación en la aterosclerosis, en conejos machos Nueva Zelanda, expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Salus* 2008; 12: 50-57.
2. Jawien J. The putative role of leukotrienes in experimental atherogenesis. *Pol Arch Med Wewn* 2009; 119: 90 – 93.
3. Silverstens R. Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: Role of the scavenger receptor CD36. *CCJM* 2009; 76: s27-s30.
4. Gokce N, Keaney J, Hunter L, Watkins M, Menzoian J, Vita J. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: A prospective study. *Circulation* 2002; 105: 1567 – 1572.
5. Ravi K, Prakash G, Sudhir N, Nitin K, Sujatha M. Premature Coronary Artery Disease: Role of Free Radical Nitric Oxide. *Indian Heart J* 2008; 60: 45-49.
6. Yukihiro H, Kensuke N, Masao Y, Yasuki K. Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circ J* 2009; 73: 411 – 418.
7. Cerecetto H, Lopez G. Antioxidants derived from vitamin E: an overview. *Mini Rev Med Chem* 2007; 7: 315 – 338.
8. Roberts J, Oates J, Linton M, Fazio S, Meador B, Gross M, Shyr Y, Morrow J. The Relationship Between Dose of Vitamin E and Suppression of Oxidative Stress in Humans. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 1388–1393.
9. Figueira L, González J. Efecto del extracto de *Pinus maritime*, vitaminas C y E sobre la concentración sérica de LDLox, PCR, Selectina-E, IL-6 y formación de ateromas en conejos con dieta hiperlipidémica. *INFORMED* 2008; 10: 593-607.
10. Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biological properties of a procyanidin rich extract from pine (*Pinus maritime*) bark, Pycnogenol. *Free Rad Biol Med* 1999; 27: 704 – 724.
11. Mézes M, Erdélyi M, Shaaban G, Virág G, Balogh K, Wéber M. Genetics of glutathione peroxidase. *Acta Biologica Szegediensis* 2003; 47: 135-138.
12. Bougoulia M, Triantos A, Koliakos G. Plasma interleukin-6 levels, glutathione peroxidase and isoprostane in obese women before and after weight loss. Association with cardiovascular risk factors. *Hormones (Athens)* 2006; 5: 192-199.
13. Prior W. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 141 – 164.
14. Forgione M, Cap A, Liao R, Moldovan N, Eberhardt P, Lim C, Jones J, Goldschmidt P, Loscalzo J. Heterozygous cellular glutathione peroxidase Deficiency in the Mouse. *Circulation* 2002; 106: 1154 – 1158.

15. Guide for the care and use of animals. 1996. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. National Academy Press, Washington DC, USA.
16. Speziale A. El Laboratorio Clínico y la evaluación del riesgo coronario. *Rev Mex Patol Clin* 2000; 47: 202 – 218.
17. Bieri J, Teresa J, Tolliver B, Catignani G. Simultaneous determination of α -tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *Am J Clin Nut* 1979; 32: 2143-2149.
18. Luna L. The Histological Staining Manual. Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 1968 Cap 1-4: 11-37. Editions McGraw-Hill. New York. USA.
19. Sary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfield M, Schwartz C, Wagner W, Wesler R. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis. American Heart Association. *Circulation* 1995; 15: 1512 – 1531.
20. Bravo M, Armas F, Cabrera M, González J, Pelayo T, González D, Reigosa A. Administración parenteral de homocisteína y efecto del ácido fólico en la formación de ateromas en conejos. *Salus* 2002; 6: 23-29.
21. Torres M, Márquez M, Sutil R, Carrizales M, Leal M, Reigosa A. A study about the effect of vitamin E on hyperlipidaemia and atherosclerotic lesions in New Zealand White rabbits fed with a 1% cholesterol rich diet. *Invest Clín* 2003; 44: 119 – 127.
22. Devaraj S, López S, Kaul N, Schonlau F, Rohdewald P, Jialal I. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids* 2002; 37: 931 – 934.
23. De Whalley C, Rankin S, Hout J, Jessup W, Leake D. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol* 1990; 39: 1743 – 1750.
24. Andican G, Seven A, Uncu M, Cantasdermis M, Numar F, Burcak G. Oxidized LDL and anti oxidized LDL antibody levels in peripheral atherosclerosis disease. *Scand J ClinLab Invest* 2008; 18: 1-7.
25. Mohd N, Ghafar N, Jaarin K, Khine J, Top G. Vitamin E and factors affecting atherosclerosis in rabbits fed a cholesterol – rich diet. *Int J Food Sci Nutr* 2000; 51, S79 – S94.
26. Cowan D, Weisel R, Williams W, Mickle D. Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione peroxidase gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 26904-26910.
27. Birkner E, Kasperczyk S, Zalejska-Fiolka J, Kasperczyk A, Birkner B. Influence of selenomethionine and vitamin E on the antioxidative system in animals with experimentally induced hypercholesterolemia. *Biol Trace Elem Res* 2006; 111: 137-149.
28. Shiomi T, Tsutsui H, Matsuoka H, Murakami K, Hayashidani S, Ikeuchi M, Wen J, Kubota T, Utsumi H, Takeshita A. Overexpression of Glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2004; 109: 544 – 549.
29. Hill M, Singal P. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96: 2414 – 2420.
30. Meydani M. Vitamin E and atherosclerosis: beyond prevention of LDL oxidation. *J Nutr* 2001; 131: 366s – 368s.
31. Grimm T, Chovanová Z, Muchová J, Sumegová K, Liptáková A, Duracková Z, Hogger P. Inhibition of NF- κ B activation and MMP9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol). *J Inflamm* 2006; 3: 1 – 6.
32. Prasad K, Kalra J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: effect of vitamin E. *Am Heart J* 1993; 125: 958 – 973.
33. Sun J, Giraud D, Moxley R, Driskell J. Carotene and α -tocopherol inhibit the development of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic rabbits. *Int J Vitam Nutr Res* 1997; 67: 155 – 163.
34. Keaney J, Gaziano J, Xu A, Frei B, Curran J, Shwaery G, Loscalzo J, Vita J. Low – dose alpha-tocopherol improves and high – dose alpha-tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol – fed rabbits. *J Clin Invest* 1994; 93: 844 – 851.