

Determinación del mecanismo de inhibición de la síntesis de colesterol por extractos de *Eryngium heterophyllum*

Miranda Velásquez Lylia Graciela, Rodríguez Arzave Juan Antonio,
Núñez González María Adrián

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas.
Av. Pedro de Alba S/N, Ciudad Universitaria. San Nicolás de los Garza N.L. CP 66455.

lmirandavelazquez@yahoo.com.mx

Fecha de aceptación: 13 de agosto de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

Eryngium heterophyllum ha sido utilizada por varios años con fines hipocolesterolémicos, los extractos más utilizados son etanólico y acuoso. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual disminuye el colesterol se desconoce. En este trabajo se ensayó el extracto acuoso en un modelo *in vitro* con células Vero obtenidas de riñón de mono verde africano, para establecer si el mecanismo de acción es comparable al de los fármacos actuales. Se preparó un extracto acuoso mediante una infusión de las hojas de la planta, el cual fue liofilizado y se utilizó en los cultivos celulares a diferentes concentraciones, se encontró una disminución de la viabilidad celular con la presencia del extracto comparable a la producida por la pravastatina utilizada como control positivo y también se encontró una recuperación de la viabilidad celular al añadir mevalonato el cual actúa como precursor de la síntesis de colesterol, con lo que podemos inferir que el extracto actúa al mismo nivel que la pravastatina, inhibiendo una enzima clave en la síntesis del colesterol.

Palabras clave: *Eryngium heterophyllum*, colesterol, células Vero.

ABSTRACT

Eryngium heterophyllum has been used for several years with hypocholesterolemic purposes, the most used are ethanolic and aqueous extracts. However, the mechanism by which cholesterol lowering is unknown. In this work the aqueous extract was tested in an *in vitro* model with Vero cells, derived from African green monkey kidney to determine whether the mechanism of action is comparable to current drugs. An aqueous extract was prepared by an infusion of the leaves of the plant, was lyophilized and used in cell cultures at different concentrations, a decrease in cell viability in the extract presence was found comparable by pravastatin used as a positive control and a recovery in cell viability was also found by adding mevalonate which acts as precursor of cholesterol synthesis, which can infer that the extract acts the same level as pravastatin, inhibiting a key enzyme in cholesterol synthesis.

Key words: *Eryngium heterophyllum*, cholesterol, Vero cells.

INTRODUCCIÓN

La fitoterapia es la utilización de plantas o partes de ellas con fines terapéuticos y ha sido utilizada por los animales y el propio hombre desde la prehistoria. De hecho la mayor parte de los fármacos actuales están basados en los principios activos de las plantas.

Se denomina principio activo a toda sustancia dotada de actividad farmacológica, estos suelen ser metabolitos secundarios de la planta, es decir, que no son fundamentales para ella (suele tratarse de sustancias de reserva, productos para repeler o atraer a los insectos para la polinización).

Todo vegetal provisto de principios activos con una actividad farmacológica que puede ser aprovechada desde el punto de vista terapéutico, es considerado como una planta medicinal (García *et al.*, 2007).

Desde tiempos remotos es conocido que las plantas presentan propiedades curativas para una infinidad de padecimientos, y aunque pareciera que la curación a base de plantas ha pasado a la historia, ésta sigue siendo una importante fuente de salud en zonas rurales, especialmente en países en desarrollo como México.

Por otro lado, el aumento de herberías y comercios que expenden este tipo de productos en las zonas urbanas nos hace preguntarnos si en realidad esta forma tradicional de curación está pasando a la historia. Más del 60 % de la población mundial sigue en nuestros días dependiendo de esta forma de recuperación de la salud. De los fármacos oficiales de patente que se expenden actualmente, cerca del 50 % proviene de productos vegetales, el resto lo constituyen productos sintéticos (González, 1998).

Sin embargo, de muchas de las plantas solo se tiene un conocimiento empírico por lo que su estudio contribuye grandemente al conocimiento de su mecanismo de acción así como también a especificar si el beneficio atribuido es real.

La enfermedad coronaria continúa siendo la principal causa de muerte en los países desarrollados, la reducción de la concentración de LDL-colesterol es la estrategia primaria para disminuir el riesgo de enfermedad coronaria, la Organización Mundial de la Salud reporta que 3.8 millones de hombres y 3.4 millones de mujeres mueren cada año en todo el mundo debido a enfermedades coronarias (Bose *et al.*, 200).

Las estatinas tales como la pravastatina, son fármacos que proporcionan una terapia efectiva para disminuir el colesterol y son ampliamente utilizadas, la manera en que disminuyen el colesterol es inhibiendo la enzima HMG-CoA reductasa una enzima que cataliza el paso limitador de la tasa en la biosíntesis del colesterol (Chang *et al.*, 2001). Debido a que las estatinas son caras y causan efectos secundarios, se ha buscado una estrategia en la cual se recomiende la ingesta de algunos componentes específicos de las plantas que son agentes efectivos en la disminución del colesterol (Carr *et al.*, 2005).

Eryngium heterophyllum es una hierba de 40 cm a 1 m de altura, es originaria de México y crece en climas seco, semiseco y templado, se ha documentado su uso en medicina tradicional para diversos padecimientos de hígado y riñón (INI, 1994) destacando la disminución del colesterol en ratones con hipercolesterolemia inducida (Estrada *et al.*, 1990), sin embargo el mecanismo mediante el cual se disminuye el colesterol permanece sin elucidar. En este estudio nos propusimos determinar si el mecanismo mediante el cual se disminuye el colesterol es similar al de los fármacos de patente utilizados actualmente, en un modelo *in vitro* utilizando células Vero.

METODOLOGÍA

Obtención de la planta: *E. heterophyllum* conocida como yerba del sapo se compró en el mercado de Sonora de la Ciudad de México, se clasificó en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. y se le asignó el número de herbario 15238.

Obtención del extracto:

El extracto se preparó en forma de infusión utilizando la metodología descrita por Domínguez (1973), para lo cual 30 gramos de la planta se colocaron en un litro de agua hirviendo, se retiró de la flama y se tapó el recipiente, se dejaron reposar hasta enfriarse y posteriormente se filtraron utilizando papel Whatman #1, el filtrado obtenido se liofilizó. El extracto se pesó para calcular el rendimiento y se guardó en congelación.

Ensayo *in vitro* de la actividad hipocolesterolémica de los extractos utilizando células Vero:

Este ensayo se realizó para determinar la toxicidad de los extractos, asumiendo que aquellos que tuvieron un efecto citotóxico marcado se debían posiblemente al bloqueo en la síntesis del colesterol el cual es necesario para la formación de la membrana celular. Para ello los cultivos se lavaron 2 veces con PBS, para despegar la monocapa celular se utilizó una solución de tripsina al 0.25 %. Después la suspensión de células se transfirió a tubos cónicos graduados con tapón de rosca se centrifugaron a 1000 rpm a una temperatura de 25 °C por 5 min. Se eliminó el sobrenadante hasta dejar 2 mL. Se contaron las células en un hemocitómetro utilizando un microscopio invertido (Iroscope/Mod. S1-PH). Se observó la viabilidad con azul tripano. Las células se sembraron utilizando 3×10^5 cel/100 μ L por cada pozo en una microplaca grado cultivo celular de 96 pozos, fondo plano y se incubaron a 36 °C, en atmósfera húmeda con CO₂ al 5 % por 24 h. Se adicionaron 100 μ L de cada una de las diferentes diluciones del extracto por triplicado (125, 250, 500, 700 y 1000 μ g/mL), se incluyó el medio M-199 (p/v) como control negativo y pravastatina a 100 μ M, como control positivo, se incubaron por 48 horas a las mismas condiciones. Posteriormente se adicionaron 10 μ l del reactivo WST-1 y se incubaron por una hora y treinta minutos, se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector para microplacas (Sigma Diagnostics) para calcular el porcentaje de viabilidad celular. Este mismo ensayo se repitió adicionando mevalonato además del extracto, un precursor de la síntesis del colesterol, para determinar nuevamente la viabilidad celular. Los resultados obtenidos se sometieron a análisis estadístico utilizando ANOVA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar el mecanismo de disminución del colesterol, se obtuvo el extracto acuoso reportado con anterioridad con efecto hipocolesterolémico y se realizó el ensayo *in vitro* de la actividad hipocolesterolémica en un modelo celular, utilizando células normales obtenidas de riñón de mono verde africano (células Vero), los resultados se muestran en la figura 1 donde podemos apreciar que el extracto aplicado a 5 concentraciones diferentes fue capaz de disminuir la viabilidad celular de una manera significativa con respecto al control negativo (solo medio de cultivo), y que ésta disminución fue estadísticamente significativa a la causada por la pravastatina, la cual es un fármaco de patente utilizado para disminuir los niveles de colesterol. En la misma figura podemos observar que cuando se adicionó mevalonato el cual es un precursor de la síntesis del colesterol y extracto al mismo tiempo, las células crecieron de una manera normal sin que hubiera una diferencia significativa con respecto al control negativo.

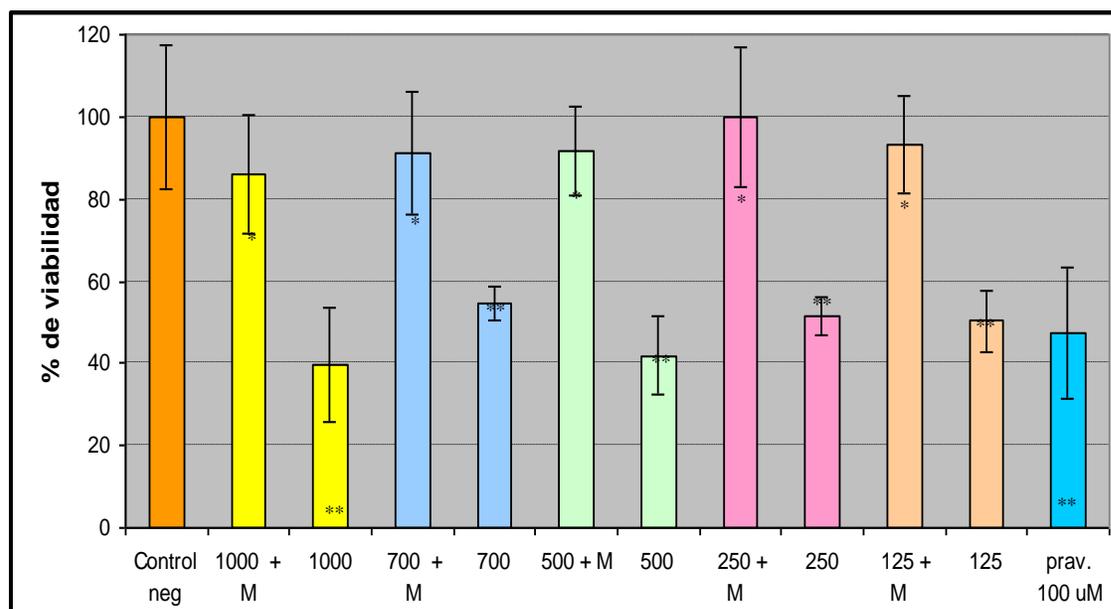


Figura 1. Efecto de *E. heterophyllum* solo y de la combinación de *E. heterophyllum* más mevalonato sobre crecimiento de células Vero, 5000 cels/100 μ L, M= mevalonato 2.5 mM (* $p > 0.05$ vs control neg., ** $p < 0.01$ vs control neg., Tukey).

CONCLUSIONES

La síntesis del colesterol depende del funcionamiento de la enzima Hidroximetil glutaril Coenzima A reductasa (HMG-CoA), los fármacos de patente utilizados para la disminución del colesterol conocidos como estatinas, son efectivos ya que bloquean dicha enzima y el mevalonato precursor del colesterol no puede ser formado. *E. heterophyllum* disminuye el colesterol de la misma manera que las estatinas ya que el extracto crudo por sí mismo logró una disminución estadísticamente significativa comparada con la pravastatina y al añadir mevalonato la viabilidad celular se recuperó, con lo que se concluye que el mecanismo de acción del extracto es comparable al de éste fármaco, por lo que podría utilizarse en forma de té en combinación con una dieta adecuada en el tratamiento de la hipercolesterolemia.

REFERENCIAS

- Bose K., Agrawal B. (2007). Effect of lycopene from cooked tomatoes on serum antioxidant enzymes, lipid peroxidation and lipid profile in coronary heart disease. *Singapore Med J.*, 48: 415.
- Carr T., Weller C., Schlegel V., Cuppett S., Guderian D., Johnson K. (2005). Grain Sorghum Lipid extracts Reduces Cholesterol Absorption and Plasma Non-HDL Cholesterol Concentration in Hamsters. *Nutr J.* 2236-2240.
- Chang J., Chen T., Chan P., Chen Y. (2001). The in Vitro Inhibitory Effect of Tannin Derivatives on 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase on Vero Cells. *Pharmacology*, 62: 224-228.
- Domínguez, X.A. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. México: LIMUSA, p. 33.
- Estrada E., Navarrete A., Niño D., Reyes B., Sixtos C., Aguirre E. (1990). On The Hypocholesterolemic effect of *Eryngium heterophyllum*. *Fitoterapia*, 12: 182-184.
- Castillo E., Martínez, I. (2007). Manual de Fitoterapia. España: Elsevier Masson, p. 3

González Ferrara, MM. (1998). Plantas Medicinales del Noreste de México. México: IMSS. Monterrey. p. 5-6.

Instituto Nacional Indigenista. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana III. México: INI. p. 571-572.