

EFECTO DE LA HESPERIDINA SOBRE LA CAPTACIÓN DE HDL EN CÉLULAS HEPÁTICAS Y EVALUACIÓN DE HESPERIDINA LIPOSOMAL SOBRE LA OXIDACIÓN DE LDL

RESUMEN

La hesperidina es un flavonoide con varios reportes de bioactividad. En el presente trabajo se demostró la potencialidad de tres fuentes vegetales para la obtención industrial de hesperidina, la cual fue probada sobre dos modelos de procesos claves en la patología cardiovascular: la captación de HDL por células hepáticas y la oxidación de LDL. Sin embargo, la hesperidina presenta una utilidad farmacéutica limitada debido a su baja solubilidad en agua, por lo tanto se exploró la alternativa de incorporar hesperidina en liposomas encontrando altos porcentajes de encapsulación y un aumento en la inhibición de LDL comparada con el compuesto libre.

PALABRAS CLAVES: LDL, HDL, hesperidina, liposomas.

ABSTRACT

Hesperidin is a flavonoid related to different biological activities. In this work it has demonstrated the potential of some vegetal material as sources of bulk hesperidin, which was tested in two key models on cardiovascular pathology: HDL uptake by liver cells and the LDL oxidation. However, hesperidin present a drawback for its pharmaceutical use due to its poor solubility in water, therefore, incorporation of hesperidin into liposomes was explored as alternative founding high percentages of encapsulation and an enhancement in inhibition of LDL oxidation compared with the free compound.

KEYWORDS: LDL, HDL, hesperidin, liposomes

1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de alternativas terapéuticas para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares asociadas, se basa en encontrar sustancias que puedan intervenir en uno o varios de los procesos claves para la formación de la placa ateromatosa. Actualmente se sabe que cuando ocurre un desbalance entre el transporte de colesterol hacia los tejidos y el mecanismo de depuración conocido como transporte reverso mediado por Lipoproteínas de Alta Densidad –HDL, los niveles de Lipoproteína de Baja Densidad –LDL aumentan causando su acumulación y oxidación sobre las paredes arteriales debido a una captación masiva por macrófagos generando “células espumosas”. Este conjunto de eventos causa daños en el endotelio, activa rutas celulares desencadenantes de inflamación sensibles a redox, promueve la liberación de una variedad de citoquinas proinflamatorias y cómo resultado ocurre la formación de una matriz compuesta de colágeno, cúmulos de macrófagos, células espumosas y contenido lipídico, que se expande tomando la forma típica de la placa o lesión aterosclerótica [1].

JULIAN LONDOÑO

Químico Farmacéutico
Candidato PhD
Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas, Grupo de Inmunomodulación - Universidad de Antioquia
jalondo@gmail.com

JELVER SIERRA

Químico Farmacéutico, MSc.
Investigador Asociado
Grupo de Inmunodeficiencias Primarias - Universidad de Antioquia
jelver.sierra@gmail.com

ROBINSON RAMÍREZ

Bacteriólogo, MSc, PhD
Grupo de Inmunomodulación - Universidad de Antioquia
ramirezpineda@yahoo.com

En este sentido, evaluamos la capacidad del flavonoide hesperidina para promover la captación de HDL en células hepáticas y a su vez inhibir la oxidación de LDL.

La hesperidina (HES) 5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxi-flavanona-7-ramnoglucoisido, número CAS: 520-26-3 presenta actividad antiinflamatoria, analgésica, hipolipemiente y recientemente reportada por nuestro grupo cómo antioxidante [2-4] revelando ser un compuesto potencialmente útil, de hecho varios trabajos han buscado optimizar su obtención a partir de diversas fuentes [5,6] y a pesar de que la extracción de compuestos bioactivos a partir de materiales vegetales empleando solventes orgánicos es la operación más aplicada comúnmente en procesos industriales y de investigación, el interés creciente por obtener materias primas o productos farmacéuticos ha incrementado la necesidad de desarrollar métodos de extracción ideales para obtener el máximo rendimiento y pureza de las sustancias, en un corto periodo de tiempo, con un bajo costo y con técnicas ambientalmente amigables [6]. Recientemente hemos desarrollado una metodología de extracción de hesperidina que cumple con los criterios descritos anteriormente (datos no publicados) y en el presente trabajo se exploran diversas fuentes de obtención así como parámetros de pureza y rendimiento.

A pesar de la amplia actividad biológica que ha mostrado la hesperidina, su utilidad farmacéutica está limitada debido a su baja solubilidad en agua (menos de 20 ppm), de allí que trabajos de investigación recientes han propuesto su inclusión en ciclodextrinas para aumentar su solubilidad [7]. En nuestro trabajo, proponemos la incorporación de hesperidina en liposomas tipo MLVs (Multilamellar Large Vesicles), evaluando la capacidad de encapsulación del sistema, el tamaño promedio de las partículas y finalmente la capacidad para inhibir la oxidación de LDL.

2. CONTENIDO

2.1. Metodología

2.1.1. Exploración de fuentes vegetales para la obtención de hesperidina

Se exploraron tres fuentes vegetales para la obtención de hesperidina (F1, F2 y F3). El método de análisis fue HPLC con las siguientes condiciones cromatográficas: columna Hypersil BDC8 150mm x 4.6mm x 5 μ m, fase móvil: Metanol/Agua 55/45 conteniendo ácido fosfórico 0.01% v/v, flujo: 0.650 ml/min, detección UV 360 nm. La identidad de la hesperidina obtenida se confirmó por HPLC acoplada a Espectrometría de Masas de acuerdo a lo descrito por DA-YONG [8].

2.1.2. Obtención de lipoproteínas

LDL y HDL se aislaron por gradiente discontinuo de densidad de acuerdo con el procedimiento estándar aplicado en nuestro laboratorio [9] de plasma obtenido de voluntarios sanos (20-25 años) sometido a ultracentrifugación (49.500rpm), obteniendo VLDL+QM d<1.006 g/ml, LDL d<1.065 g/ml, HDL d<1.125 g/ml.

La pureza de las fracciones se evaluó por SDS-PAGE y el contenido proteico se cuantificó usando la técnica de Bradford. La HDL se marcó con el fluorocromo DiI (1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocianina-perclorato) por incubación durante 12 h con una solución que contenía 300 μ g DiI/mg/ml de proteína.

2.1.3. Cultivo celular y ensayos de unión y captación de HDL

Células Hep G2 se cultivaron en medio DMEM:F12 (1:1), con 1% de antibiótico (100 UI de penicilina + 100 μ g/mL de estreptomina), suplementado con 10% de suero bovino fetal.

Los fenómenos de captación y unión de HDL se evaluaron sobre monocapas confluentes por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, luego de la incubación durante 1h con 10.6 μ l de HDL a 1886.74 μ g/ml en presencia o ausencia de hesperidina obtenida de la fuente F2.

2.1.4. Incorporación de hesperidina en liposomas

Los liposomas se prepararon por el método de hidratación en film. Brevemente, una solución clorofórmica de lecitina y colesterol se evaporó a presión reducida a 40°C. La película resultante se secó en una corriente de nitrógeno durante 12 horas, se dispersó con una solución de hesperidina a 1mg/ml y se pasó al menos 15 veces a través de una membrana de 0.22 μ m para obtener liposomas tipo MLVs. El tamaño promedio de las partículas fue determinado por light scattering.

La proporción de hesperidina encapsulada se determinó centrifugando una alícuota de la suspensión de liposomas a 13.000 rpm durante 90 minutos a 4°C, los liposomas se separaron del sobrenadante y se sonicó en presencia de Triton-X. La cantidad de hesperidina en el sobrenadante y en los liposomas se determinó por HPLC de acuerdo al procedimiento descrito en 2.1.1.

2.1.5. Inhibición de la oxidación de LDL

LDL 373 μ g/mL se preincubó con hesperidina libre y liposomal durante 15 minutos, la oxidación se inició con la adición de CuSO₄ (100 μ M) a 37°C durante 18 h y se detuvo por la adición de 1% p/v de EDTA y enfriamiento en un baño de hielo durante 15 minutos.

Las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico - TBARS se midieron espectrofotométricamente. Se adicionó una solución al 0.67% TBA (Ácido Tiobarbitúrico), 15 % TCA (Ácido Tricloroacético) y 0.1N HCl, y el cromóforo se formó a 95°C durante 60 minutos. Las soluciones se pasaron a través de filtros de nylon (MFS 0.20 micrones) y las lecturas de tres experimentos independientes se realizaron a 532 nm y los resultados se expresaron como equivalentes de MDA.

2.2. Resultados

2.2.1. Exploración de fuentes vegetales para la obtención de hesperidina

Como puede observarse en la figura 1, las fuentes vegetales 1 y 3 muestran ser promisorias para la obtención industrial de hesperidina; bien por su rendimiento (1.5 y 1.8% respectivamente) como por la pureza del compuesto obtenido (86.43 y 84.72%, comparada con 81.62% del producto comercial).

2.2.2. Captación de HDL por células hepáticas

En los ensayos de citometría de flujo pudo demostrarse que la hesperidina no afecta significativamente la captación de HDL por células hepáticas. En la figura 2 obtenida por microscopía de fluorescencia, se puede observar la captación de lipoproteínas marcadas con DiI por una célula HepG2 y su acumulación predominante en citoplasma.

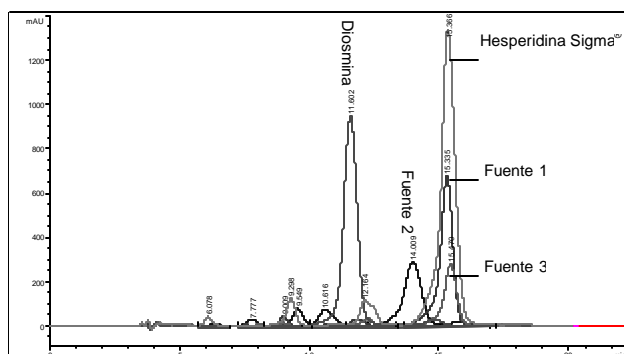


Figura 1. Cromatograma de las hesperidina obtenida de fuentes vegetales comparada con el producto comercial.

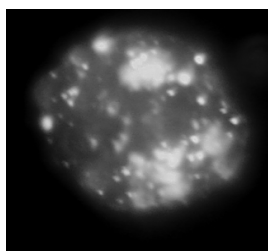


Figura 2. Imagen de microscopía de fluorescencia mostrando la captación de HDL marcadas con DiI por una célula hepática HepG2

2.2.3. Incorporación de hesperidina en liposomas

La insolubilidad de la hesperidina en agua se evidenció como se muestra en la figura 3A. Sin embargo, su incorporación en liposomas la mantiene soluble como puede observarse en la figura 3B

La evaluación del porcentaje de captación por HPLC demostró que en su mayoría (76.8%) la hesperidina fue encapsulada en el sistema vesicular.

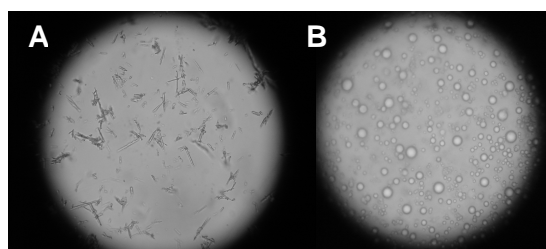


Figura 3. (A) Hesperidina libre, (B) Hesperidina incorporada en liposomas multilamelares grandes.

2.2.4. Inhibición de la oxidación de LDL

Se determinó la disminución en la producción de especies derivadas de la peroxidación lipídica, mostrando que la hesperidina liposomal disminuye significativamente este proceso.

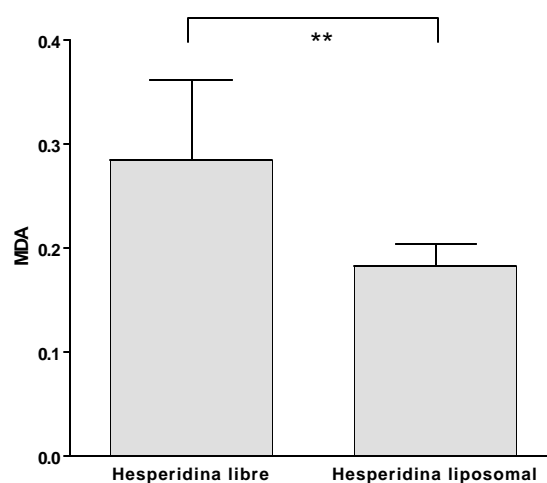


Figura 4. Inhibición de la oxidación de LDL por hesperidina libre y liposomal. Los resultados se muestran cómo generación de MDA de tres experimentos (Media ± Desv. Estándar)

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el presente trabajo se logró evaluar el rendimiento y la pureza de hesperidina obtenida de tres fuentes vegetales mediante un proceso industrializable. Adicionalmente se evaluó su actividad en dos procesos claves para la formación de placa aterosclerótica como son: la depuración hepática de HDL y la oxidación de LDL, mostrando que su efecto puede deberse principalmente a la inhibición de este último.

Finalmente se exploró la posibilidad de mejorar las perspectivas de la hesperidina ante una eventual aplicación farmacéutica y por ende se logró demostrar que es posible su incorporación en liposomas multilamelares grandes y que este hecho aumenta su actividad para inhibir la oxidación de LDL, probablemente debido a una mejor interacción entre la monocapa lipídica de la micela de LDL y la bicapa del liposoma que contiene hesperidina. Este hecho es fundamental para ampliar las investigaciones en este sentido y lograr una mayor caracterización del sistema liposomal, así como pensar en una liberación selectiva de hesperidina por la incorporación de un ligando en la superficie del liposoma.

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] CHISOLM GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 28 (2000) 1815–1826.
- [2] GALATI, E.M., Monforte, M.T., Kirjavainen, S., Forestieri, A.M., Trovato, A., Tripodo, M.M. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco* 40 (1994) 709–712.

- [3] BORRADAILE, N.M., K.K. Carroll, E.M. Kurowska, *Lipids* 34 (1999) 591–598.
- [4] MONTOYA G. Londoño, J.A, Arango Acosta, Gabriel Jaime. Obtención de la fracción flavonoide a partir de desechos de la industria cítrica colombiana: Evaluación de su actividad antioxidante e inhibición de oxidación de LDL In: 14 Congreso CNIC, 2005, La Habana.
- [5] GROHMANN K., John A. Manthey, Randall G. Cameron. Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures. *Carbohydrate Research* 328 (2000)141–146.
- [6] YAQIN. Ma, X. Ye, Y. Hao, G. Xu, G. Xu, D. Liu, Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel, *Ultrasonics Sonochemistry* (2007), *in press* doi: 10.1016/j.ultsonch.2007.03.006.
- [7] TOMMASINI S., M.L. Calabro, R. Stancanelli, P. Donato, C. Costa, S. Catania, V. Villari, P. Ficarra, R. Ficarra. The inclusion complexes of hesperetin and its 7-rhamnoglucoside with (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39 (2005) 572–580.
- [8] DA-YONG Zhou, Qing Xu, Xin-ya Xue, Fei-fang Zhang, Xin-miao Liang. Identification of *O*-diglycosyl flavanones in *Fructus aurantii* by liquid chromatography with electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42 (2006) 441–448.
- [9] LONDOÑO, J.A, Guerrero K., Aristizabal L., Montoya G.L., Arango G.J. Los jugos de cítricos inhiben la oxidación de lipoproteínas de baja densidad: Relación entre actividad captadora de radicales libres y movilidad electroforética. *Revista Chilena de Nutrición* 33 (3) 544-551.