



FACULTAD DE FARMACIA  
LABORATORIO REACTIVIDAD VASCULAR

**“EFECTO DE TRANS-RESVERATROL SOBRE LA CONTRACTIBILIDAD DE  
AORTA DE RATA BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO”**

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico

**ANDREA DENISES FLORES FERNÁNDEZ**

Director de Tesis: Dr. Raúl Vinet Huerta  
Co-director de Tesis: Dra. Rocío Álvarez Villalobos

2011

“Dedicada a Dios quien guió mis pasos en cada momento de mi vida,  
a mi madre Iany quien me dio todo lo que soy como persona, mis valores, mis  
principios, mi perseverancia, me enseñó a tener fe y esperanza cuando no podía  
seguir...  
a mis hermanas Tamara, Katia y Carolina, a quienes amo con todo mi corazón y  
siempre confiaron en mi y  
a mi pololo Enrique quien me dio su apoyo en los momentos más difíciles...”

“Agradezco de todo corazón a Dios y a mi madre lany, que es para mí la persona más maravillosa de este mundo. Se que desde el cielo haz guiado mi camino, gracias a tu amor, esfuerzo, comprensión y confianza me diste fuerzas para luchar contra la adversidad, me enseñaste a no rendirme, a ser perseverante. Me inspiraste a seguir adelante para algún día ser una profesional.

A mis hermanas Tamarita, Katia y Carolina quienes me dieron su apoyo, me comprendieron y estuvieron siempre a mi lado, a quienes amo y son mi motivo de seguir adelante.

A mi pololo Enrique, quien me apoyo en los momentos más cruciales de mi tesis, me dio su amor y su aliento para cumplir mi gran anhelo de llegar a ser una profesional.

A mis tios Juan Carlos, Martita, Maggie, mis padres adoptivos que me dieron su amor incondicional y me dieron su apoyo en todo momento.

A mi cuñi Raulito, mi tía Mitzy y mi tío Raúl quienes me alentaron, me ayudaron y me entregaron su cariño.

A mi Director de tesis, Raúl Vinet quién confió en mis capacidades, le doy gracias por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

A mi co-Directora Rocío Álvarez, por su cariño, su apoyo, su confianza y sus enseñanzas que me guiaron para poder terminar mi tesis y crecer como persona.

A la profesora Magdalena Cortés, quién siempre estuvo ahí, dándome palabras de aliento y fortaleza para continuar mis estudios.

A mis amigas y amigos Viviana, Maju, Graciela, Karen B, Chapita, Karencita, Beto, Rubita, Juan Pez, Maju, Mauricio, Viviana, Alexita, Kiwi quienes me aguantaron, me dieron alegrías y estuvieron siempre conmigo ante la adversidad.

A quienes jamás encontraré la forma de agradecer el cariño, comprensión y apoyo brindado en los momentos buenos y malos de mi vida, sólo espero que comprendan que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos e inspirados en ustedes.”

Con amor, agradecimiento y respeto

Andreita Flores Fernández”

<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii

## **1. INTRODUCCIÓN**

1.1.Evidencia Epidemiológica.....	1
1.2.El Estrés Oxidativo y su efecto en el endotelio .....	2
1.3.Biomarcadores .....	5
1.4.Relación entre el vino tinto y la Paradoja Francesa .....	6
1.5.Polifenoles .....	7
1.6.Estilbenos .....	8
1.7.Resveratrol .....	9
1.8.Biodisponibilidad y Metabolismo del tRV .....	11
1.9.Propiedades Biológicas del RV .....	12
1.9.1.Cardioprotección .....	12
1.9.2. Quimioprotección.....	13
1.9.3. Acción fitoestrogénica .....	14
1.9.4. Neuroprotección .....	14
1.9.5. Efecto Antiinflamatorio .....	14
1.9.6. Efectos Metabólicos .....	15
1.9.7. Antienvjecimiento .....	16
1.9.8. Efecto Antioxidante .....	16
1.10. Moléculas blanco de tRV .....	18
1.11. Estudios del efecto vasodilatador de tRV .....	19

<b>2. HIPOTESIS</b> .....	21
---------------------------	----

## **3. OBJETIVOS**

3.1. Objetivo General .....	22
3.2.Objetivos Específicos .....	22

#### **4. MATERIALES Y METODOLOGÍA**

4.1. Materiales .....	23
4.1.1. Animales .....	23
4.1.2. Soluciones Fisiológicas .....	23
4.1.3. Reactivos .....	23
4.1.4. Equipos .....	24
4.1.5. Material fungible .....	24
4.1.6. Material quirúrgico .....	24
4.1.7. Material de vidrio y otros .....	25
4.2. Metodología .....	26
4.2.1. Técnica .....	26
4.2.2. Fundamento de la técnica .....	26
4.2.3. Herramientas farmacológicas y compuestos en estudio .....	26
4.2.4. Obtención y Preparación de Muestras .....	27
4.2.5. Pre-condicionamiento del Tejido .....	27
4.2.5.1. Experimento control .....	27
4.2.5.2. Experimento simulación estrés oxidativo .....	28
4.2.6. Montaje de los Anillos de Aorta .....	28
4.2.7. Registro de Datos .....	28
4.2.8. Ensayos de Reactividad de Anillos de Aorta .....	29
4.2.9. Análisis de datos .....	29

#### **5. RESULTADOS**

5.1. Biomarcadores en condiciones preliminares .....	30
5.2. Biomarcadores en condiciones de preincubación con tRV .....	32
5.2.a. Biomarcadores en condiciones de preincubación con tRV/Locke (12 h).....	32
5.2.b. Biomarcadores en condiciones de preincubación con tRV/Locke (10 h).....	32
5.2.c. Biomarcadores en condiciones de preincubación con tRV/Locke .....	33
5.2.d. Biomarcadores en condiciones de preincubación con tRV + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	35

<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	37
<b>7. CONCLUSIÓN</b> .....	44
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	45
<b>9. ANEXOS</b>	
<b>ANEXO I.</b> Gráfico Mortalidad ECNT en países del mundo en el año 2004 .....	54
<b>ANEXO II.</b> Gráfico Mortalidad ECNT en países del mundo en el año 2004 .....	54
<b>ANEXO III.</b> Gráfico porcentajes de principales causas de muerte en Chile por regiones año 2003 .....	55
<b>ANEXO IV.</b> Gráfico porcentajes de principales causas de muerte en Chile por regiones año 2003 .....	55
<b>ANEXO V.</b> Síntesis de Oxido nítrico, modificado de Vallance y cols, 2001 .....	56
<b>ANEXO VI.</b> Vía de síntesis del tRV (Hans y Hu, 2008) .....	57
<b>ANEXO VII.</b> Tabla modificada de Pirola y cols, 2008 .....	58
<b>ANEXO VIII:</b> Equipo Myobath II, WPI, 2008 .....	59
<b>ANEXO IX.</b> Tabla del diseño experimental del estudio farmacológico .....	60
<b>ANEXO X.</b> Esquema de metodología del estudio farmacológico .....	60

### Registros originales

<b>ANEXO XI.</b> CDR de Fenilefrina en anillos de aorta de rata precontraídas con KCl 70mM y CDR de Acetilcolina en anillos de aorta de rata pre contraídos con Fe $10^{-7}$ M .....	61
<b>ANEXO XII.</b> CDR de ACh en anillos de aorta de rata previamente contraídos con solución KCl 70 mM y luego con Fe $10^{-7}$ M .....	61
<b>ANEXO XIII.</b> CDR de Fenilefrina en anillos de aorta de rata previamente incubados con medio de cultivo PBS 5% y diferentes concentraciones de tRV ( $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ M), (37°C, 12 H incubación, 4 H lavado) .....	62
<b>ANEXO XIV.</b> Curva dosis respuesta de Fenilefrina en anillos de aorta de rata previamente incubados con Solución Krebs y diferentes concentraciones de tRV ( $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ M).(10h-3h a 33 °C) .....	62
<b>ANEXO XV.</b> Curva dosis respuesta de Fenilefrina en anillos de aorta de rata previamente incubados con Solución Krebs y diferentes concentraciones de tRV ( $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ M) .....	63

---

**RESUMEN**

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) constituyen el principal problema de salud a nivel mundial, situación que determina un gasto en salud, que va desde un 5% a un 15% del PIB. Dentro de las ECNT, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbilidad y mortalidad en Chile. Estas enfermedades están íntimamente ligadas a estilos de vida no saludables. Las evidencias científicas muestran una relación positiva entre la generación de radicales libres altamente reactivos, disfunción endotelial y enfermedad cardiovascular. En el presente trabajo se evaluó el eventual efecto protector de trans-resveratrol (tRV) en anillos de aorta aislada de rata. Con este propósito, anillos de aorta de rata (Sprague Dawley), fueron sometidos a condiciones de estrés oxidativo mediante incubación con peróxido de hidrógeno, en presencia o ausencia de tRV, y posteriormente, fueron montados en un baño de órgano provisto de un polígrafo para el registro de tensión isométrica. Se midieron los siguientes biomarcadores: contracción máxima a KCl 70 mM ( $E_{max-K^+}$  70 mM), contracción máxima a fenilefrina (Fe) ( $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M) ( $E_{max-Fe}$ ), relajación máxima a acetilcolina (ACh) ( $E_{max-ACh}$ ) y la  $pD_2$  de acetilcolina ( $pD_2-ACh$ ). Sólo el biomarcador de contractibilidad  $E_{max-K^+}$  70 mM mostró un incremento significativo respecto del control, cuando los vasos fueron incubados en presencia de 1 y 10  $\mu$ M de tRV/Locke, respecto del control sin tRV. Sobre la base de los amplios efectos reportados para tRV como agente antioxidante, principalmente en ensayos realizados a nivel celular, los resultados obtenidos en este trabajo muestran la necesidad de abordar estrategias metodológicas que permitan la evaluación de agentes antioxidantes en diferentes niveles de complejidad, teniendo en mente la búsqueda de biomarcadores más representativos de la complejidad biológica.

---

***ABSTRACT***

Non-transmissible chronic diseases (NTCD) constitute the main health problem worldwide, situation that determines a cost in health, from 5% to 15% of the GDP. Within NTCD, cardiovascular diseases are the main cause of morbidity and mortality in Chile. These diseases are closely linked to unhealthy lifestyles. The scientific evidence shows a positive relationship between the generation of highly reactive free radicals, endothelial dysfunction and cardiovascular disease. In the present study we evaluated the possible protective effect of trans-resveratrol (tRV) in rat isolated aortic rings. For this purpose, aortic rings of rats (Sprague Dawley) were exposed to oxidative stress conditions by incubation with hydrogen peroxide in the presence or absence of tRV. Rings were mounted in an organ bath equipped with a polygraph for isometric tension recording. The following biomarkers were measured: maximal contraction to KCl 70 mM ( $E_{max}\text{-K}^+$  70 mM), maximal contraction to phenylephrine (Fe) ( $10^{-7}$  and  $10^{-6}$  M) ( $E_{max}\text{-Fe}$ ), maximal relaxation to acetylcholine (ACh) ( $E_{max}\text{-ACh}$ ) and the  $pD_2$  of acetylcholine ( $pD_2\text{-ACh}$ ). When vessels were incubated in the presence of 1 and 10 mM tRV/Locke only  $E_{max}\text{-K}^+$  70 mM biomarker a significant increase compared to control (without tRV) were showed. The other biomarkers showed no significant difference compared to controls. On the basis of the wide effects reported for tRV as an antioxidant, particularly in trials conducted at the cellular level, the results of this study show the need to address methodological strategies that allow the evaluation of antioxidants in different levels of complexity. We must seek for biomarkers most representative of biological complexity.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Evidencia Epidemiológica.

Desde hace varias décadas las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) constituyen el principal problema de salud a nivel mundial (OMS, 2009). Dentro de las ECNT, las enfermedades cardiovasculares (ECV) y las neoplasias malignas representan prácticamente el 90% de este ítem. Esta situación determina un gasto en salud a nivel mundial, que comprende desde un 5% a un 15% del PIB **(Anexo I y II)**.

Chile se encuentra en una etapa de transición epidemiológica, que se caracteriza por presentar un incremento en la prevalencia de ECNT representando dos tercios de la mortalidad de la población adulta en el país (INE, 2006; Icaza y cols, 2009). En Chile, dentro de los 5 primeros grupos de mortalidad con el mayor impacto en el año 2003, las ECV constituyeron la primera causa de muerte (28,4%), seguida de tumores malignos (TM) (23,5%), enfermedades del sistema respiratorio (ESR) (8,9%), causas externas de morbilidad y mortalidad (8,9%) y enfermedades del sistema digestivo (ESD) (7,9%) (INE, 2006) **(Anexo III y IV)**.

Dado el alto impacto médico y económico de las ECV en la sociedad, hay una clara necesidad de definir estrategias rentables para la prevención de esta enfermedad (Ratner y cols, 2009; Fagalde y cols, 2005). La patogénesis del desarrollo de la lesión coronaria, es un proceso multifactorial, el cuál implica el daño de un número de diferentes tipos celulares (células musculares lisas vasculares (MLV), células inmunológicas, células endoteliales vasculares) y covariantes que están ligadas íntimamente al estilo de vida no saludable (malos hábitos alimenticios, sedentarismo, exposición a determinados xenobióticos, estrés y predisposición genética) (Chaves y cols, 2009).

## 1.2. El Estrés Oxidativo y su efecto en el endotelio.

La experiencia clínica y los estudios prospectivos permiten establecer una asociación inequívoca entre el estrés oxidativo y la enfermedad cardiovascular. El estrés oxidativo es un evento precoz en el desarrollo de la disfunción endotelial y de la subsecuente enfermedad cardiovascular. Afortunadamente, el aumento del estrés oxidativo y su impacto sobre la función endotelial es reversible y/o controlable (Masnatta y cols, 2003).

La alteración del funcionamiento normal del endotelio se ha denominado "disfunción endotelial" y es un importante marcador y un probable participante en la iniciación y la progresión de muchas formas de enfermedades cardiovasculares (Chaves y cols, 2009; Stocker y Keaney, 2004; Vallance y Chan, 2001).

El endotelio es un órgano de múltiples funciones, entre las que se encuentran principalmente la regulación del tono vasomotor, el mantenimiento de una superficie no trombogénica, la función de barrera física vascular (controlando la permeabilidad y el pasaje de solutos y macromoléculas) sobre las células musculares lisas, el control de la proliferación del músculo liso subyacente, y el control del pasaje subendotelial de neutrófilos, monocitos y linfocitos. Estas funciones son posibles gracias a la habilidad del endotelio para detectar estímulos humorales y hemodinámicos y, en función de éstos, producir una serie de respuestas con la finalidad de mantener la homeostasis vascular (Masnatta y cols, 2003).

El endotelio juega un papel protagónico en la modulación del tono vascular a través de la liberación de factores vasodilatadores como el óxido nítrico (ON), la prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), y vasoconstrictores como el tromboxano (TXA<sub>2</sub>), la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) y la endotelina (ET). Asimismo, los niveles de especies antioxidantes intracelulares, cisteína (CYS) o glutatión (GEH), y la actividad de enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT), contribuyen al mantenimiento del equilibrio óxido-reductor (REDOX), compensando el incremento del estrés oxidativo generado por las especies oxígeno reactivas (ROS) (Mas, 2009; Masnatta y cols, 2003).

La adrenalina y la noradrenalina son aminas vasoactivas que se encuentran en cantidad significativa en sangre; la adrenalina es liberada por la médula suprarrenal y la noradrenalina por las terminaciones nerviosas; estimulando los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos. La acetilcolina (ACh) actúa sobre las células endoteliales, estimulando la producción del factor de relajación endotelial (EDRF), hoy conocido como óxido nítrico (ON) (Brown, 2006), el mismo que al estimular la guanilatociclasa del músculo vascular produce el monofosfato cíclico de guanidina, (GMPc) (Versari y cols, 2009) responsable directo de la relajación del músculo liso vascular. El ON endotelial se forma del nitrógeno de guanidina de L-arginina por acción de la sintasa del ON (ONS) endotelial, dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, de forma tal que la administración exógena de L-arginina estimula la producción de ON, mientras que análogos de L-arginina como L-NAME, actúan como antagonistas competitivos de la óxido nítrico sintasa (ONS) inhibiendo la producción de ON. (Masnatta y cols, 2003) **(Anexo V)**.

Los principales efectos del ON son: a) potente acción vasodilatadora, b) mediador intercelular en la regulación de la resistencia vascular, c) distribución del flujo sanguíneo, d) regulación del aporte de oxígeno ( $\text{O}_2$ ), e) participa en la regulación del balance de  $\text{Na}^+$  y la presión arterial. El exceso de ON produce hipotensión, mientras que su inhibición vasoconstricción patológica e isquemia tisular (Grover y Zavalza, 2009, Moncada y Higgs, 2006).

El estrés oxidativo tiene gran influencia sobre la función del ON, ya que el exceso de aniones superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) interacciona con el ON formando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) disminuyendo la biodisponibilidad del ON y al inhibir la acción de la superóxido-dismutasa produce ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), disminuyendo el pH del medio. De esta manera, los niveles de  $\bullet\text{O}_2^-$  pueden determinar si el ON ejerce un papel protector o perjudicial (Schmitt y Dirsch, 2009; Mas, 2009).

Los  $\bullet\text{O}_2^-$  se producen tanto en la célula endotelial como en el MLV, mediante una serie de oxidasas que incluyen a NADPH oxidasa, xantino oxidasa, ciclooxigenasa y la propia eNOS bajo condiciones de desacoplamiento, así como la cadena de electrones mitocondrial durante el curso normal de la fosforilación oxidativa, esencial para la generación de ATP (Mas, 2009; Versari y cols, 2009).

En condiciones normales el  $\bullet\text{O}_2^-$  es eliminado rápidamente por los mecanismos de defensa antioxidantes. Éste es transformado en peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por la superóxido dismutasa dependiente de Manganeseo (MnSOD) en la mitocondria y por superóxido dismutasa dependiente de Cobre (CuSOD) en el citosol. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se convierte en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  mediante glutatión peroxidasa (GSH peroxidasa) en la mitocondria, o por catalasas en lisosomas. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se puede convertir en ON en presencia de Hierro o Cobre. En células endoteliales, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  media apoptosis y angiogénesis patológica (Grover y Zavalza, 2009; Schmitt y Dirsch, 2009).

Durante los últimos años, una serie de estudios han demostrado que el exceso de generación de radicales libres altamente reactivos, provoca estrés oxidativo y consecuentemente deterioro en la vasodilatación dependiente del endotelio y una mayor sensibilidad del endotelio a la vasoconstricción, agravando el desarrollo y la progresión de las enfermedades cardiovasculares y sus complicaciones (Stocker y Keaney, 2004; Vallance y Chan, 2001). También se ha demostrado que, en ausencia de una función endotelial intacta, o inclusive durante el proceso normal de envejecimiento, la capacidad de sintetizar y liberar ON y otros autacoides endoteliales se ve disminuida, y en consecuencia la capacidad de vasodilatar las arterias se reduce (Stocker y Keaney, 2004).

La instauración del proceso de estrés oxidativo ocurre por la existencia de un desequilibrio entre los sistemas oxidativos y los mecanismos antioxidantes, a favor de los primeros, llevando a la generación de grandes cantidades de radicales libres o detrimento de la velocidad de neutralización de éstos. Este proceso conduce a la oxidación de biomoléculas con la consiguiente pérdida de sus funciones biológicas; así como al descontrol homeostático junto al potencial daño oxidativo contra las células y tejidos (Stocker y Keaney, 2004).

Tal como se mencionó anteriormente, el estrés oxidativo se refiere a una condición en la cual las células son sometidas a excesivos niveles de oxígeno molecular o sus derivados químicos llamados ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Las ROS incluyen a radicales libres, tales como  $\bullet\text{O}_2^-$ , hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), peroxilo ( $\bullet\text{RO}_2^-$ ) e hidroperoxilo ( $\bullet\text{HRO}_2^-$ ), así como especies no radicalarias, tales como  $\text{H}_2\text{O}_2$  y ácido hidroclosoro ( $\text{HOCl}$ ). Por su parte, las RNS incluyen radicales libres tales como  $\text{ON}^\bullet$  y dióxido de nitrógeno ( $\bullet\text{NO}_2^-$ ), así como a especies no radicalarias, principalmente  $\text{ONOO}^-$ , óxido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) y alquil peroxinitratos (RNOO) (Stocker y Keaney, 2004; Vallance y Chan, 2001)

### 1.3. Biomarcadores.

En los últimos años se ha despertado un gran interés en la evaluación de antioxidantes con miras a prevenir o retardar las complicaciones derivadas del estrés oxidativo. Sin embargo, la falta de biomarcadores adecuados para establecer la bioactividad de fitoquímicos antioxidantes ha llevado a limitaciones en el desarrollo de antioxidantes más efectivos (Romero y cols, 2009). Es por ello que a pesar de la gran evidencia de los efectos nocivos del estrés oxidativo y su relación con una alimentación no saludable, en la actualidad, la información validada científicamente en relación a fitoquímicos es escasa y relativa, lo que se debe principalmente a la falta de un enfoque farmacológico de los ensayos biológicos, así como a una mirada parcial de los paradigmas empleados (Romero y cols, 2009).

Un biomarcador se define como una característica, que se puede medir y evaluar objetivamente como indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Se dispone de varios marcadores *in vitro* de estrés oxidativo, incluyendo biomarcadores de ROS/RNS, sin embargo, la mayoría tienen limitaciones para evaluar estrés oxidativo *in vivo* debido a que carecen de sensibilidad y/o especificidad o requieren métodos invasivos (Dalle-Done y cols, 2006). Los biomarcadores son utilizados como indicadores del daño oxidativo, aparición temprana de la enfermedad, progresión de la enfermedad y evaluación de la eficacia de terapia antioxidante entre otras (Halliwell y Whiteman, 2004).

La investigación científica que se ha llevado a cabo en las últimas décadas, ha demostrado el papel que juegan ciertos componentes químico-nutricionales en la prevención y tratamiento de muchas enfermedades. Esta situación ha provocado un cambio del simple concepto de alimento como fuente de nutrientes, a uno más integral que traduce la potencialidad que los alimentos pueden tener, no sólo de nutrir, sino también de disminuir el riesgo, prevenir y tratar enfermedades (Sedó, 2001).

#### **1.4. Relación entre el vino tinto y la Paradoja Francesa.**

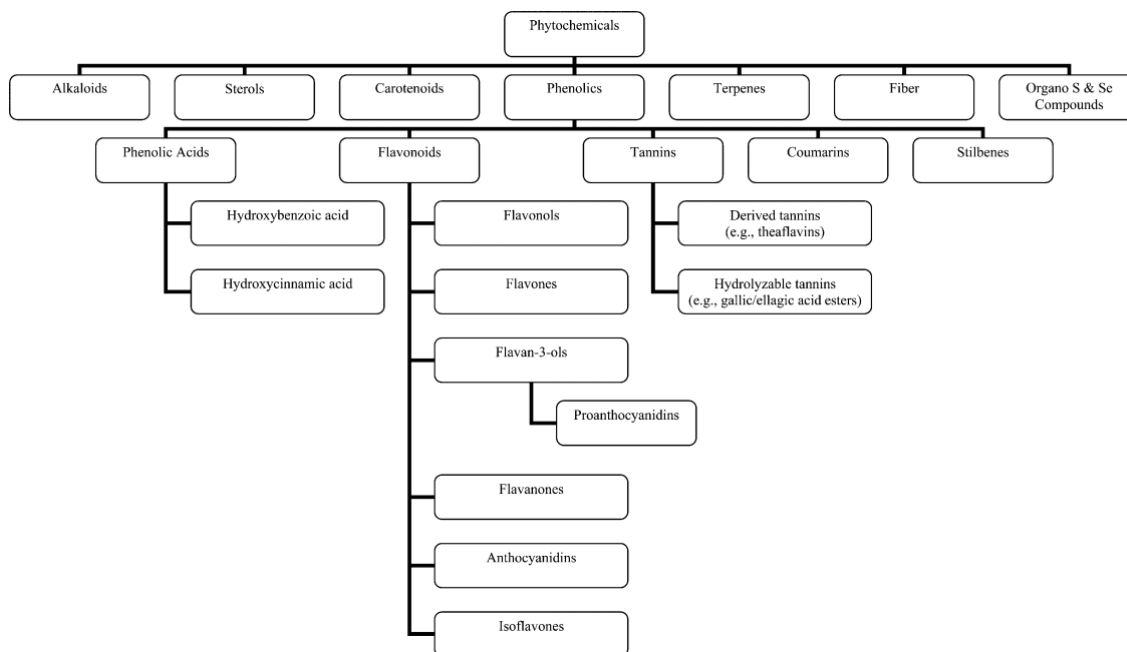
En los años recientes, los estudios sobre el consumo de vino tinto han recibido un gran interés, tanto por parte de la comunidad científica como del público en general. Las tasas de mortalidad por ECV son mucho más bajas en Francia que en otros países industrializados como USA y Gran Bretaña. Esta diferencia se presenta a pesar de que los consumos de grasa saturada son similares (14 a 15% de las calorías diarias) y también son similares los niveles de colesterol plasmático, alrededor de 230 mg/dL (Pasten y cols, 2006). Este hecho se conoce como la paradoja francesa de la enfermedad coronaria arterioesclerótica. La explicación propuesta se relaciona con la dieta propia de las poblaciones francesas, dieta de tipo Mediterráneo (poca mantequilla, y mucho pan, verduras, frutas, queso, grasa vegetal y vino). En particular se atribuye un papel clave al consumo prolongado y moderado de vino tinto, entre 270 y 400 ml diarios (Pervaiz, 2003). El papel protector atribuido al vino tinto en este caso, se apoya en observaciones previas que mostraron una relación inversa entre consumo de alcohol y mortalidad cardiovascular, particularmente en relación con el vino tinto (Orallo y cols, 2001; Lastra y Villegas, 2007).

El vino, además de alcohol, contiene una gran variedad de compuestos polifenólicos que actuarían como antioxidantes. Los polifenoles son los fitoquímicos más importantes de la uva porque poseen actividades biológicas asociadas a la promoción de la salud (Xia y cols, 2010).

### 1.5. Polifenoles.

Los polifenoles pueden ser divididos en varios subgrupos atendiendo a su estructura básica. Debido a la gran variedad de estructuras químicas que poseen los polifenoles, se agrupan en diferentes clases (**Figura I**), dependiendo del número de anillos fenólicos que posean y el tipo y número de elementos estructurales unidos a estos anillos (Erdman y cols, 2007). Entre los compuestos polifenólicos del vino tinto que presentan actividad beneficiosa para la salud se encuentran los ácidos fenólicos (ácidos ferúlicos, cumáricos, cinámicos, vainílicos, cafeicos); trihidroxistilbenos (resveratrol y polidatina) y flavonoides (catequinas, epiquercetina, quercetina) (Nicholson y cols, 2008; Orallo y cols, 2002).

Muchos de los compuestos fenólicos son en parte responsables de las propiedades organolépticas de los alimentos de origen vegetal y, por tanto, tienen importancia en la calidad de los mismos.



**Figura I.** Clasificación de los fitoquímicos (Erdman y cols, 2007).

Se ha demostrado que los compuestos polifenólicos del vino tienen variadas funciones relacionadas a ECV: disminuyen la oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad, en inglés) causantes de la aterosclerosis (Stoclet y cols, 2004); inhiben la agregación plaquetaria (Pasten y cols, 2006, Manach y cols, 2004); aumentan la óxido nítrico sintetasa y la vasorrelajación del endotelio; mejoran la vascularidad y disminuyen el daño oxidativo al ADN (Xia y cols, 2010; Lastra y Villegas, 2007; Gresele y cols, 2008)

Como los efectos beneficiosos y protectores del vino tinto son independientes de su contenido en alcohol, en estos últimos años se han realizado intensas investigaciones para identificar los principios activos responsables.

### **1.7. Estilbenos.**

Los estilbenos son moléculas ampliamente distribuidas en plantas superiores. Sin embargo, las fuentes potenciales de estilbenos en nuestra dieta quedan esencialmente restringidas a la uva, vino tinto, cacahuets y algunas bayas (grosella negra, arándanos etc.). Los estilbenos más representativos son el resveratrol y su glucósido piceido, el piceatanol, así como dímeros y trímeros de resveratrol que dan lugar a las viníferas. De todos, es el resveratrol, con diferencia, el que más ha atraído la atención, fundamentalmente por sus potenciales actividades promotoras de la salud (Chong y cols, 2009).

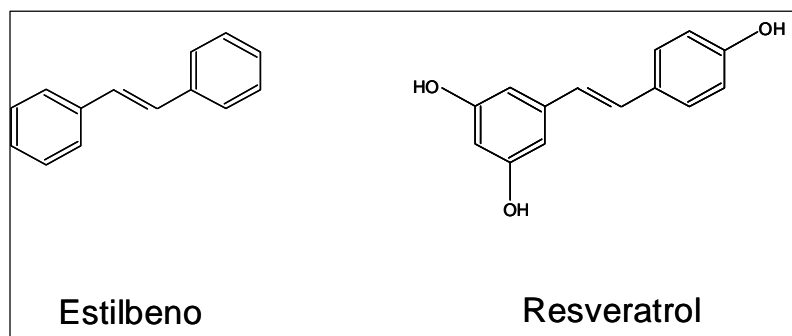
Los estilbenos (derivados hidroxilados del (E)-1,2-difeniletano) son metabolitos secundarios de origen natural, también clasificados como fitoalexinas. Las fitoalexinas son un grupo de sustancias de bajo peso molecular cuya concentración en la planta es normalmente muy baja (casi indetectable), pero que la planta sintetiza expresamente para hacer frente a agresiones externas tales como estrés ambiental, privación de agua, la radiación ultravioleta, contra ataque de hongos o infección bacteriana. Por ejemplo, el contenido de resveratrol (RV) en la uva es apenas detectable, excepto ante situaciones puntuales como puede ser el ataque del hongo *Botrytis* o cuando es irradiada con luz ultravioleta, donde puede aumentar hasta 2.000 veces respecto a su contenido inicial.

Con el tratamiento mediante la luz ultravioleta se ha abierto la posibilidad de comercializar “uvas funcionales” debido al aumento considerable del contenido de resveratrol de estas uvas (en torno a 15mg/Kg uva), así como productos con alto contenido en resveratrol (nutracéuticos) que pudieran derivarse de éstas. En el caso del vino, los niveles de RV van a depender de la variedad de uva, de las condiciones climáticas, así como de los procedimientos enológicos empleados (tiempo y tipo de maceración, etc.). Se han descrito concentraciones de RV de 0,3 a 8 mg/mL en vino tinto, de 1,3 a 3 mg/L en vino rosado y de 0,1 a 1,2 mg/L en vino blanco. (Das y Maulik, 2006; Pervaiz, 2003; Lastra y cols, 2007).

### 1.7. Resveratrol

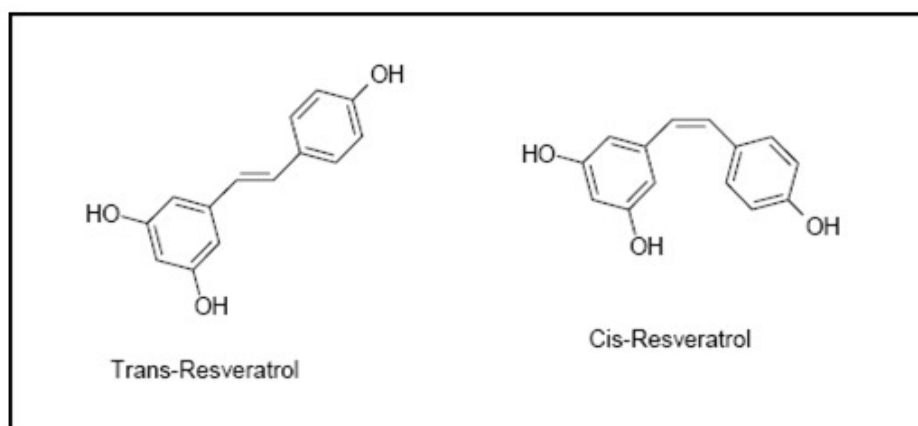
El RV es un compuesto que fue descubierto en 1940, cuya estructura corresponde al [(E)-1-(3,5-dihidroxifenil)-2-(4-hidroxifenil) eteno] (**Figura II**), es uno de los principales polifenoles del tipo estilbeno caracterizado como una fitoalexina. El interés por este compuesto despertó cuando estudios epidemiológicos revelaron una relación inversa entre el consumo de frutas y bebidas ricas en RV, como las uvas y el vino tinto, y la aparición de enfermedades CV, concretamente cuando se observó el fenómeno conocido como la paradoja francesa.

La fuente más rica en RV proviene de las raíces de *Polygonum cuspidatum* (Ko-jo-kon). Además, se puede encontrar en una gran cantidad de frutos, como en las uvas, berries, maní, manzanas, y una gran variedad de flores y hojas incluyendo gnetum, eléboro blanco, liliium, árbol de orquídeas de mariposas, eucaliptos, abetos, poaceae, y pinos (Pirola y Fröjdö, 2008; Das y Maulik, 2006; Baur y Sinclair, 2006; Harb y cols, 2009).



**Figura II.** Estructura química del resveratrol, modificada de Pirola y Fröjdö, 2008.

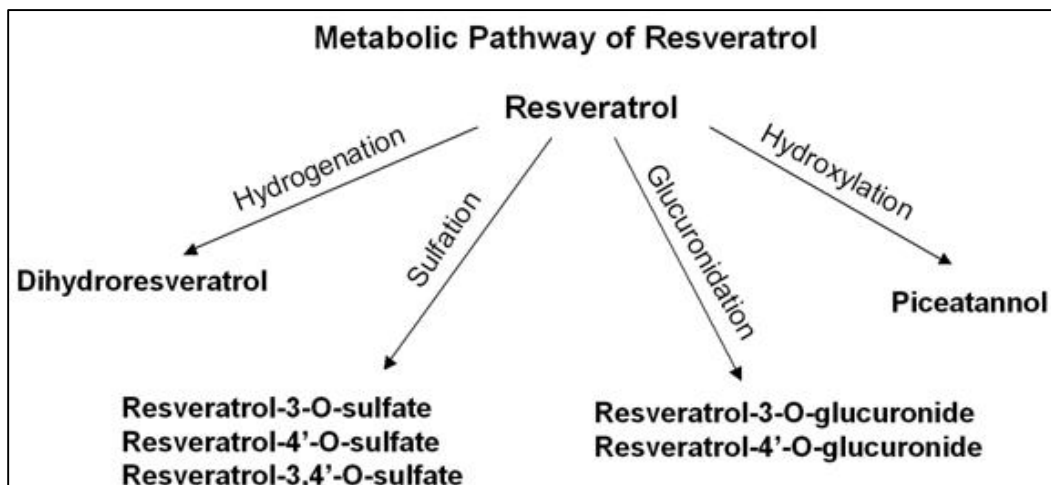
El RV se sintetiza principalmente en las células de la piel de la uva (Baur y Sinclair, 2006; Pervaiz, 2003; Nicholson y cols, 2008) (Anexo VI). Según su estructura química, el RV se puede encontrar en las formas isométricas: *cis* y *trans*, pero sólo la isoforma *trans* ha sido aislada en la uva (**Figura III**). En las plantas, existe mayoritariamente en su forma glicosilada (Pervaiz, 2003; Athar y cols, 2007). Su isomerización de *trans*-resveratrol (tRV) a *cis*-resveratrol es facilitada por la exposición a radiación UV, por lo tanto, tRV es relativamente más estable si se le protege de alto pH y de la luz (Pervaiz, 2003).



**Figura III.** Isoformas estructurales de Resveratrol, modificada de Baur y Sinclair, 2006.

### 1.8. Biodisponibilidad y Metabolismo del tRV.

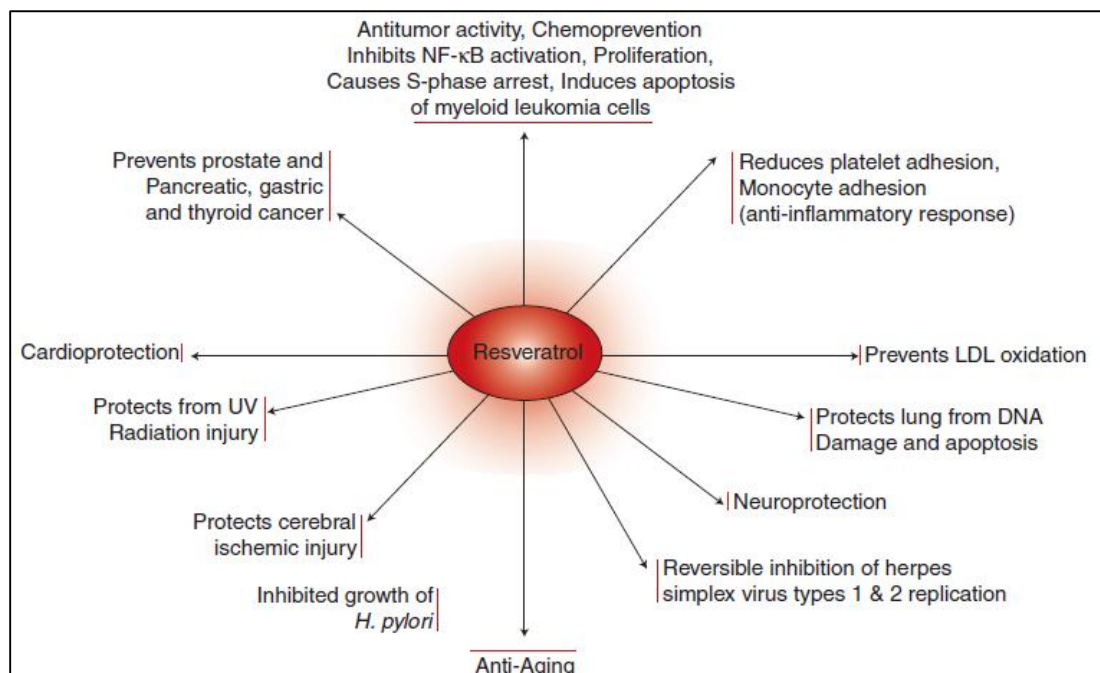
El tRV, se absorbe satisfactoriamente del intestino y se distribuye en diferentes tejidos. En plasma se alcanza un pico de concentración a los 30 minutos de la administración oral (Harb y cols, 2009; Almeida y cols, 2009; Brites y cols, 2010). Se ha observado que tiene una vida media muy corta resultando en una baja biodisponibilidad. El metabolismo es fundamentalmente hepático fase II, glucuronidación y sulfatación. (Cottart y cols, 2010). Ambos isómeros, cis- y trans-resveratrol experimentan conjugación por uridina difosfato glucuronosiltransferasas (UGTs) para formar dos glucurónidos (3-O-glucuronido y 4'-O-glucuronido). El tRV también sufre conjugación con sulfatos por las sulfotransferasas (SULTs) para formar resveratrol 3-O-sulfato en humanos (**Figura IV**) Además se generan otras conjugaciones (4'-sulfato, 3,5-disulfato, 3,4'-disulfato, 3,4', 5 trisulfato) que han sido identificadas en ratas. Estudios *in vitro* han demostrado que el tRV puede ser hidroxilado por CYP1B1 a piceatanol (3,3',4'5-tetrahidroxiestilbeno) que por si mismo tiene propiedades antitumorales y potencial inhibitorio de tirosina cinasa (Shankar y cols, 2007).



**Figura IV:** Rutas metabólicas del tRV (Shankar y cols, 2007).

### 1.9. Propiedades Biológicas del RV.

Existe un cúmulo de evidencia científica relevante donde se demuestran varias propiedades biológicas del RV, (**Figura V**) dentro de los cuáles destacan: efecto cardioprotector, quimiopreventivo, neuroprotector, antiinflamatorio, y antienvjecimiento, así como sus potenciales usos en la industria de nutracéuticos, farmacéutica y de alimentos.



**Figura V.** Efectos biológicos atribuidos al Resveratrol, modificada de Das y Maulik, 2006.

#### 1.9.1. Cardioprotección

Una vía cardioprotectora se explica mediante la neutralización de diversos oxidantes (radicales libres) y la reducción de los niveles de colesterol y triglicéridos (al inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad) (Das y Maulik, 2006; Pirola y Fröjdö, 2008; Sadruddin y Arora, 2009; Millan y cols, 2008). *In vitro*, tRV inhibe la agregación plaquetaria, de ahí sus efectos antitrombóticos.

También se ha demostrado que inhibe la expresión de las moléculas de adhesión en células endoteliales en cultivo e inhibe la proliferación de las células del músculo liso vascular, limitando uno de los primeros pasos de la formación de aterosclerosis (Das y Maulik, 2006; Pállas y cols, 2009; Baur y Sinclair, 2006; Strocker y Keaney, 2004).

Otra vía de cardioprotección es a través de la estimulación de las enzimas catalizadoras de ON, lo que proporciona vasodilatación y ayuda a la prevención de problemas cardiovasculares (Burstein y cols, 2007; Das y Maulik, 2006, Baur y Sinclair, 2006; Nicholson y cols, 2008; Millan y cols, 2008; Chaves y cols, 2009).

### **1.9.2. Quimioprotección**

Se ha demostrado que el tRV junto a otros compuestos relacionados estructuralmente – los 5-alquenil-resorcinoles – poseen actividad antileucémica y antitumoral. El tRV ha mostrado ser eficaz en modelos celulares con diversos tipos de cáncer humano, al inhibir la proliferación de una gran variedad de líneas celulares de cáncer (Pirola y Fröjdö, 2008; Millan y cols, 2008).

En los cultivos celulares el RV induce la detención del ciclo celular permitiendo ganar tiempo para reparar el ADN dañado, inducir la activación de las vías que conducen a la apoptosis cuando existe daño irreversible a la célula, e inhibir la proliferación de células neoplásicas, contribuyendo a la prevención del cáncer (Pirola y Fröjdö, 2008; Baur y Sinclair, 2006; Millan y cols, 2008). También se ha comprobado *in vitro* que inhibe la angiogénesis y la invasión tumoral a los tejidos. Por otra parte, destaca el efecto quimiopreventivo cutáneo del RV (*in vitro* e *in vivo*) debido a que proporciona fotoprotección contra los rayos UV-B (Das y Maulik, 2006).

Por su parte, tRV es capaz de inhibir enzimas del citocromo P450, pudiendo tener efectos preventivos en el cáncer, ya que estas enzimas están implicadas en la producción de metabolitos con alto poder carcinogénico. Recientemente se ha asociado a tRV con la expresión del gen SIRT, implicado en la inhibición de la tumorigénesis, pero aún no se ha estudiado por completo las vías por las cuales actúa (Pirola y Fröjdö, 2008; Baur y Sinclair, 2006; Pervaiz, 2003; Athar y cols, 2007; Millan y cols, 2008).

### **1.9.3. Acción Fitoestrogénica.**

Cabe destacar que el tRV ha sido reconocido como un fitoestrógeno basado en la similitud estructural con el estrógeno sintético dietilbestrol (DES) (2 anillos fenólicos unidos por un enlace doble estireno generando un 3,4',5-trihidroxiestilbeno), pudiendo de esta manera unirse a receptores estrogénicos (RE), generando una actividad estrogénica (Das y Maulik, 2006; Baur y Sinclair, 2006; Gehm y cols, 1997).

### **1.9.4. Neuroprotección.**

Varios estudios en modelos animales sugieren que tRV puede reducir la incidencia de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, mediante la activación de las moléculas SIRT1. Igualmente se ha observado *in vitro* que tRV puede activar algunas de las enzimas neuronales (AMP-kinasa) que se estimulan bajo la restricción calórica proporcionando un efecto neuroprotector (Pállas y cols, 2009; Pervaiz, 2003).

### **1.9.5. Efecto Antiinflamatorio.**

La acción antiinflamatoria del tRV se ha propuesto como mecanismo de acción responsable de varios efectos beneficiosos que se le atribuyen, como acción antitumoral, acciones sobre el sistema nervioso, el hígado o el sistema CV. Esta regulación de la respuesta antiinflamatoria se lleva a cabo mediante la inhibición de la síntesis y liberación de mediadores pro-inflamatorios como el TNF- $\alpha$ , modificación de la síntesis de eicosanoides, inhibición de enzimas como iNOS, LOX y COX o inhibiendo factores de transcripción pro-inflamatorios como el NF- $\kappa$ B (Lastra y Villegas, 2007; Pállas y cols, 2009, Baur y Sinclair, 2006; Pervaiz, 2003; Millan y cols, 2008).

### 1.9.6. Efectos metabólicos.

Estudios recientes realizados en diversas especies, tales como ratones, *Saccharomyces cerevisiae*, y *C. elegans* (Baur y cols, 2006) han sugerido que el RV modularía la longevidad y regularía la ingesta calórica, posiblemente a través de las proteínas sirtuinas.

El tRV ha demostrado ser capaz de reducir los efectos negativos de la obesidad inducida en ratones por una dieta rica en grasas y energía, reduciendo además la resistencia a la insulina y a la diabetes tipo 2, mediante el aumento y optimización del metabolismo oxidativo y gasto energético en distintos tejidos, como musculo esquelético (Baur y Sinclair, 2006) hígado y tejido adiposo. Además este polifenol aumenta la sensibilidad a la insulina y reduce el desajuste lipídico propio de esta patología, ya que modula el metabolismo glucocídico y lipídico a nivel hepático. El mecanismo propuesto para realizar tales acciones se basa en la activación de la vía de la enzima 5' AMPK y de SIRT1, uno de los siete homólogos de Sir2 que se encuentran en los mamíferos (Baur y Sinclair, 2006).

SIRT1 es una deacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup>, cuya función es modular las rutas metabólicas derivadas de la restricción calórica que están relacionadas con los efectos beneficiosos que ésta tiene para la salud, especialmente en lo referente a la homeostasis energética y sensibilidad a la insulina. En concordancia con estos mecanismos, se encuentra el hecho de que la activación de AMPK y SIRT1, aumenta *in vivo* los niveles plasmáticos de adiponectina, adipocitoquina antiinflamatoria y es capaz de aumentar la sensibilidad a insulina. En definitiva, la sirtuina SIRT1, regula el metabolismo de la glucosa y ácidos grasos, aumentando la sobrevivencia de ratones expuestos a una dieta alta en calorías (Baur y cols, 2006). Por lo tanto, su uso ya ha sido considerado para regular la glucosa en el tratamiento de la diabetes tipo 2 y como una eventual droga para ser usada en la disminución de enfermedades asociadas a la edad (Baur y cols, 2006).

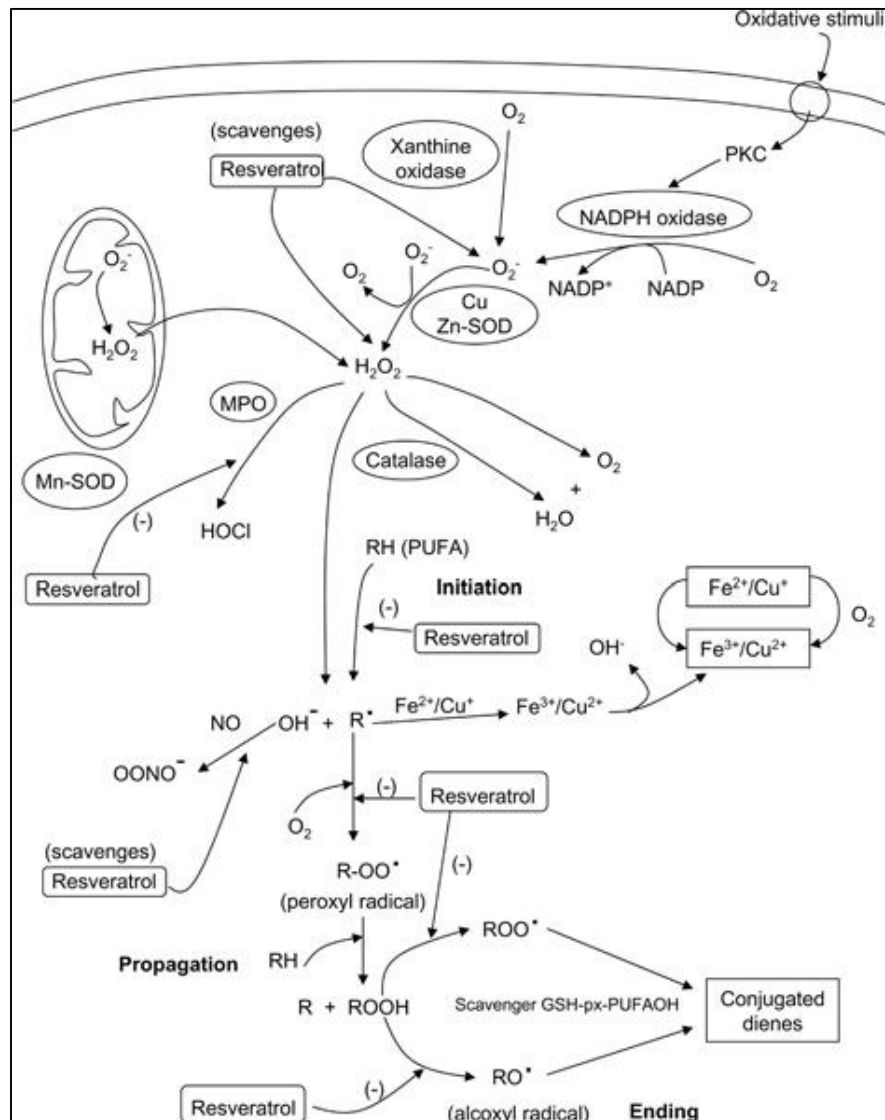
### 1.9.7. Antienvjecimiento.

Una de las principales vías de envejecimiento celular es la oxidación celular. A tRV se le atribuyen fuertes propiedades antioxidantes. Esto, debido a que es capaz de neutralizar algunas especies reactivas de oxígeno intracelular (ROS) (Millan y cols, 2008). En estudios relacionados, tRV inhibe intermediarios de oxígeno reactivo y la peroxidación lipídica producida por el factor de necrosis tumoral (TNF) en una gran variedad de células (Pirola y Fröjdö, 2008). tRV también neutraliza radicales peróxido e hidroxilo en miocardios perfundidos post-isquemia, disminuyendo la formación de malonaldehído, un presunto marcador de peroxidación lipídica (Baur y Sinclair, 2006). tRV puede mantener la concentración de antioxidantes intracelulares encontrados en sistemas biológicos, como es el caso de la concentración de glutatión (GHS) bajo condiciones de estrés oxidativo, mediante el aumento de los niveles de enzimas antioxidantes (GHS peroxidasa, GHS-transferasa y GHS reductasa) (Das y Maulik, 2006; Baur y Sinclair, 2006).

### 1.9.8. Efecto Antioxidante.

El tRV es un limpiador de radicales libres y un antioxidante potente debido a su capacidad de promover las actividades de una variedad de enzimas antioxidantes (**Figura VI**). La capacidad de los compuestos polifenólicos de actuar como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y el potencial para la deslocalización del electrón a través de la estructura química (Lastra y Villegas, 2007). Se ha demostrado que el RV es capaz de proteger al organismo de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales están involucradas directamente en el daño al ADN y a las membranas, favoreciendo la aparición de enfermedades neoplásicas.

Para proteger tejidos contra los efectos deletéreos del ROS, todas las células poseen numerosos mecanismos de defensa que incluyen las enzimas tales como SOD (superóxido dismutasa), catalasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa. El tRV puede mantener la concentración de estos antioxidantes intracelulares encontrados en los sistemas biológicos.



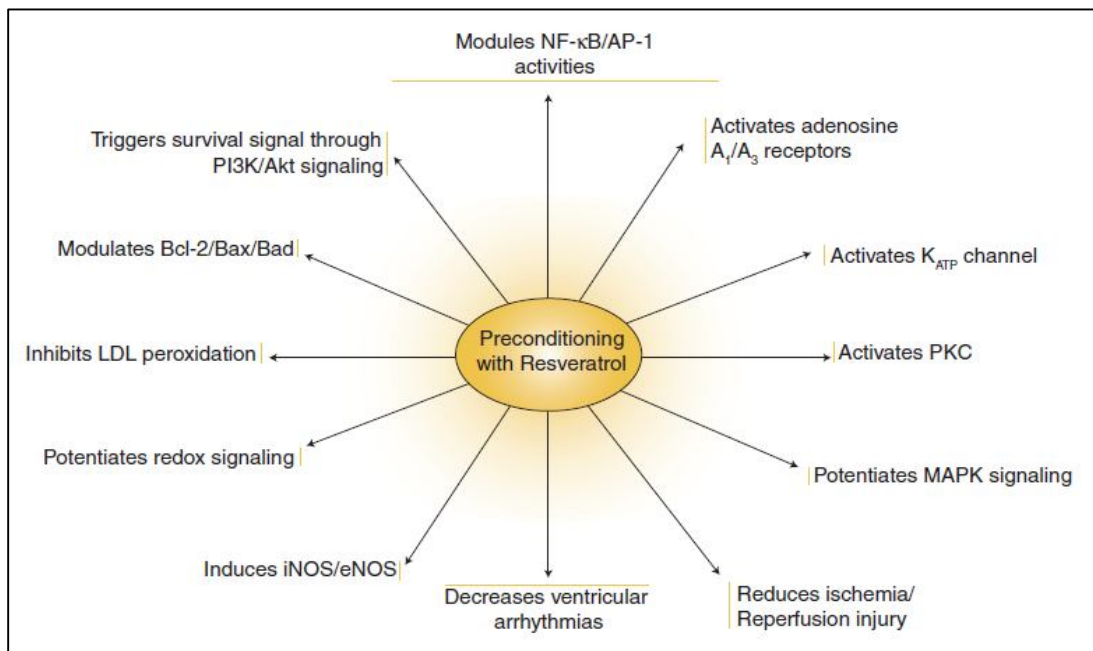
**Figura VI.** Resveratrol y su potencial antioxidante (Lastra y Villegas, 2007).

Se ha demostrado que el RV: (i) inhibe la peroxidación de lípidos presentes en las membranas celulares. Por lo tanto, reduce el riesgo de oclusión de las arterias coronarias, y consecuentemente el riesgo de infartos al miocardio, debido a su capacidad de elevar el nivel de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y reducir el nivel de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el plasma sanguíneo; (ii) activa la enzima óxido nítrico sintasa; (iii) protege las lipoproteínas de baja densidad contra daño oxidativo; (iv) inhibe la expresión

de ciclooxigenasas tipo 2, inducida por ésteres de forbol ; (v) inhibe la expresión de citoquinas en células vasculares; (vi) posee un efecto protector sobre el epitelio bronqueal, actuando sobre la expresión de genes involucrados en el metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Das y Maulik, 2006; Lastra y Villegas, 2007).

### 1.10. Moléculas blanco de tRV.

Se han propuesto diversos mecanismos de acción para tRV, esto debido a que es capaz de interactuar con un gran número de moléculas a diferentes niveles (**Anexo VII**) (Pirola y Fröjdö, 2008; Das y Maulik, 2006, Chao y cols, 2005) Los mecanismos del preconditionamiento farmacológico con tRV implican un gran número de señalizaciones moleculares, tal como se muestra en la **Figura VII** (Das y Maulik, 2006).



**Figura VII.** Precondicionamiento con tRV. Eventos moleculares involucrados, modificada de Das y Maulik, 2006.

### 1.11. Estudios del efecto vasodilatador de tRV.

En diversos estudios se ha encontrado que el tRV puede causar relajación dependiente de la concentración, en segmentos longitudinales del íleon de la rata y anillos de la vejiga urinaria de la rata. Esta observación es consistente con otros estudios que demostraron los efectos relajantes para el RV sobre preparaciones aisladas de músculo liso. El efecto vasodilatador de este compuesto fue documentado en pared vascular de distinto origen, incluyendo la aorta de rata, arterias coronarias porcinas, arterias mesentéricas y uterinas del conejillo de Indias y arterias coronarias de las ovejas (Bulue y Yilmaz, 2006).

Se sabe, que el óxido nítrico relaja el íleon y la vejiga urinaria vía incremento de la síntesis del cGMP y se ha demostrado que el resveratrol relaja los anillos aórticos de rata endotelio-intacta precontraídos por Fenilefrina (Fe) y KCl vía liberación de ON. Por una parte, el RV estimula la vasorelajación dependiente de endotelio por la estimulación de la cascada de ON/cGMP en anillos aórticos de rata y se ha demostrado que el tRV regula al alza (upregulation) el sistema de GC/cGMP en músculo liso de la arteria coronaria y acciona una respuesta vasorelajante (Harb y cols, 2009).

Un estudio realizado por Bulue y Yilmaz, 2006, indicó que el tRV disminuye el tono vascular influenciando dos tipos principales celulares de la pared vascular, es decir células endoteliales y células musculares lisas. tRV disminuye la sensibilidad del calcio de miofilamentos en músculo liso vascular y el aumento de la estimulación del  $[Ca^{2+}]_i$  en el endotelio (Bulue y Yilmaz, 2006).

Debido a su capacidad para estimular enzimas catalizadoras de ON y actuar de manera experimental sobre las vías y las dianas de la cardioprotección, tRV podría prevenir problemas cardiovasculares (Chaves y cols, 2009; Gresele y cols, 2008). La habilidad de tRV para prevenir los efectos nocivos del exceso de ingesta calórica y la modulación de las vías conocidas de la longevidad, sugieren que tRV y moléculas con propiedades similares pueden ser herramientas de evaluación en la búsqueda de la clave regulatoria del balance energético, la salud y la longevidad (Baur y Sinclair, 2006).

El estudio de la reactividad vascular permite evaluar la respuesta del endotelio y del músculo liso vascular a diferentes sustancias vasodilatadoras y vasopresoras, que actúan estimulando o inhibiendo procesos funcionales que afectan el tono vascular. Además, permite estudiar cómo dicha respuesta se modifica en las diferentes situaciones a las cuáles son sometidos los vasos. La aorta de rata ha sido por años un modelo clásico para evaluar reactividad vascular así como el efecto modulador del endotelio (Hartshorne y cols, 2004).

Sobre la base de los antecedentes expuestos, en esta tesis se evaluó la hipótesis de que el tRV pudiese actuar como agente protector de la reactividad de anillos de aorta aislada de rata. Con este fin los anillos fueron sometidos a estrés oxidativo con un agente oxidante ( $H_2O_2$ ), y se evaluó biomarcadores de eficacia ( $E_{max}$ ) y de eficiencia ( $CE_{50}$ ) para tRV, adecuados para evaluar el potencial antioxidante de otros fitoquímicos. De esta manera se espera aportar a la generación de biomarcadores robustos para fitoquímicos antioxidantes, mediante futuros ensayos complementarios al que se propone en esta tesis.

---

## **2. HIPÓTESIS**

La evaluación del efecto protector de tRV sobre la contractibilidad de anillos de aorta de rata, sometidos a condiciones de estrés oxidativo, permitirá obtener biomarcadores de eficacia ( $E_{max}$ ) y de eficiencia ( $CE_{50}$ ), útiles para evaluar el potencial antioxidante de otros fitoquímicos.

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General.**

Obtención de biomarcadores asociados con la contractibilidad de anillos de aorta de rata, útiles para evaluar el potencial efecto protector de tRV en vasos sometidos a condiciones de estrés oxidativo.

#### **3.2. Objetivos Específicos.**

1. Evaluar la contractibilidad de anillos de aorta de rata preincubados con solución Krebs/Locke, mediante su relajación frente a ACh.
2. Evaluar la contractibilidad de anillos de aorta de rata preincubados con solución Krebs/Locke + tRV, mediante su relajación frente a ACh.
3. Evaluar la contractibilidad de anillos de aorta de rata preincubados con solución Krebs/Locke + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mediante su relajación frente a ACh.
4. Evaluar la contractibilidad de anillos de aorta de rata preincubados con solución Krebs/Locke + tRV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mediante su relajación frente a ACh.
5. Evaluar la contractibilidad asociada a la contracción inducida por K<sup>+</sup> 70 mM y Fe en las condiciones de incubación señaladas en los puntos 1 al 4.

---

## 4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 4.1. MATERIALES

#### 4.1.1. Animales

Ratas macho, Sprague - Dawley (240g – 280g), del Bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

#### 4.1.2. Soluciones Fisiológicas

- Solución fisiológica:  
**Solución Buffer Krebs – Henseleit Modificado** (concentración en mM): NaCl 122; KCl 4,7; NaHCO<sub>3</sub> 15,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O 1,2; CaCl<sub>2</sub> x2H<sub>2</sub>O 2,0; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>xH<sub>2</sub>O 11,5; EDTA 0,026 (Vinet y cols, 1991; Duarte y cols, 2004).  
**Solución Krebs Locke** (Concentración en mM): NaCl 145; KCl 5,6; MgCl<sub>2</sub> 1,2; HEPES ácido 10; CaCl<sub>2</sub> x2H<sub>2</sub>O 2,0 (Vinet y cols, 1991).
- **Solución Despolarizante KCl (70mM)** (concentración en mM): NaCl 56,7; KCl 70; NaHCO<sub>3</sub> 15,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O 1,2; CaCl<sub>2</sub> x2H<sub>2</sub>O 2,0; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>xH<sub>2</sub>O 11,5; EDTA 0,026. (Vinet y cols, 1991).

#### 4.1.3. Reactivos

- Acetilcolina Clorhidrato, Sigma ® (ACh) (PM:181,66 g/mol)
- Fenilefrina, RBI ® (Fe) (PM: 167,205 g/mol)
- Trans – resveratrol, Sigma ® (t-RV) (PM:228,24 g/mol)
- Eter dietílico, Sigma®.
- Etanol
- Solución Peróxido de Hidrógeno, Sigma ® (100 µM)
- Mezcla gaseosa con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> (AGA)

#### **4.1.4. Equipos**

- Myobath II (World Precision Instruments, 2008) (Anexo VIII)
- Transductor de Fuerza 25g (World Precision Instruments)
- Amplificador Transbridge (World Precision Instruments)
- Agitador magnético (Heidolph, modelo MR 2002)
- Balanza analítica (Mettler (E+/- 1mg))
- Equipo análogo conversor; (LabTrax -4/24T, World Precision Instruments)
- pHmetro (SHOTT GERATE, modelo CG 805)
- Baño termoregulado (Precision)
- Estufa (Mettmert UL)
- Incubadora (Mettmert)
- Vortex (Thermolyne)

#### **4.1.5. Material fungible**

- Placas Deep Well, 96, pocillos redondos

#### **4.1.6. Material quirúrgico**

- Bandeja de disección
- Riñón
- Cánula
- Pinza diente de ratón (Germany Stainless Volk)
- Pinzas finas (Jumst Stainless)
- Tabla de madera
- Tijeras con agarre (Pakistan)
- Tijeras curvas (Pakistan)
- Tijeras con punta (volk Germany Stanless)
- Elásticos
- Papel absorbente
- Lámpara
- Guantes

**4.1.7. Material de vidrio y otros.**

- Atomizador 1000mL
- Bagueta
- Botella 1000 mL (Shott Duran)
- Eppendorf
- Espátula (Heathrow Scientific)
- Matraz aforado 1000 mL (Schott duran)
- Matraz aforado 250 mL (Schott duran)
- Matraz aforado 500 mL (Pirex)
- Micropipeta p1000 (Hirschmann Laborperate)
- Micropipeta p20 Hirschmann Laborperate
- Micropipeta p200 (Hirschmann Laborperate)
- Placa de Petri
- Probeta 100 mL (Hirschmamm Techcolor Germany)
- Tubos Falcon 15 mL
- Vaso precipitado 100 mL (Boeco Germany)

## 4.2. METODOLOGÍA

### 4.2.1. Técnica.

Evaluación de reactividad vascular en anillos de aorta aislada de rata.

### 4.2.2. Fundamento de la Técnica.

Es un ensayo farmacológico clásico, en el que se utiliza anillos de aorta de rata para evaluar el efecto de fármacos y extractos derivados de plantas en músculo liso y endotelio. La técnica de órgano aislado tiene como finalidad simular, *in vitro*, las condiciones fisiológicas y mecánicas a las cuales está expuesto el tejido *in vivo* (Vinet y cols, 1991).

### 4.2.3. Herramientas farmacológicas y compuestos en estudio.

Las herramientas farmacológicas utilizadas para el análisis de la propiedad vasodilatadora fueron los agonistas: ACh (agonista colinérgico no selectivo) y Fe (agonista adrenérgico  $\alpha 1$  selectivo).

Tanto ACh como Fe fueron disueltas individualmente en agua destilada desionizada llevándolos a una concentración final de  $10^{-2}$  M (solución madre), las cuáles se mantuvieron alicuotadas y congeladas a  $-20$  °C. A partir de cada una de las soluciones madre de los agonistas se realizaron diferentes diluciones el mismo día del experimento. Para obtener las curva concentración respuesta de cada agonista, se prepararon 5 concentraciones diferentes (en M:  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$ ).

El tRV fue disuelto en EtOH (solubilidad EtOH: 50 mg/mL) a una concentración final de  $10^{-1}$ M (solución madre), estas se mantuvieron alicuotadas y congeladas a  $-20$ °C. A partir de la solución madre se realizaron tres diluciones de tRV [100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M ] en solución Locke (Solubilidad en H<sub>2</sub>O: 3 mg/100 mL, requiere calor) las cuales se mantuvieron congeladas a  $20$ °C para ser utilizadas el día del experimento (Sigma, 1997).

En todos los experimentos la concentración final de EtOH no superó el 0,1% de la solución utilizada (Shinohara y cols, 2007; Naderali y cols, 2000; Bukarica y cols, 2008). El agente oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 µM ], fue preparado en agua bidestilada el mismo día del experimento, para luego tomar una alícuota para llevarlo a la concentración final [100 µM ] en el pocillo con solución Locke.

#### **4.2.4. Obtención y Preparación de Muestras.**

Se emplearon ratas macho Sprague - Dawley (Bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile), de igual edad y con un peso entre 240 y 280 g. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones ambientales controladas, con ciclos de luz-oscuridad alternados de 12 horas. La temperatura se mantuvo entre 18° y 22°C y la alimentación fue *ad-libitum*.

Las ratas fueron sacrificadas por depresión respiratoria inducida por anestesia con éter etílico. Luego se realizó una disección en la sección torácica, retirando todos los órganos internos, para posteriormente extraer de forma rápida una sección de la aorta torácica descendente, la cuál fue colocada en una cápsula de Petri con solución buffer Krebs-Henseleit modificado (KHM) (pH = 7, 4) y burbujeo constante con gas carbógeno (95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>). Luego se removió el tejido periarterial (grasa y tejido conectivo) de la aorta, y posteriormente se cortaron cuatro anillos concéntricos (4-5 mm) (Vinet y cols, 1991; Andriambeloson y cols, 1997).

#### **4.2.5. Pre-condicionamiento del Tejido.**

Con el propósito de evaluar el efecto protector de tRV, los vasos fueron pre-incubados en placas multipocillos, bajo distintas situaciones, que consideraron (Anexo IX):

- 4.2.5.1. Experimento control.** (1) medio control (Locke), (2) medio control más tRV (Locke + tRV). Se utilizaron 3 concentraciones de tRV [100 µM, 10 µM, 1 µM ] . El pre-condicionamiento se realizó durante 10 h a 33 °C. Una vez cumplido el tiempo, se realizaron 2 lavados a cada pocillo con

solución Locke. Luego los vasos fueron preincubados con solución Locke durante 3 h a 33 °C.

**4.2.5.2. Experimento simulación estrés oxidativo.** (1) medio control (Locke), (2) medio control más tRV (Locke + tRV). El pre-condicionamiento se realizó durante 10 h a 33 °C. Una vez cumplido el tiempo, se realizaron 2 lavados a cada pocillo con solución Locke. Luego los vasos fueron preincubados con medio oxidante (Locke + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [100 µM]) durante 3 h a 33°C (Kao y cols, 2010).

#### **4.2.6. Montaje de los Anillos de Aorta.**

Los anillos fueron montados entre dos ganchos de acero, que se introdujeron en una copa que contenía solución KHM (pH = 7,4) con burbujeo constante con gas carbógeno a una temperatura de 37°C. Uno de los ganchos de acero se fijó sobre un gancho de la varilla y el otro gancho se conectó a un transductor de fuerza, el cual estaba conectado a un conversor análogo-digital, para el registro de la tensión isométrica. Los anillos fueron equilibrados en el baño de tejido, donde se ajustó la tensión basal a 1,5 g. Una vez montado el anillo de aorta en el sistema, se procedió a estabilizar el sistema por 60 minutos, cambiando la solución KHM, cada 15 minutos, para evitar la formación de metabolitos.

#### **4.2.7. Registro de Datos.**

Las señales de salida del amplificador se registraron con un sistema de adquisición de datos (Data-Trax), el cual se visualizó en un monitor que forma parte del equipo Myobath II (WPI, USA).

#### **4.2.8. Ensayos de Reactividad de Anillos de Aorta.**

Para comprobar la viabilidad de la preparación, los anillos se contrajeron con una solución despolarizante ( $K^+$  70 mM) al menos tres veces hasta que la preparación alcanzó una respuesta máxima estable. La integridad del endotelio se evaluó al inducir relajación de los anillos con Acetilcolina (ACh,  $10^{-6}$  M) en vasos precontraídos con Fe ( $10^{-7}$  M) (Vinet y cols, 1991; Andriambeloson y cols, 1997) (Anexo X).

Con el propósito de evaluar la capacidad de relajación de los anillos de aorta precondicionados, se procedió a contraer los anillos con Fe ( $10^{-6}$  M) para luego construir curvas concentración-respuesta (CCR), mediante la adición de concentraciones acumulativas de ACh ( $10^{-9}$  M a  $10^{-5}$  M) (Moreno, 2005).

#### **4.2.9 Análisis de datos.**

Los resultados se expresaron como porcentaje de disminución en el nivel de precontracción (vasorelajación). A partir de estas CCR se obtuvo los valores de efecto máximo ( $E_{max}$ ) y  $pD_2$ , donde  $pD_2 = -\log CE_{50}$  ( $CE_{50}$  es la concentración efectiva que induce el 50% del  $E_{max}$ ). También se registró la contracción máxima frente a KCl 70 mM y Fe ( $10^{-6}$  M).

## 5.RESULTADOS

### 5.1. BIOMARCADORES EN CONDICIONES PRELIMINARES

Antes de abordar el objetivo principal, como es evaluar el posible efecto protector de tRV en aorta de rata, se procedió a determinar el valor de los biomarcadores básicos elegidos en condiciones estándares, es decir, mediante la evaluación de la contractibilidad de los anillos de aorta inmediatamente después de que fueron extraídos. Los biomarcadores se detallan en la Tabla 1.

**TABLA 1. Biomarcadores en condiciones estándares**

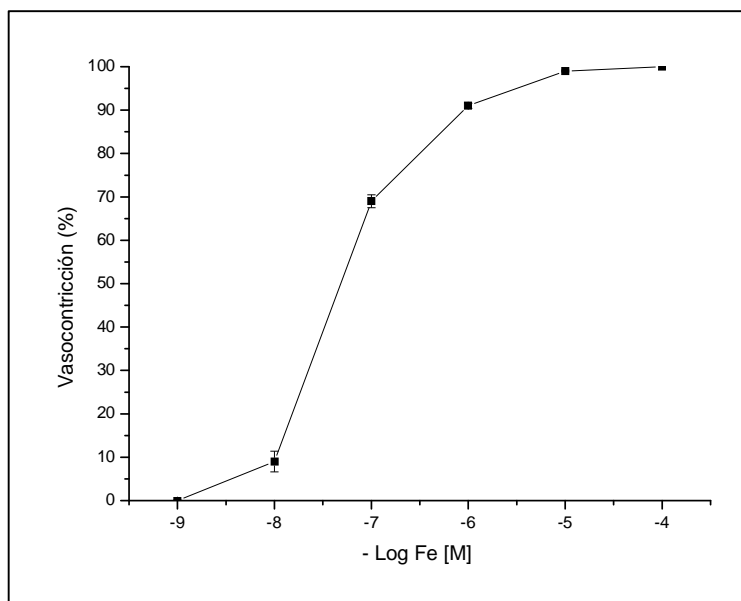
<b>Biomarcador</b>	<b>Promedio (3)</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>N</b>
Emax- K <sup>+</sup> 70 mM (g)	2,586	0,09	3
Emax- Fe (%) (1)	86,46	12,54	3
pD <sub>2</sub> -Fe	-7,38	0,03	3
Emax-ACh (%) (2)	103,69	14,35	3
pD <sub>2</sub> -ACh	-7,47	0,24	3

(1) Expresada como % de Emax- K<sup>+</sup> 70 mM

(2) Expresada como % de la relajación hasta la línea basal

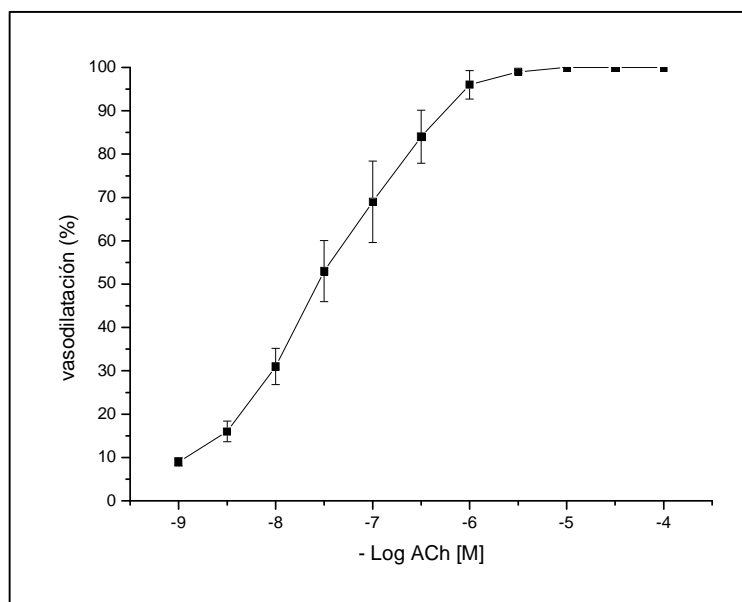
(3) Promedio en base a un triplicado.

La Fig. VIII muestra la CCR control de Fe, expresada como el promedio  $\pm$  EE de los porcentajes de vasoconstricción, luego de la adición de concentraciones acumulativas de Fe sobre anillos de aorta de rata con endotelio. La contracción de los vasos, 3 veces consecutivas mediante K<sup>+</sup> 70 mM, previa a la adición del agonista, no sólo tiene por objetivo estabilizar el sistema de registro, sino que además permite utilizar la tercera contracción a K<sup>+</sup> 70 mM como respuesta de referencia (respuesta estandarizada). De esta manera la Emax-Fe expresa el porcentaje de contracción inducido por el agonista respecto a Emax-K<sup>+</sup> 70 mM.



**Figura VIII.** Vasoconstricción inducida por Fe ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M) en anillos de aorta de rata con endotelio. Los puntos representan el valor de promedio  $\pm$  error estándar ( $X \pm EE$ ), con N=4.

La Fig. IX muestra la CCR de ACh obtenida al agregar concentraciones acumulativas del agonista ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M) sobre anillos de aorta de rata precontraídos con Fe ( $10^{-7}$  M).



**Figura IX.** Vasodilatación inducida por ACh ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M) en anillos de aorta de rata con endotelio precontraídos con Fe ( $10^{-7}$  M). Los puntos representan el valor de promedio  $\pm$  error estándar ( $X \pm EE$ ), con N=3.

## 5.2. BIOMARCADORES EN CONDICIONES DE PREINCUBACIÓN CON tRV

### a) Biomarcadores en condiciones de preincubación con tRV/Locke (12 h)

La Tabla 2 muestra los biomarcadores de contractibilidad de anillos de aorta de rata preincubados durante 16 h. Los vasos se incubaron en ausencia o presencia de tRV/ Locke (1, 10 y 100  $\mu$ M) durante 12 h para luego permanecer 4 h adicionales antes de ser sometidos a los ensayos de contractibilidad.

**TABLA 2. Biomarcadores en condiciones de preincubación con tRV/Locke (12 h)**

Biomarcador	Control	tRV (1 $\mu$ M)	tRV (10 $\mu$ M)	tRV (100 $\mu$ M)
Emax-K <sup>+</sup> 70 mM (g)	1,023	0,866	1,838	1,559
Emax-Fe (%) (1)	79,08	108,08	77,91	89,03
pD <sub>2</sub> -Fe	-7,60	-7,00	-7,60	-7,70
Emax-ACh (%) (2)	36,84	0,32	21,02	21,83

(1) Expresada como % de Emax-K<sup>+</sup> 70 mM

(2) Expresada como % de la relajación hasta la línea basal

### b) Biomarcadores en condiciones de preincubación con tRV/Locke (10 h)

La Tabla 3 muestra los biomarcadores de contractibilidad de anillos de aorta de rata preincubados durante 13 h. Los vasos se incubaron en ausencia o presencia de tRV/ Locke (1, 10 y 100  $\mu$ M) durante 10 h para luego permanecer 3 h adicionales antes de ser sometidos a los ensayos de contractibilidad. Esta modificación permitió tener mayores respuestas a ACh.

**TABLA 3. Biomarcadores en condiciones de preincubación con tRV/Locke (10 h)**

Biomarcador	Control	tRV (1 $\mu$ M)	tRV (10 $\mu$ M)	tRV (100 $\mu$ M)
Emax-K <sup>+</sup> 70 mM (g)	0,841	1,057	1,295	0,999
Emax-Fe (%) (1)	119,14	112,77	91,35	85,39
pD <sub>2</sub> -Fe	-5,70	-5,70	-5,60	-5,60
Emax-ACh (%) (2)	26,25	30,20	55,03	55,22

(1) Expresada como % de Emax-K<sup>+</sup> 70 mM

(2) Expresada como % de la relajación hasta la línea basal

c) **Biomarcadores en condiciones de preincubación con tRV/Locke**

La Tabla 4 muestra los biomarcadores de contractibilidad de anillos de aorta de rata preincubados con 3 concentraciones de tRV/Locke (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) 10 h, junto al control. Los vasos permanecieron 3 h adicionales antes de ser sometidos a los ensayos de contractibilidad. Emax- $\text{K}^+$  70 mM mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) cuando los anillos se incubaron con 10 y 100  $\mu\text{M}$  de tRV, respecto del control (Fig. X a XII). Sin embargo, Emax-Fe, Emax-ACh y  $\text{pD}_2$ -ACh no muestran diferencias significativas respecto de sus respectivos controles.

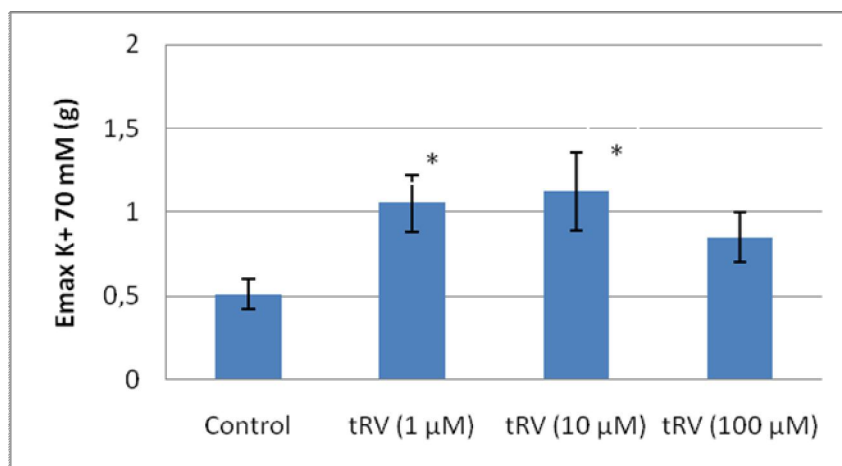
**TABLA 4. Biomarcadores en condiciones de preincubación con tRV/Locke (N=6)**

Biomarcador	Control	tRV (1 $\mu\text{M}$ )	tRV (10 $\mu\text{M}$ )	tRV (100 $\mu\text{M}$ )
Emax- $\text{K}^+$ 70 mM (g)	0,509 $\pm$ 0,09	1,056 $\pm$ 0,17*	1,125 $\pm$ 0,23*	0,853 $\pm$ 0,15
Emax-Fe (%) (1)	145,45 $\pm$ 16,89	94,50 $\pm$ 15,57	108,18 $\pm$ 15,88	135,08 $\pm$ 15,95
Emax-ACh (%) (2)	52,67 $\pm$ 3,48	68,82 $\pm$ 6,69	65,05 $\pm$ 8,62	47,38 $\pm$ 4,91**
$\text{pD}_2$ -ACh	-7,13 $\pm$ 0,21	-7,77 $\pm$ 0,23	-7,62 $\pm$ 0,39	-6,88 $\pm$ 0,25

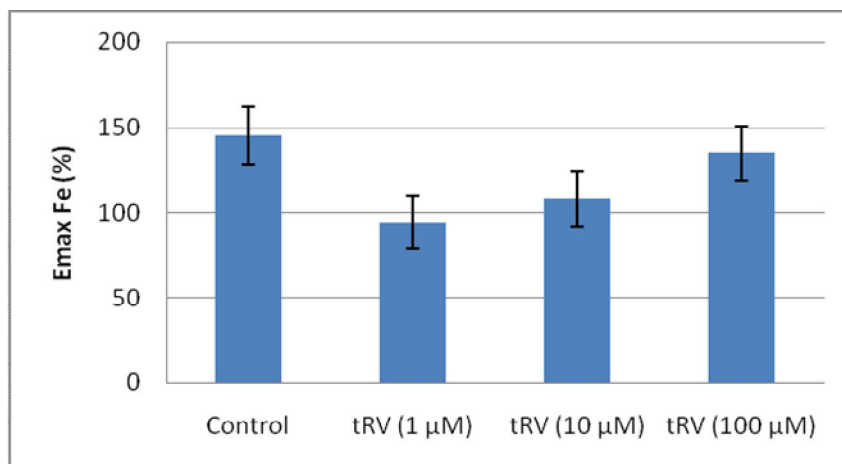
(1) Expresada como % de Emax- $\text{K}^+$  70 mM

(2) Expresada como % de la relajación hasta la línea basal

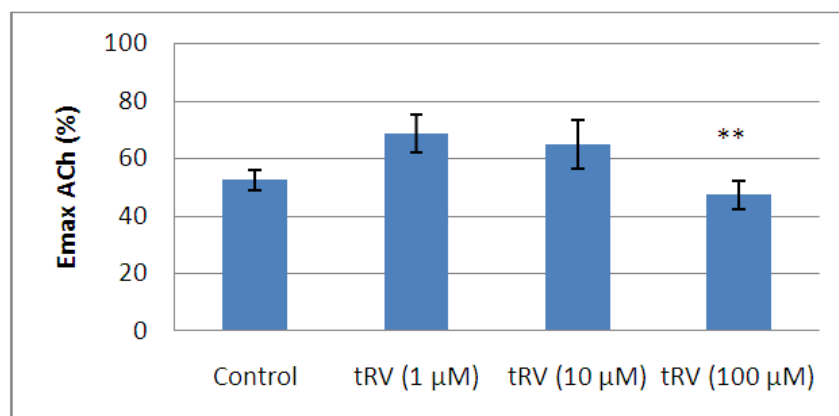
\* Señala diferencia significativa respecto del control ( $P < 0,05$ )



**Figura X.** Contracción máxima (g) inducida por  $\text{K}^+$  70 mM en los anillos de aorta de rata preincubados en ausencia y presencia de tRV (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ). Cada barra representa el valor de promedio  $\pm$  error estándar ( $X \pm \text{EE}$ ), con N=6. \* Señala diferencia significativa respecto del control ( $P < 0,05$ ).



**Figura XI.** Porcentaje de contracción máxima inducida por Fe en anillos de aorta de rata preincubados en ausencia y presencia de tRV (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ). Cada barra representa el valor de promedio  $\pm$  error estándar ( $X \pm \text{EE}$ ), con  $N=6$ .



**Figura XII.** Porcentaje de vasodilatación máxima inducida por ACh en anillos de aorta de rata preincubados en ausencia y presencia de tRV (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ). Cada barra representa el valor de promedio  $\pm$  error estándar ( $X \pm \text{EE}$ ), con  $N=6$ . \*\* Señala diferencia significativa respecto de su contraparte ( $P < 0,05$ ).

**d) Biomarcadores en condiciones de preincubación con tRV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

La Tabla 5 muestra el valor de los biomarcadores de contractibilidad en vasos que fueron tratados con tRV/Locke (1, 10 y 100  $\mu$ M) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En ningún caso se encontró diferencias significativas respecto de sus respectivos controles.

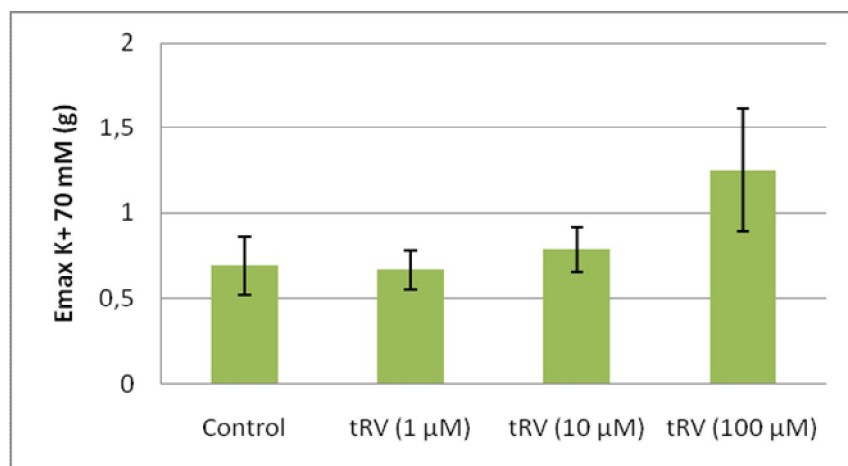
**TABLA 5. Biomarcadores en condiciones de preincubación con tRV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) (N=4)**

Biomarcador	Control	tRV (1 $\mu$ M)	tRV (10 $\mu$ M)	tRV (100 $\mu$ M)
E <sub>max</sub> -K <sup>+</sup> 70 mM (g)	0,691 $\pm$ 0,17	0,666 $\pm$ 0,11	0,784 $\pm$ 0,13	1,252 $\pm$ 0,36
E <sub>max</sub> -Fe (%) (1)	119,05 $\pm$ 11,39	103,84 $\pm$ 24,48	140,70 $\pm$ 8,47	104,25 $\pm$ 8,90
E <sub>max</sub> -ACh (%) (2)	75,06 $\pm$ 8,11	77,85 $\pm$ 14,40	65,69 $\pm$ 6,12	67,50 $\pm$ 5,04**
pD <sub>2</sub> -ACh	-7,73 $\pm$ 0,19	-8,15 $\pm$ 0,41	-7,88 $\pm$ 0,22	-7,15 $\pm$ 0,34

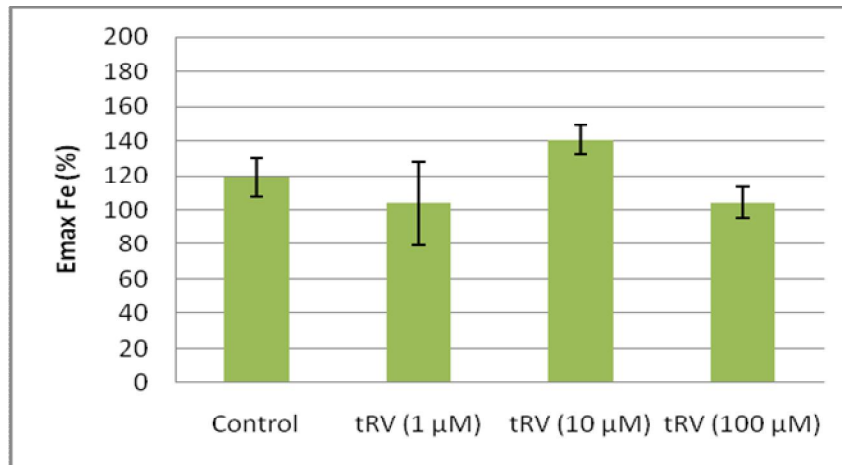
(1) Expresada como % de E<sub>max</sub>-K<sup>+</sup> 70 mM

(2) Expresada como % de la relajación hasta la línea basal

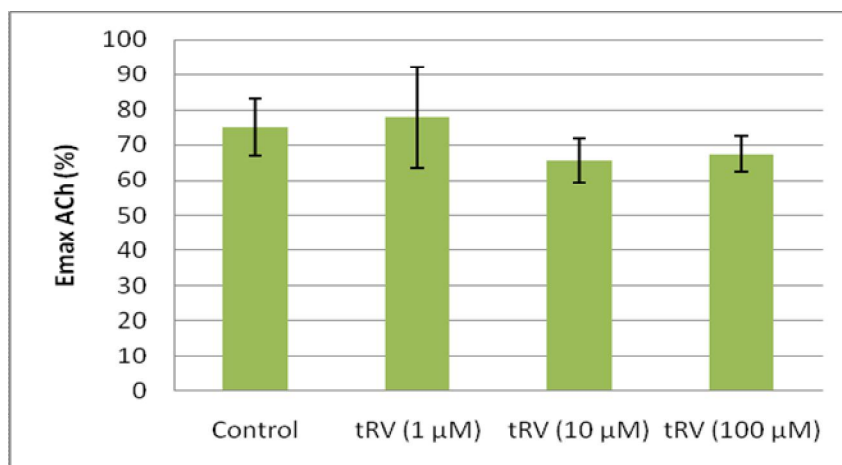
\*\* Señala diferencia significativa respecto de su contraparte (P < 0,05)



**Figura XIII.** Contracción máxima inducida por K<sup>+</sup> 70 mM en anillos de aorta de rata preincubados en ausencia y presencia de tRV (1, 10 y 100  $\mu$ M) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M). Cada barra representa el valor de promedio  $\pm$  error estándar (X  $\pm$  EE), con N=4.



**Figura XIV.** Porcentaje de contracción máxima inducida por Fe en anillos de aorta de rata preincubados en ausencia y presencia de tRV (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ). Cada barra representa el valor de promedio  $\pm$  error estándar ( $X \pm \text{EE}$ ), con  $N=4$ .



**Figura XV.** Porcentaje de vasodilatación máxima inducida por ACh en anillos de aorta de rata preincubados en ausencia y presencia de tRV (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ). Cada barra representa el valor de promedio  $\pm$  error estándar ( $X \pm \text{EE}$ ), con  $N=4$ .

---

## 6. DISCUSIÓN

En los últimos años ha crecido exponencialmente el número de publicaciones que muestran los efectos bioactivos de tRV, en particular sus efectos beneficiosos en la prevención de alteraciones cardiovasculares, neurodegenerativas y desarrollo de cáncer (Pervaiz, 2003, Das y Maulik, 2006; Subramanian y cols, 2010). A propósito de su amplio espectro de acción, tRV ha sido evaluado en un sin número de modelos biológicos, lo que ha complicado la interpretación de sus eventuales beneficios, y su traslado a la esfera clínica (Subramanian y cols, 2010).

La evaluación de agentes como tRV representa un gran desafío para la farmacología clásica, ya que no sólo su acción se asocia a múltiples blancos, sino que comparte con otros agentes, denominados comúnmente como “antioxidantes”, la particularidad de presentar efectos contradictorios (prooxidantes), situación que se asocia habitualmente con la concentración que alcanzan en determinados sitios de acción (Bhat y cols, 2001; Lastra y Villegas, 2007; Subramanian y cols, 2010).

Este trabajo representa un primer paso para abordar el ensayo de bioactividad de sustancias como tRV, lo que exige una perspectiva compleja, demandando ensayos a diferentes niveles. Como punto de partida se eligió un modelo clásico de reactividad vascular (aorta de rata) y un primer grupo de biomarcadores, como son: Emax-K<sup>+</sup> 70 mM (g); Emax-Fe (%), pD<sub>2</sub>-Fe; Emax-ACh (%), pD<sub>2</sub>-ACh. Todos estos biomarcadores son factibles de ser medidos mediante la evaluación de la contractibilidad del vaso. El requisito planteado para su medición fue que reflejaran tanto eficacia como eficiencia del sistema, al nivel que se está evaluando.

Con la finalidad de poner en marcha el equipo Miobath II y comprobar la viabilidad de las preparaciones y la técnica, los primeros resultados se enfocaron en determinar el valor de los biomarcadores básicos elegidos en condiciones estándares, es decir mediante la evaluación de la contractibilidad de los anillos de aorta de rata inmediatamente después de que fueron extraídos. De esta manera se obtuvieron dos CCR control tanto para Fe como para ACh, tal como se observa en la figura VIII y IX.

El diseño experimental consistió en evaluar la funcionalidad de los vasos sanguíneos tanto en condiciones normales como condiciones de estrés oxidativo, mediante la relajación dependiente de endotelio considerando a tRV como una variable que puede modificar la situación de estrés oxidativo, como un cardioprotector, es decir como un protector celular.

Tal como se desprende de los resultados obtenidos en esta tesis, las condiciones de incubación de los anillos de aorta de rata afectaron su respuesta, dependiendo del medio de incubación, la temperatura, y el tiempo de incubación.

Puesto que los anillos de aorta de rata fueron preincubados en medio de cultivo con HEPES como buffer, no se utilizó un incubador con CO<sub>2</sub>. La temperatura escogida fue de 33°C ya que ella nos permitió establecer un protocolo adecuado. Como es bien sabido, existe una relación entre tiempo y temperatura; al disminuir la temperatura del sistema de 37°C a 33°C se observaron mejores respuestas con los agonistas utilizados.

Una situación destacable durante la puesta a punto del protocolo de preincubación de los anillos de aorta fue evaluar la sensibilidad de su respuesta contráctil al medio de incubación. En un primer experimento, se evaluó la contractibilidad de anillos de aorta de rata preincubados durante 16 h, donde los vasos fueron preincubados en ausencia o presencia de tRV/ DMEM-F12 modificado (datos no mostrados) (1, 10 y 100 µM) durante 12 h para luego permanecer 4 h adicionales antes de ser sometidos a los ensayos de contractibilidad. Es así que al utilizar medio de cultivo (DMEM-F12) prácticamente no se observó la contracción de los anillos de aorta frente a KCl 70 mM y a Fe, una situación que ha sido informada por Resende y cols (2004), quienes además observaron que la respuesta contráctil disminuía con la edad de las ratas. Es importante señalar que cuando se ha evaluado polifenoles utilizando vasos incubados en medio de cultivo se ha observado ciertos artefactos en los registros posiblemente resultado de reacciones redox; se ha propuesto que el tRV es inestable y es oxidado y degradado en el medio de cultivo generando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yang y cols, 2010).

Debido a que los polifenoles son inestables en solución alcalina, algunos estudios han demostrado que el  $\text{OH}^-$  juega un papel importante en la degradación de teaflavina (un polifenol del té negro) y se ha identificado el theanaphthoquinona como el principal producto final de la oxidación (Yang y cols, 2010). Otros estudios han demostrado que los polifenoles del té verde incubados hasta 48 h en agua ultra pura, produjo solo una pequeña cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , indicando que los polifenoles del té verde incluyendo EGCG, son estables en agua. Investigaciones adicionales han encontrado que EGCG, quercetina y ácido gálico producen mucho más  $\text{H}_2\text{O}_2$  cuando están incubados en DMEM versus los medios de cultivo RPMI164 o de McCoy's; esto sugiere que la composición del medio afecta a la oxidación de los polifenoles. Estudios realizados por Yang y cols (2010), examinaron la degradación del tRV usando agua ultra pura como solución de incubación, agregando varios ingredientes contenidos en BME; encontraron que el 96% de tRV 200  $\mu\text{M}$  fue degradado en BME después de 24 h de incubación, generando cerca de 90  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La adición de bicarbonato de sodio estimuló la degradación de tRV en el agua ultra pura, pero otros ingredientes típicos del medio de cultivo, tales como una mezcla de sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas y D-glucosa de BME, no estimularon la degradación. Los niveles de degradación de tRV y los niveles de la producción  $\text{H}_2\text{O}_2$  fueron similares cuando el tRV fue incubado en bicarbonato de sodio en agua ultra pura y en BME, sugiriendo que la degradación de tRV en BME se puede atribuir principalmente a los iones del bicarbonato en el medio.

Hasta la fecha, se han reportado varios compuestos con la capacidad de inhibir la oxidación *in vitro* de polifenoles; éstos incluyen el SOD, la vitamina C, y el borato. Sin embargo, se sabe que la vitamina C puede ser oxidada en el medio de cultivo, llevando a la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el borato es altamente tóxico para las células debido a sus características ácidas. El papel de los iones del bicarbonato en el medio es proporcionar una capacidad tamponante. Se encontró además que tRV era estable en BME que contenía HEPES o TRIS, sugiriendo que HEPES y los Tris son útiles en el aumento de la capacidad tapón del medio (Yang y cols, 2010). En este punto, es fundamental considerar que una parte importante de los estudios de estrés oxidativo se realizan en modelos celulares que son incubados en estos medios, abriendo una pregunta adicional, en el sentido del efecto del propio medio de cultivo sobre el sistema que está siendo evaluado.

En un segundo intento, para determinar si la incubación con Locke y el tiempo de incubación afectaban la respuesta en los anillos de aorta de rata. Al comparar los biomarcadores en situaciones de preincubación durante 16 h (Tabla 2) con respecto a los biomarcadores en condiciones preliminares (Tabla 1) se observó una notoria disminución de  $E_{max-ACh}$  (%) y una disminución específica de la contracción inducida por Fe. Al comparar los biomarcadores en condiciones de preincubación durante 13 h (tabla 3) con respecto a los biomarcadores en condiciones de preincubación (13 h) se observó una mayor respuesta a ACh.

La disminución de las respuestas hacia los agonistas vasoconstrictores observadas en el primer grupo (16 h de incubación) fueron menores a las respuestas observadas en el segundo grupo (13 h de incubación). Estas diferencias de respuestas observadas al modificar el protocolo, donde la incubación de las aortas de rata fue de 16 horas, se atribuye a la edad de las ratas y al tiempo de incubación. El mecanismo que estaría implicado, se debería a que el EO puede ser inducido por incubación. Además el aumento de  $H_2O_2$  y malonaldehído producidos tras la incubación es mayor en CML aórticas de ratones viejos que en ratones jóvenes. Estudios realizados por Resende y cols, (2004), explican este fenómeno de funcionamiento:

- 1) La incubación de anillos aórticos dañaría la pared produciendo estrés oxidativo, y aumento sustancial del mRNA iNOS, y así el anatagonismo fisiológico del NO en la contracción inducida por el agonista.
- 2) La contracción producida por Fe fue menor en los anillos de aorta de ratas adultas que en ratas jóvenes, por lo que la edad de las ratas también podría influir en la respuesta contráctil de la Fe, situación que se atribuye a una inducción del estrés oxidativo en las CML debido a que la catalasa y GSSR, disminuyen con la edad, disminuyendo la capacidad antioxidante.

Por tanto, una disminución de las capacidades antioxidantes y/o el aumento de las ROS juegan un rol importante en el envejecimiento vasomotor.

Al analizar los datos de la tabla 4, que corresponden a biomarcadores en condiciones de preincubación con tRV/Locke (N=6), se observa que el efecto de máxima contracción (g) inducida por  $K^+$  70mM en los anillos de aorta de rata preincubados mostró

diferencias significativas cuando los anillos fueron incubados con 1, 10  $\mu\text{M}$  de tRV, respecto del control (Fig X). Sin embargo no hubo diferencia significativa cuando los anillos fueron incubados con 100  $\mu\text{M}$  de tRV, respecto del control. En la figura X se observa una mayor contracción inducida por  $\text{K}^+70\text{mM}$  a bajas concentraciones de tRV (1 y 10  $\mu\text{M}$ ), esto podría relacionarse con el efecto antioxidante que posee el tRV, preservando la respuesta de las células expuestas a los procesos de incubación (Resende y cols, 2004). Sin embargo, se observó una menor respuesta al incubar los anillos aórticos a una mayor concentración (100  $\mu\text{M}$ ). La razón de la discrepancia entre estas respuestas se puede deber al efecto pro-oxidante que posee el tRV al ser utilizado en altas concentraciones, lo que conllevaría a la fragmentación del DNA y posterior daño celular, lo que disminuiría la respuesta contráctil de las células (Lastra y Villegas, 2007). Se han observado diferentes efectos usando altas vs bajas concentraciones de tRV. Por ejemplo una baja concentración [ $<10\mu\text{M}$ ] tRV activa SIRT1, un homólogo SIR2 humano, pero esta activación no se considera a concentraciones más altas [ $>50 \mu\text{M}$ ]. Por otra parte, se ha encontrado que tRV en dosis bajas atenúa el EO intracelular inducido por el alcohol, pero tRV a altas dosis [ $>100\text{-}200 \mu\text{M}$ ] realiza el EO (Yang y cols, 2010).

Sin embargo, Emax-Fe, Emax-ACh y  $\text{pD}_2\text{-ACh}$  no muestran diferencias significativas respecto de sus respectivos controles. En este punto es necesario destacar que Emax-ACh de la CDR de anillos preincubados con tRV (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) estuvieron muy cerca de alcanzar una variación estadísticamente significativa, observándose en la figura XIII una mayor respuesta de la ACh en las menores concentraciones, a diferencia de la respuesta observada en los anillos preincubados con tRV 100  $\mu\text{M}$ . El efecto protector antioxidante del tRV (1 y 10  $\mu\text{M}$ ), puede estar implicada la vía de la L-arginina-NO-  $\text{GMP}_c$ . Según estudios realizados por Orallo y cols, 2002. El tRV inhibe la NAD(P)H oxidasa, la segunda enzima que participa en la síntesis de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . La NAD(P)H oxidasa es una enzima de membrana (aunque tiene unas subunidades citosólicas) que, a partir del oxígeno y del NADH (sustrato preferentemente en células fagocíticas) procedentes del metabolismo celular, cataliza la biosíntesis de  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . El tRV sería un potente inhibidor de esta enzima y, por consiguiente, es un buen antioxidante ya que disminuye la biosíntesis de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

Los resultados obtenidos de este trabajo indican que bajo condiciones de estrés oxidativo, habituales en diversos modelos experimentales biológicos (Jones, 2008), la contractibilidad de aorta de rata no fue mayormente afectada.

El biomarcador Emax-ACh (%) del tRV [100  $\mu$ M] (tabla 4) señala diferencia significativa respecto de su contraparte (tabla 5), observándose una mayor respuesta a la ACh en condiciones de EO, sin embargo este resultado no fue el esperado ya que debiese haber una menor respuesta a la ACh en estas condiciones.

A pesar de que el  $H_2O_2$  es ampliamente utilizado en los estudios vasculares de reactividad *in vitro* para inducir estrés oxidativo, la vía detallada y el mediador responsable de la contracción inducida por  $H_2O_2$  no se comprenden completamente. Las enzimas que podrían estar implicadas en este mecanismo son la fosfolipasa A2, fosfolipasa C y COX (Gao y Lee, 2001). El  $H_2O_2$  tiene un rol dual, tanto de servir como un oxidante y como una molécula esencial en la señalización celular que regula los procesos biológicos. Las propiedades específicas de  $H_2O_2$  se determinan principalmente por su reactividad, potencial redox y la relativa estabilidad en las células (en comparación con otros ROS) y su capacidad de atravesar las membranas. Estudios recientes han encontrado que algunas membranas son poco permeables al  $H_2O_2$ . Se ha propuesto que acuaporinas específicas facilitan el transporte de  $H_2O_2$  a través de las membranas, la composición de lípidos también puede influir en la difusión de  $H_2O_2$  a través de las membranas (Malinouski y Zhou, 2011).

Para evaluar el efecto oxidante del  $H_2O_2$ , se han utilizado como modelo de estudio tanto órganos como tejidos. Estudios de Moreno y cols, 2010, demostraron que el  $H_2O_2$  puede inducir vasoconstricción en la vasculatura del riñón de rata aislado. Utilizando concentraciones que fluctuaban desde 2,2 a  $22 \times 10^{-5}$  mol, evaluando el  $H_2O_2$  de manera directa. Otros resultados sugieren que el efecto vasoconstrictor del  $H_2O_2$  en la vasculatura renal de la rata compromete los siguientes componentes 1) flujo de Calcio extracelular, 2) activación de PKC, y 3) Estimulación de las vías que llevan a la sensibilización de elementos contráctiles al calcio (Moreno y cols, 2010).

En estudios realizados por Zheng y cols, 2010, se demostró el efecto protector del resveratrol en células epiteliales del cristalino humano (HCEB) sometidas a estrés oxidativo por el oxidante  $H_2O_2$ , 100  $\mu$ M por 24 horas de incubación (Zheng y cols, 2010).

En experimentos realizados por Kao y cols, 2010 se utilizó como modelo de estudio el cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), donde las

células fueron expuestas a 100  $\mu\text{M/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  por 12 horas para inducir estrés oxidativo (Kao y cols, 2010) para demostrar el efecto protector del tRV. En el caso de estudios realizados por Hafizah y cols, 2010, se utilizó como modelo de estudio HUVECs, las cuáles fueron tratadas con varias concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0-1000  $\mu\text{mol/L}$ ) por 24 horas (Hafizah y cols, 2010) para demostrar el efecto antioxidante de *Piper sarmentosum*.

Los resultados pueden llevar a plantear que las condiciones de estrés oxidativo no fueron lo suficientemente drásticas como para afectar los biomarcadores elegidos, lo cual llevaría a aumentar ya sea el tiempo de exposición o bien la concentración del agente oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Sin embargo, las evidencias muestran que estas mismas condiciones son capaces de alterar la expresión y actividad de enzimas involucradas en las defensas antioxidantes celulares (Hattori y cols, 2002; Wallerath y cols, 2002; Imamura y cols, 2003; Ungvari y cols, 2006; Jones, 2008; Kao y cols, 2010), indicando que no es posible hacer una proyección directa desde un nivel de complejidad biológico a otro, y deja en evidencia la necesidad de ampliar el espectro de biomarcadores, especialmente para sustancias que tienen un amplio espectro de acción como tRV y otros polifenoles.

Por último, debido a que algunos biomarcadores estuvieron muy cerca de alcanzar una variación estadísticamente significativa, se debe mejorar los protocolos y diseños experimentales, tanto en disminuir la variabilidad, asociada a la manipulación de los vasos, así como contemplar un mayor N experimental.

---

## **7. CONCLUSIÓN.**

A pesar de utilizar condiciones de estrés oxidativo que producen cambios significativos a nivel de expresión y actividad de enzimas importantes en la generación y regulación de señales celulares (algunas de ellas asociadas a estrés oxidativo), a un nivel más complejo (como lo es el nivel de órgano aislado) no se observó cambios importantes en los biomarcadores asociados a contractibilidad. A diferencia de ello, sí se produjo cambios significativos en estos biomarcadores cuando los vasos fueron incubados en medio de cultivo.

Los resultados de esta tesis confirman la complejidad de todo sistema biológico y los vemos como una señal que indica la necesidad de aproximarse a ella mediante protocolos experimentales más integrales.

---

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Andriambeloson E, Kleschyov A, Muller B, Beretz A, Stoclet J, Andriantsitohaina R. 1997. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *British Journal of Pharmacology*. 120: 1053 – 1058.

Almeida L, Silva MV, Falcao A, Soares E, Costa R, Loureiro A, Fernández C, Rocha J, Nunes T, Wright L, Silva P. 2009. Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol. Nutr. Food Res*. 53: S7 –S15.

Athar M, Back J, Tang X, Kim K, Kopelovich L, Bickers D y Kim A. 2007. Resveratrol: A Review of Pre-clinical Studies for Human Cancer Prevention. *Toxicol Appl Pharmacol*. 224: 274-283.

Baur J, Pearson K, Price N, Jamieson H, Lerin C, Kalra A, Prabhu V, Allard J, Luch G, Lewis K, Pistell P, Poosala S, Becker K, Boss O, Gwinn D, Wang D, Ramaswamy S, Fishbein K, Spencer R, Lakatta E, Le Couteur D, Shaw R, Navas P, Puigserver P, Ingram D, Cabo R, Sinclair D. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 444: 337-342.

Baur J y Sinclair D. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Review*. 5: 493-506.

Bhat K, Kosmeder J , Pezzuto J. 2001. *Antioxid Redox Signal*. 3: 1041-1064.

Brittes J, Lucio M, Nunes C, Lima J, Reis S. 2010. Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects. *Chem Phys Lipids*. 163(8):747-54.

Brown D. 2006. Acetylcholine. *BJP* .147: s120-s126.

- Bukarica L, Novakovic A, Kanjuh V, Bumbasirevic M, Lesic A, Heinle H. 2008. A Role of Ion Channels in the Endothelium-Independent Relaxation of Rat Mesenteric Artery Induced by Resveratrol. *J Pharmacol Sci* .108: 124 – 130.
- Bulue M, Yilmaz E. 2006. Resveratrol decreases calcium sensitivity of vascular smooth muscle and enhances cytosolic calcium increase in endothelium. *Vascular Pharmacology* 44: 231-237.
- Burstein B, Maguy A, Clément R, Gosselin H, Poulin F, Ethier N, Tardif JC, Hébert T, Calderone A, Nattel S.2007. Effects of Resveratrol (trans-3,5,4'-Trihydroxystilbene) Treatment on Cardiac Remodeling following Myocardial Infarction. *JPET*. 323(3): 916-923.
- Chao HH, Juan SH, Liu JC, Yang HY, Yang E, Cheng TH, Shyu KG.2005. Resveratrol inhibits angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression and subsequent proliferation in rat aortic smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*. 515: 1 – 9
- Chaves A, Joshi M, Coyle C, Brady J, Dech S, Schanbacher B, Baliga R, Basuray A, Bauer A.2009. Vasoprotective endothelial effects of a standardized grape product in humans. *Elsevier Vascular Pharmacology*. 50: 20-26.
- Chong J, Poutaraud A, Huguency P. 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*. 177 :143–155.
- Cottart CH, Antoine VN, Morizot CL, Beaudoux JL. 2010. *Mol. Nutr. Food Res*. 54: 7–16.
- Dalle-Done I, Ranieri R, Colombo R, Giustarini D Milzani A.2006.Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 52(4): 601–623.
- Das K y Maulik N. 2006. Resveratrol in Cardioprotection: A Therapeutic Promise of Alternative Medicine. *Molecular Intervention*. 6: 36-47.

- Duarte J, Andriambeloson E, Diebolt M y Andriantsitohaina R. 2004. Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilatation. *Physiol. Res.* 53: 595-602.
- Erdman J, Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer J, Folts J, Hamly J, Hollman P, Keen C, Mazza G, Messina M, Scalbert A, Vita J, Williamson G y Burrowes J. 2007. Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop. *J. Nutr.* 137: 718-737.
- Fagalde M, Solar J, Guerrero M, Atalah E. 2005. Factores de riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles en funcionarios de una empresa de servicios financieros de la Región Metropolitana. *Rev Méd Chile.* 133: 919-928.
- Gao YJ y Lee RMKW. 2001. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A2 production. *Br J Pharmacol.* 134(8): 1639–1646.
- Gehm B, McAndrews J, Chien PY, Jameson L. 1997. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 14138–14143.
- Gresele P, Pignatelli P, Guglielmini P, Carnevale R, Mezzasoma A, Ghiselli A, Momi S, Violi S. 2008. Resveratrol, at Concentrations Attainable with Moderate Wine Consumption, Stimulates Human Platelet Nitric Oxide Production. *The Journal of Nutrition.* 138: 1602-1608.
- Grover F, Zavalza A. 2009. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. Elsevier. 84: 1-10.
- Hafizah AH, Zaiton Z, Zulkhairi A, Mohd Ilham A, Nor Anita MN, Zaleha AM. 2010. Piper sarmentosum as an antioxidant on oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells induced by hydrogen peroxide. *Biomed & Biotechnol.* 11(5):357-365.

- Halliwell B y Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 142: 231–255.
- Halls C, Yu O. 2008. Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis. *Trends in Biotechnology*. 26 (2): 77-81.
- Harb A, Zarga M, Abdalla S. 2009. Effects of Trans-Resveratrol, Isolated from *Smilax Aspera*, on Smooth Muscle, Blood Pressure, and Inflammation in Rats and Nociception in Mice. *JJBS*.2(2): 69-76.
- Hartshorne D, Ito M, Erdödi F. 2004. Role of Protein Phosphatase Type 1 in Contractile Functions: Myosin Phosphatase. *J. Biol. Chem*. 279: 37211-37214.
- Hattori R, Otani H, Maulik N, Das D. 2002. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 282: H1988–H1995.
- Icaza G, Núñez L, Marrugat J, Mujica V, Escobar M, Jiménez A, Pérez P, Palomo I. 2009. Estimación de riesgo de enfermedad coronaria mediante la función de Framingham adaptada para la población chilena. *Rev. Méd. Chile*. 137: 1273-1282.
- Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, Otani H, Maulik N, Das DK. 2003. Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 282: H1996–H2003.
- Instituto Nacional de Estadísticas Chile. 2006. Principales causas de muerte en Chile por regiones 1997-2003.
- Jones D. 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 295: C849-C868.
- Kao CL, Chen LK, Chang YL, Yung MC, Hsu CC, Chen YC, Lo WL, Chen SJ, Ku HH, Hwang SH. 2010. Resveratrol Protects human Endothelium from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative

- Stress and Senescence via SirT1 Activation. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 17:1-10.
- Klinge CM, Wickramasinghe NS, Ivanova MM, Dougherty SM. 2008. Resveratrol stimulates nitric oxide production by increasing estrogen receptor  $\alpha$ -Src-caveolin-1 interaction and phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB*. 22: 2185-2197.
- Lastra A C, Villegas I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*. 35: 1155-1160.
- Malinouski M, Zhou Y, Belousov V, Hatfield D, Gladyshev V. 2011. Hydrogen Peroxide Probes Directed to Different Cellular Compartments. *PLoS ONE* 6(1): e14564.1-10.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy y Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 79:727-47.
- Mas M. 2009. A Close Look at the Endothelium: Its Role in the Regulation of Vasomotor Tone. *European Urology Supplements*. 8: 48-57.
- Masnatta L, Fischer P, Dominguez G, Fischer E, Ramirez A, Sanchez R. 2003. Marcadores de estrés oxidativo. Su valor en la prevención y detección precoz de la enfermedad cardiovascular en el Hospital de Día. *Rev Fed Arg Cardiol*. 32: 177-183.
- Millan F, Serrano G y Expósito I. 2008. Resveratrol: Nuevos retos en el tratamiento antienvjecimiento. *Salud Estética*. 66-70.
- Moncada S, Higgs EA. 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*. 147: S193-S201.
- Moreno JM. Papel de los mediadores endoteliales y del estrés oxidativo en las alteraciones cardiovasculares de la disfunción tiroidea. Tesis para optar al grado de Doctor. Universidad de Granada, España, 2005.

- Moreno JM, Rodriguez GI, Wangensteen R, Perez-Abud R, Duarte J, Osuna A, Vargas F. 2010. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced vasoconstriction in the isolated perfused rat kidney. *Journal of physiology and pharmacology*. 61, 3, 325-332.
- Naderali EK, Doyle PJ, Williams G. 2000. Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs. *Clinical Science*. 98: 537-543
- Nicholson S, Tucker G y Brameld J. 2008. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proceedings of the Nutrition Society* 67: 42-47.
- Orallo F, Álvarez E, Camiña M, Leiro J, Gómez E, Fernández P. 2002. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Molecular Pharmacology*. 61: 294-302.
- Organización Mundial de la Salud. 2009. Estadísticas sanitarias mundiales.
- Pállas M, Casadesús G, Smith M, Montes A, Pelegri C, Vilaplana J y Camins A. 2009. Resveratrol and neurodegenerative diseases: Activation of SIRT1 as the potential pathway towards neuroprotection. *Current Neurovascular Research*. 6: 70-81.
- Pasten C, Grenett H. 2006. Wine, fibrinolysis and health. *Rev Méd Chile*. 134: 1040-1048.
- Pervaiz S. 2003. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J*. 17: 1975-1985.
- Pirola L y Fröjdö S. 2008. Critical review, resveratrol: One molecule, many targets. *IUBMB Life*. 60: 323-332.
- Rakici O, Kiziltepe U, Coskun B, Aslamaci S, Akar F. 2005. Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery. *International Journal of Cardiology*. 105: 209-215

- Ratner R, Sabal J, Hernández P, Romero D, Atalah E. 2008. Estilos de vida y estado nutricional de trabajadores en empresas públicas y privadas de dos regiones de Chile. *Rev Méd Chile*. 136: 1406-1414.
- Resende AC, Tabellion A, Nadaud S, Lartaud I, Bagre D, Faure S, Atkinson J, Atkinson CC. 2004. Incubation of rat aortic produces a specific reduction in agonist-evoked contraction: effect of age of donor. *Life Sciences*. 76: 9-29.
- Romero M, Figueroa H, Morales M, Rojas A. 2009. Presence of oxidative stress in the vascular wall and its potential therapeutical management. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 28: 112-129.
- Sadruddin S, Arora R. 2009. Resveratrol: Biologic and therapeutic Implications. *J Cardiometab Syndr* . 4:102-106.
- Shankar S, Singh G, Srivastava R. 2007. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Frontiers in Bioscience* .12: 4839-4854.
- Shinohara Y, Toyohira Y, Ueno Susumu, Liu M, Tsutsui M, Yanagihara N. 2007. Effects of resveratrol, a grape polyphenol, on catecholamine secretion and synthesis in cultured bovine adrenal medullary cells. *Biochemical pharmacology*. 74: 1608 – 1618.
- Schmitt C, Dirsch V. 2009. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide*. 21: 77-91.
- Sedó P. 2001. Alimentos funcionales: análisis general acerca de las características químico - nutricionales, desarrollo industrial y legislación alimentaria. *Rev. costarric. Salud Pública*.10:18-19.
- Sigma Aldrich. 1997. Product Information Resveratrol, No. R5010.
- Stocker R y Keaney J. 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 84: 1381-1478.

Stoclet JC, Chataingneau T, Ndiaye M, Oak MH, Bedoui JE, Chataingneau M y Schini V.2004. European Journal of Pharmacology. 5: 299– 313.

Subramanian L, Youssef S, Bhattacharya S, Kenealey J, Polans A, van Ginkel P. 2010.Resveratrol: Challenges in Translation to the Clinic - A Critical Discussion. Clin. Cancer Res. 16: 5942-5948.

Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinsky N, Xiangmin Z, Olson S, Podlutzky A, Csiszar A. 2006. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. Am J Physiol Heart Circ Physiol .292: H2417–H2424.

Vallance P, Chan N. 2001. General Cardiology: Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. Heart .85: 342-350.

Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L y Taddei S. 2009.Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. British Journal of Pharmacology .157, 527–536.

Vinet R, Brieva C, Pinardi G, Penna M. 1991. Modulation of alpha-adrenergic-induced contractions by endothelium-derived relaxing factor in rat aorta. Gen Pharmacol. 22: 137-142.

Wallerath T, Deckert G, Temes T, Anderson H, Li H, White K, Forstermann U. 2002. Resveratrol, a Polyphenolic Phytoalexin Present in Red Wine, Enhances Expression and Activity of Endothelial Nitric Oxide Synthase. Circulation. 106: 1652-1658.

World Precision Instruments, Inc. Copyright © 2008. Instruction Manual Myobath II. 1-21.

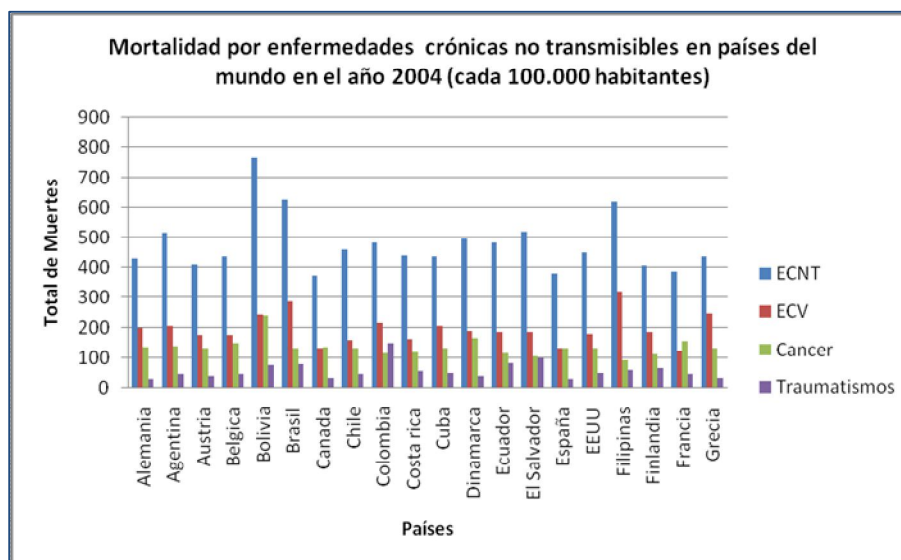
Xia EQ, Deng GF, Guo YJ y Li HB.2010.Biological activities of polyphenols from grapes. Int. J. Mol. Sci.11: 622-646.

Yang NCH, Lee CHH, Song TY. 2010. Evaluation of Resveratrol Oxidation *in Vitro* and Crucial Role of Bicarbonate ions. Biosci. Biotechnol.Biochem. 74(1), 63-68.

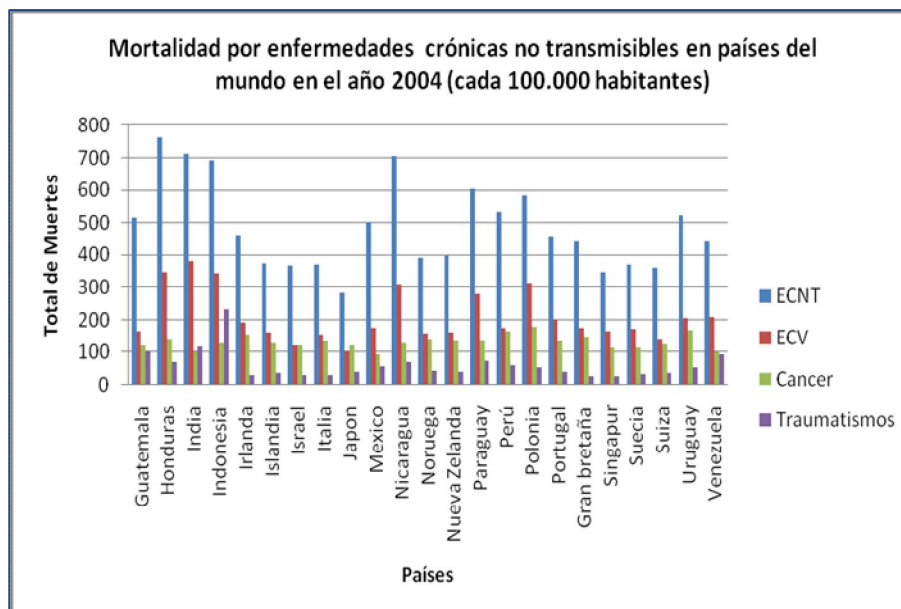
Zheng Yi, Liu Y, Ge J, Wang X, Liu L, Bu Z, Liu P. 2010. Resveratrol protects human lens epithelial cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression. *Molecular Vision*. 16:1467-1474.

## 9. ANEXOS.

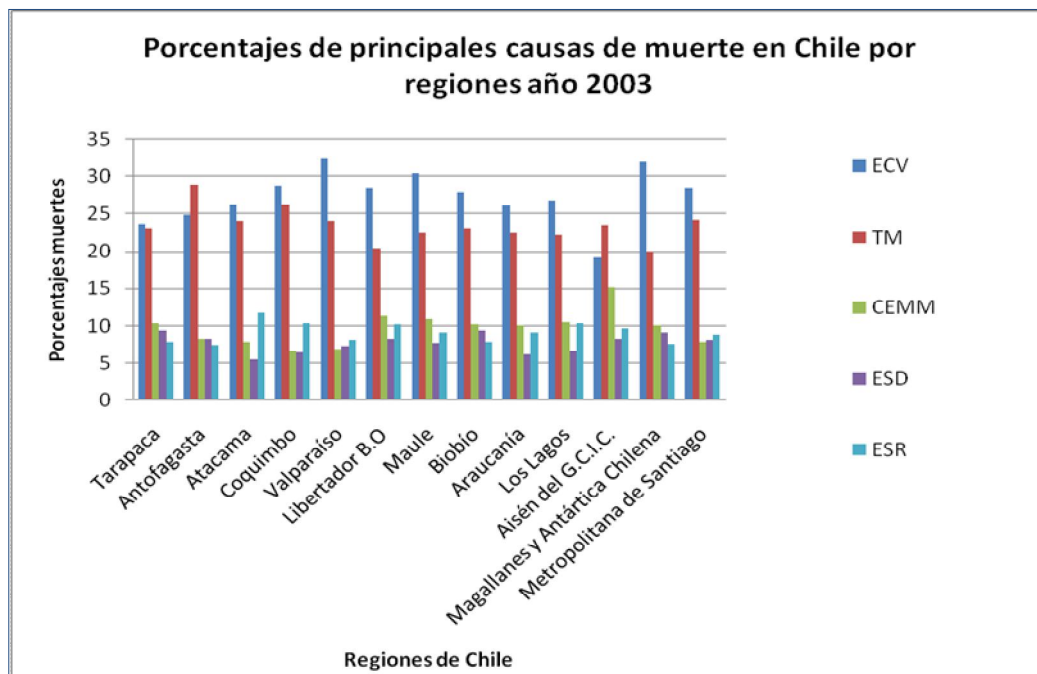
## ANEXO I.



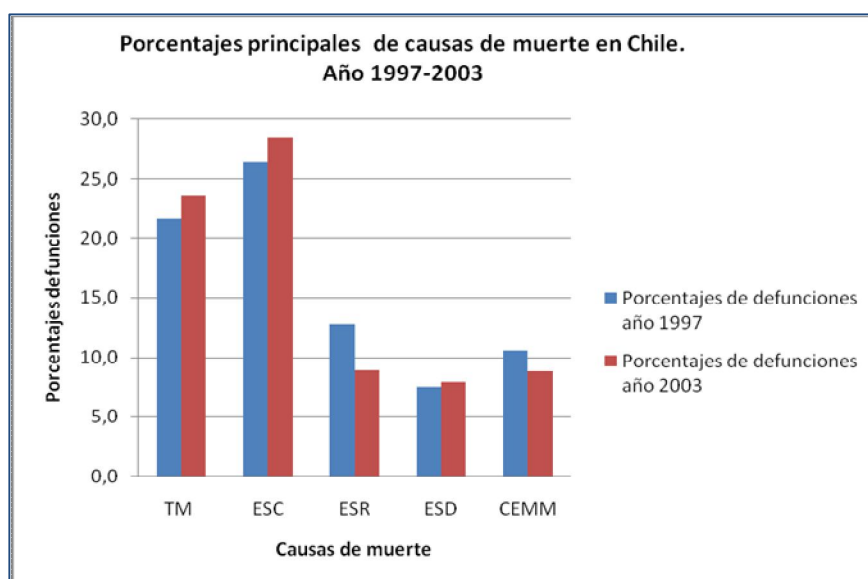
## ANEXO II.



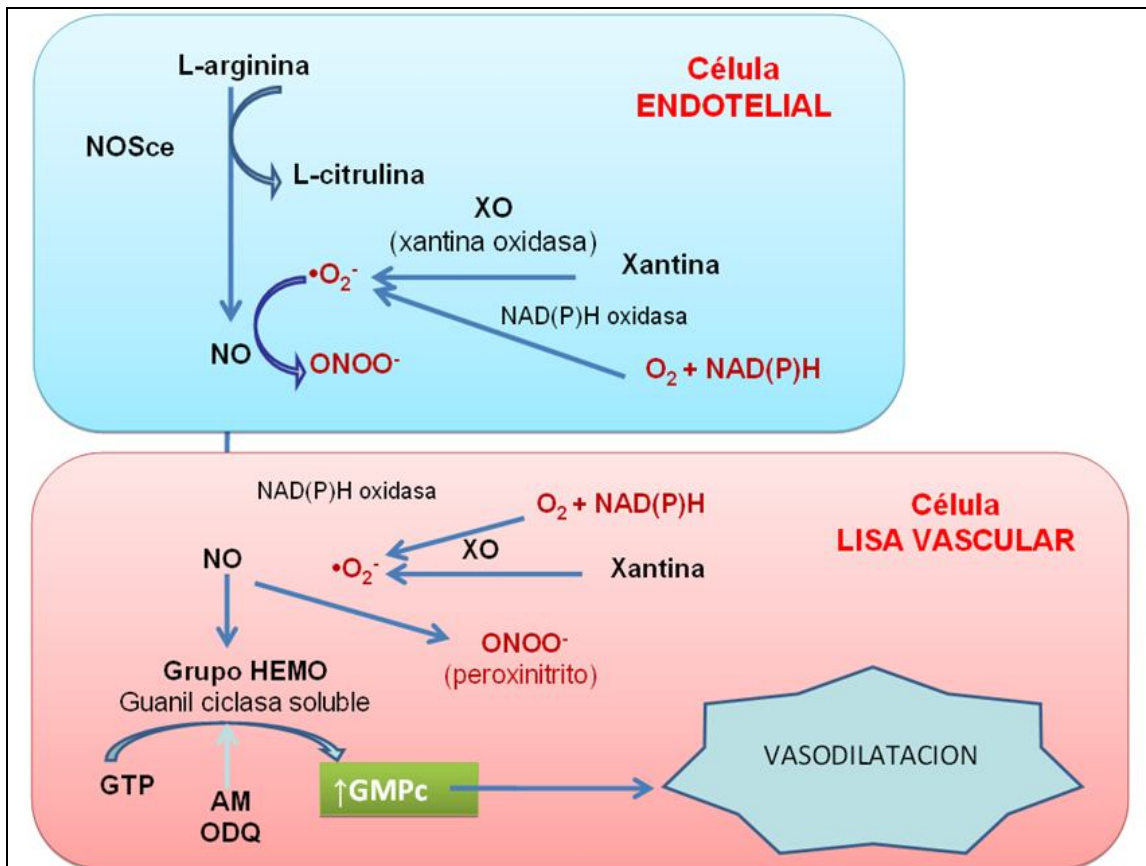
## ANEXO III.



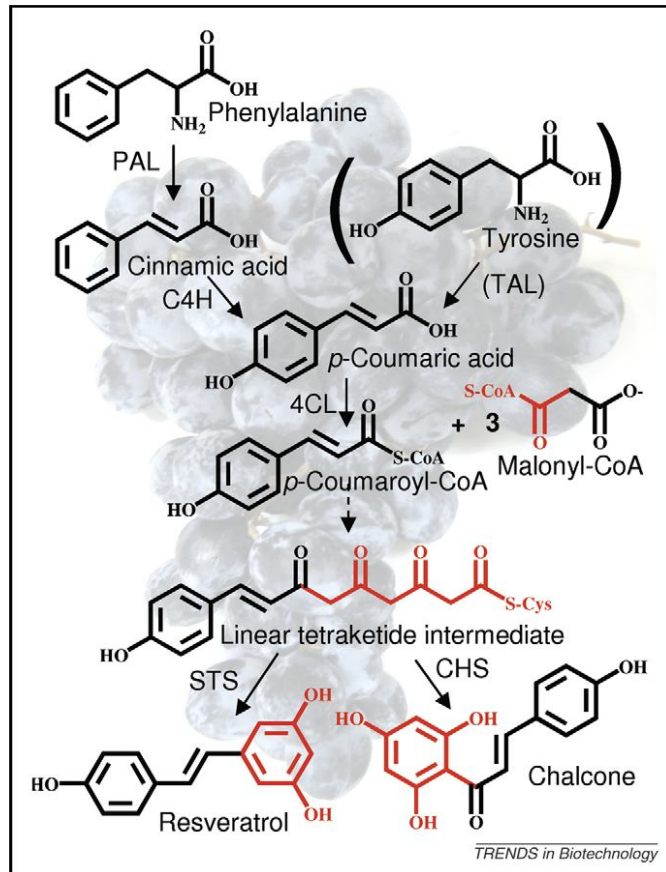
## ANEXO IV.



**ANEXO V.** Síntesis de Oxido nítrico, modificado de Vallance y cols, 2001.



**ANEXO VI.** Vía de síntesis del tRV (Hans y Hu, 2008).



Esquema de la vía del fenilpropanoide. Las enzimas involucradas en la síntesis del tRV son fenilalanina amonioliasa (PAL), cianamato-4-hidroxilasa (C4H) que pueden ser sustituidos por una enzima tirosina aminoliasa (TAL). Sigue en la ruta el 4-cumarato CoA ligasa (4CL) y estilben sintetaza (STS). STS y chalcona sintetasa (CHS) comparten los mismos sustratos e intermediarios pero uno produce tRV desde C2---C7 mediante condensación alcohólica y la otra produce chalcona desde c6---c1 mediante la condensación de Claisen, respetivamente. Se representa en rojo la estructura de Malonyl-CoA.

ANEXO VII. Tabla modificada de Pirola y cols, 2008.

<b>Principales Moléculas Moduladas por Resveratrol</b>			
<b>Metabolito target</b>	<b>Mecanismo de Acción Propuesto</b>	<b>Efecto biológico asociado</b>	<b>Modelo</b>
<b>Ciclo y Lipo Oxigenasas</b>	Unión del Resv con el sitio activo de la peroxidasa (Inhibición irreversible)	Disminución de la inflamación y generación de tumores	Animal (Ratón)
<b>PKC y p56<sup>lck</sup></b>	Inhibición competitiva del PKC	Inhibición del crecimiento e inducción de apoptosis en líneas celulares cancerígenas	Celular (Gástrico y prostático)
<b>Erk1 y 2</b>	Inhibición de la endotelina- 1	Inducción enzimática, Protección Cardiovascular.	Órgano (Arteria coronaria de cerdo)
<b>JNK-1 y p38</b>	Inhibición de la endotelina- 2	Inducción enzimática, Protección Cardiovascular.	Órgano (Arteria coronaria de cerdo)
<b>IKK<math>\beta</math></b>	Supresión de IKK mediante la fosforilación de I $\kappa$ B.	Inhibición de la sobreexpresión de COX-2	Animal (Ratón piel)
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	inhibiendo NF- $\kappa$ B, evitando la formación de TPA (phorfol ester de acetato).	Inhibición de la sobreexpresión de COX-2	Animal (Ratón piel)
<b>Src y STAT-3</b>	Disminución de la fosforilación de las Tirosinas kinasas Src por unión STAT-3	Actividad Antitumoral ( apoptosis celular)	Celular (fibroblastos de ratón)
<b>Ribonucleótido Reductada</b>	Destrucción de un raticil tirosil de actividad catalítica de la Ribonucleótido sintetasa.	Inhibición de la síntesis de DNA	Celular (células con leucemia)
<b>DNA Polimerasa <math>\alpha</math> y <math>\delta</math></b>	Inhibición competitiva de DNA polimerasa	no ha sido investigado.....	Celular
<b>PKD</b>	Inhibición de la autofosforilación de PKD	Acción quimiopreventiva sobre cancer.	Celular
<b>Quinona reductasa 2</b>	Inhibición competitiva de QR2	Inducción de la muerte celular mediada por menadiona.	Celular (células K562)
<b>Aromatasa</b>	Inhibición competitiva de Aromatasa	Quimiopreventivo en cancer mamario y otros.	Celular (Células MCF-7 y SKBR-3)
<b>Sir-2/ SIRT1</b>		Prolongación de la Calidad de Vida	Animal (Drosophilas y ratones)
<b>Adenilciclase</b>	Activador de Adenilciclase, aumentando la concentración de AMPc	Efecto citostático y proapoptótico en células cancerosas	Celular ( células CMF-7)
<b>AMPK</b>	Activación de AMPK	Protección celular contra la glucoxidación, mejora del metabolismo.	Celular (HepG2 hepatocitos)
<b>GHS</b>	Aumento de los niveles enzimáticos de GHSreductasa, GSH	Antioxidante celular.	Celular (linfocitos)
<b>NADH/NADPH oxidasa</b>	Inhibición vascular de NADH/NADPH oxidasa	Disminución basal de la generación de radicales libres.	Animal (Ratas, aorta)
<b>eNOS</b>	Aumento de la expresión de RNAm, aumentando los niveles de eNOS y la generación de ON	Vasorelajación dependiente de endotelio	Celular (células de cordón umbilical humano)

**ANEXO VIII.** Equipo Myobath II, WPI, 2008.

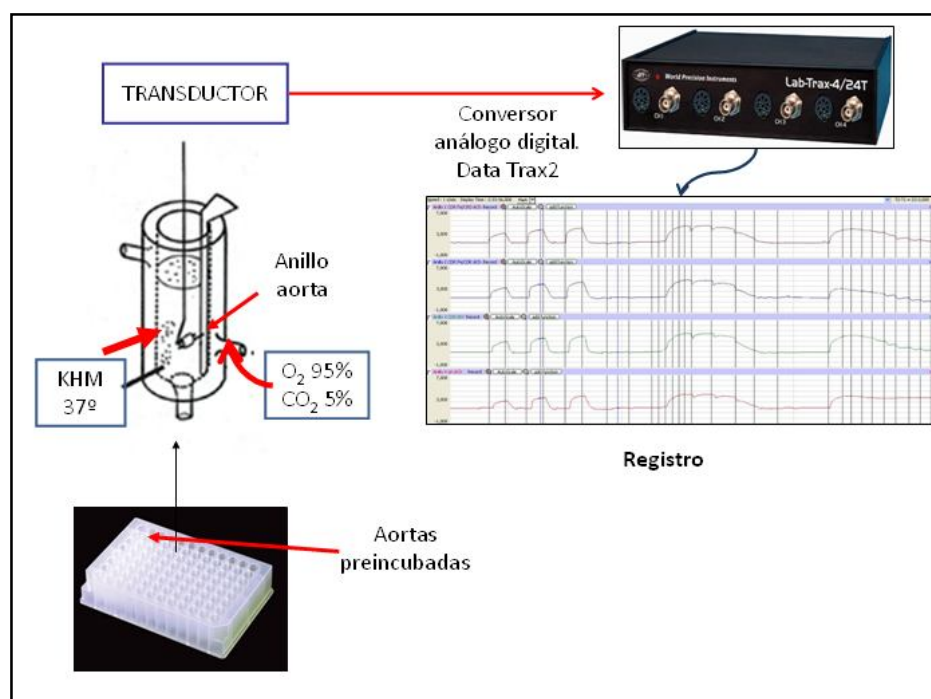


**ANEXO IX.** Tabla del diseño experimental del estudio farmacológico.

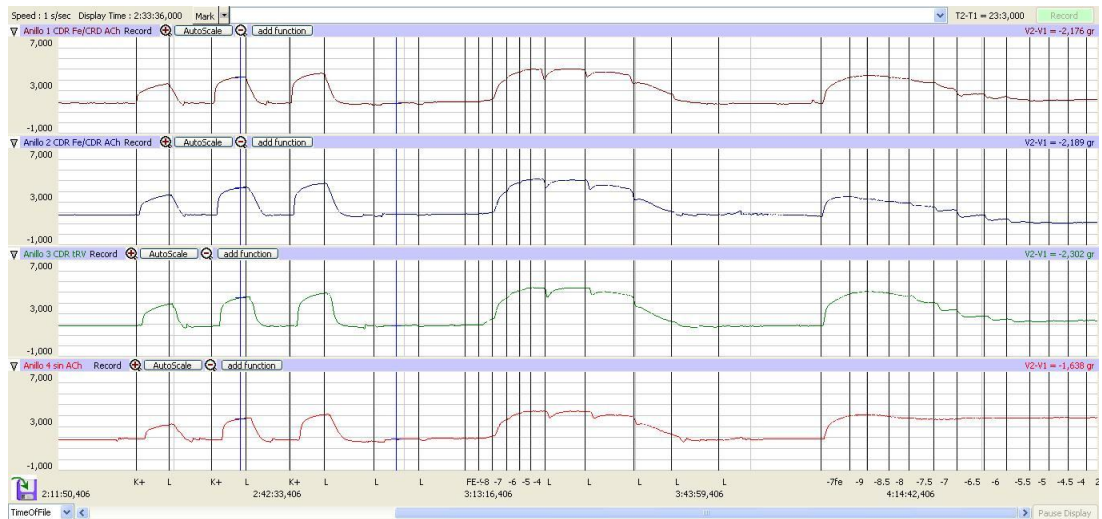
	INCUBACIÓN		REACTIVIDAD VASCULAR	
	Incubación T = 33°C Tiempo= 10 h	Incubación T=33°C Tiempo =3h	Contracción	Relajación
<b>C 1</b>	Locke	Locke	3K+70mM/Fe <sup>-6</sup> M	ACh[10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-4</sup> M]
<b>E 1</b>	Locke + t-RESV [100 µM]	Locke	3K+70mM/Fe <sup>-6</sup> M	ACh[10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-4</sup> M]
	Locke + t-RESV [10 µM]	Locke	3K+70mM/Fe <sup>-6</sup> M	ACh[10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-4</sup> M]
	Locke + t-RESV [1 µM]	Locke	3K+70mM/Fe <sup>-6</sup> M	ACh[10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-4</sup> M]
<b>C2</b>	Locke	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [100 µM]	3K+70mM/Fe <sup>-6</sup> M	ACh[10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-4</sup> M]
<b>E2</b>	Locke + t-RESV [100 µM]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [100 µM]	3K+70mM/Fe <sup>-6</sup> M	ACh[10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-4</sup> M]
	Locke + t-RESV [10 µM]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [100 µM]	3K+70mM/Fe <sup>-6</sup> M	ACh[10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-4</sup> M]
	Locke + t-RESV [1 µM]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [100 µM]	3K+70mM/Fe <sup>-6</sup> M	ACh[10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-4</sup> M]

*C=control; E= experimento; ACh= Acetilcolina; Fe =Fenilefrina; tRV=trans-resveratrol*

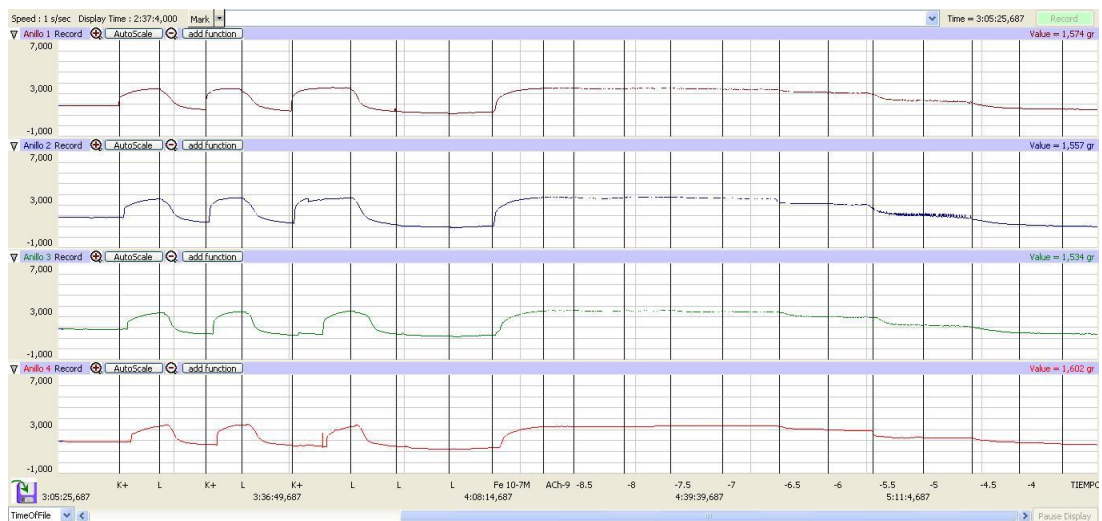
**ANEXO X.** Esquema de metodología del estudio farmacológico.



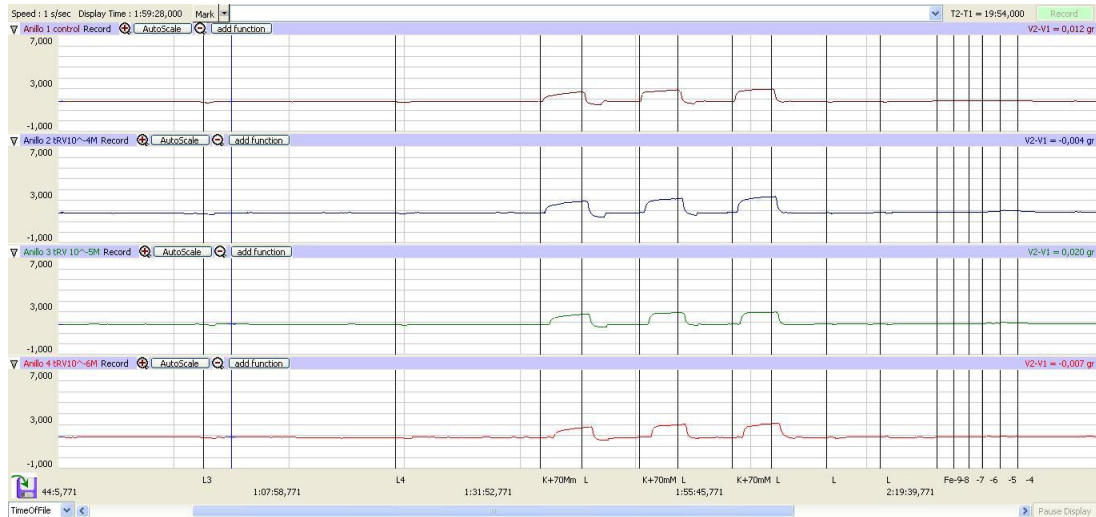
**ANEXO XI.** CDR de Fenilefrina en anillos de aorta de rata precontraídas con KCl 70Mm y CDR de Acetilcolina en anillos de aorta de rata pre contraídos con  $Fe10^{-7}M$ .



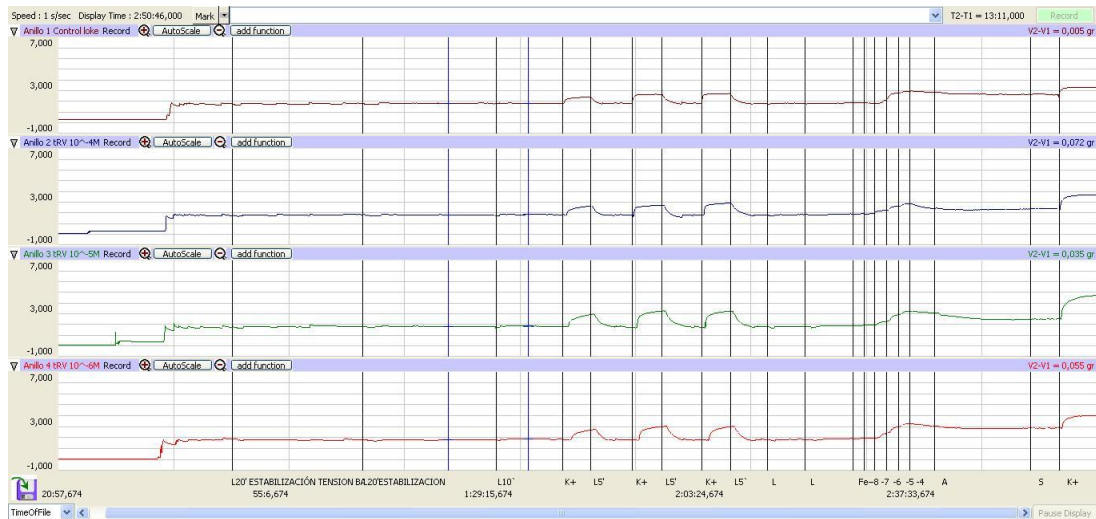
**ANEXO XII.** CDR de ACh en anillos de aorta de rata previamente contraídos con solución KCl 70 mM y luego con  $Fe 10^{-7} M$ .



**ANEXO XIII.** CDR de Fenilefrina en anillos de aorta de rata previamente incubados con medio de cultivo PBS 5% y diferentes concentraciones de tRV ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  M), ( $37^{\circ}\text{C}$ , 12 H incubación, 4 H lavado).



**ANEXO XIV.** Curva dosis respuesta de Fenilefrina en anillos de aorta de rata previamente incubados con Solución Krebs y diferentes concentraciones de tRV ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  M). (10h-3h a  $33^{\circ}\text{C}$ )



**ANEXO XV.** Curva dosis respuesta de Fenilefrina en anillos de aorta de rata previamente incubados con Solución Krebs y diferentes concentraciones de tRV ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  M).

