

---

# Actividad vasodilatadora del *trans*-resveratrol en la aorta torácica aislada de rata: una clara evidencia de sus efectos cardioprotectores

---

F. Orallo

Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela.

---

**Resumen:** Con el objeto de intentar dilucidar si el *trans*-resveratrol o (E)-resveratrol (3,4',5-trihidroxi-*trans*-estilbeno; t-RESV) puede estar implicado en los efectos protectores del consumo prolongado y diario de cantidades moderadas de vino frente a la incidencia de diversas enfermedades cardiovasculares, hemos estudiado por primera vez el mecanismo de la potencial actividad vasodilatadora de este compuesto polifenólico en la aorta de rata. El t-RESV (1-10  $\mu\text{M}$ ) no tuvo efecto sobre las contracciones inducidas por la (-)-noradrenalina (NA, 1  $\mu\text{M}$ ) y por altas concentraciones de KCl extracelular (60 mM) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Sin embargo, de una forma dependiente de la concentración, relajó la respuesta contráctil producida por ambos agentes vasoconstrictores en anillos intactos de aorta de rata. Los efectos vasodilatadores del t-RESV fueron completamente inhibidos por la N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, 0,1 mM) y por el azul de metileno (AM, 10  $\mu\text{M}$ ), pero no se vieron afectados por la atropina (10  $\mu\text{M}$ ) ni por la yohimbina (1  $\mu\text{M}$ ). El efecto inhibitorio producido por la L-NOARG fue antagonizado por la L-arginina (0,1 mM), pero no por la D-arginina. El t-RESV (1-10  $\mu\text{M}$ ) no modificó la actividad enzimática de la sintetasa constitutiva del óxido nítrico (NOS<sub>c</sub>) en homogeneizados de aorta de rata. Además, tampoco mostró propiedades scavenger (barredoras, secuestradoras, atrapadoras o quelantes) de radicales superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ni inhibitorias de la xantina oxidasa (XO). Sin embargo, el t-RESV (1-10  $\mu\text{M}$ ) disminuyó notablemente la actividad enzimática de la oxidasa del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH)/fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADPH) en homogeneizados de aorta de rata [NADH/NADPH o NAD(P)H oxidasa vascular]. Todos los resultados anteriores sugieren que: 1) el efecto vasorrelajante característico dependiente del endotelio del t-RESV en la aorta de la rata parece deberse a un incremento de la actividad de la vía de la L-arginina-óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ )-monofosfato cíclico de 3'-5'-guanosina (GMP cíclico,  $\text{GMP}_c$ ), posiblemente mediante la inhibición de la actividad de la NADH/NADPH oxidasa vascular, con la subsiguiente disminución de la biosíntesis celular basal de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y, por consiguiente, de la inactivación del  $\text{NO}^*$  por dichos radicales; 2) este compuesto polifenólico natural podría desempeñar un papel importante en los efectos cardioprotectores producidos a largo plazo por el consumo diario de cantidades moderadas de vino.

**Palabras clave:** *Trans*-resveratrol – Aorta de rata – Vasodilatación – Sintetasa constitutiva del óxido nítrico – Sistema hipoxantina-xantina oxidasa – NAD(P)H oxidasa.

---

## Introducción

Recientemente, los estudios sobre el consumo de vino han recibido una considerable atención, tanto por parte de la comunidad científica como del público en general. La baja incidencia de cardiopatía isquémica y otras enfermedades cardiovasculares en la población del sur de Francia, a pesar de tener una dieta rica en grasas saturadas y unos factores de riesgo similares a los de otros países industrializados (escaso ejercicio, elevado consumo de tabaco, etc.), se ha atribuido al mayor consumo continuado y moderado de vino (especialmente tinto), fenómeno que se denomina "la paradoja francesa".<sup>1,2</sup> Como los efectos beneficiosos y protectores del vino son independientes de su contenido en alcohol, en estos últimos años se han realizado intensas investigaciones para identificar los principios activos responsables. Aunque tales principios todavía no se conocen, posiblemente por la compleja mezcla de sustancias presentes en el vino con efectos opuestos sobre el sistema cardiovascular, existen varias moléculas candidatas, entre las que se encuentra el *trans*-resveratrol o (*E*)-resveratrol (3,4',5-trihidroxitransestilbeno; *t*-RESV) y otros compuestos de naturaleza polifenólica.<sup>3-7</sup>

Hemos estudiado por primera vez la posible actividad vasodilatadora del *t*-RESV en la aorta de rata mediante estudios funcionales, y los mecanismos por los que dicha actividad se produce, con el objeto de intentar dilucidar si este polifenol de origen natural puede estar implicado en los efectos protectores del consumo moderado y prolongado de vino frente a la incidencia de diversas patologías cardiovasculares, e intentar explicar el fenómeno de la paradoja francesa.

## Efectos vasodilatadores del *t*-RESV en la aorta torácica aislada de rata

### Experimentos iniciales

La primera serie de experimentos fueron diseñados para estudiar los efectos del *t*-

RESV sobre las contracciones inducidas por la (-)-noradrenalina (NA) y el KCl, dos agentes vasoconstrictores que actúan por mecanismos diferentes.

El *t*-RESV (1-10  $\mu$ M) no tuvo efecto sobre las contracciones inducidas por la NA (1  $\mu$ M) y por altas concentraciones de KCl extracelular (60 mM) en anillos de aorta de rata desprovistos de endotelio. Sin embargo, de una forma dependiente de la concentración, relajó la respuesta contráctil producida por ambos agentes vasoconstrictores en anillos intactos de aorta de rata. Los correspondientes valores (media  $\pm$  error estándar de cinco experimentos) de las concentraciones inhibitorias 50 (Cl<sub>50</sub>) presentaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) (Fig. 1). Los efectos vasorrelajantes tan característicos, dependientes del endotelio, del *t*-RESV sobre las contracciones inducidas por elevadas concentraciones de KCl extracelular fueron significativamente menores que los obtenidos frente a las contracciones inducidas por NA, ya que los porcentajes máximos de relajación (R<sub>máx</sub>) fueron menores y la Cl<sub>50</sub> mayor (Fig. 1).<sup>8,9</sup>

Debido a que el óxido nítrico (NO\*) tiene efectos vasodilatadores similares a los del *t*-RESV,<sup>10</sup> con estos experimentos iniciales y preliminares empezamos a sospechar que el *t*-RESV podría actuar potenciando de alguna forma los efectos del NO\*; esto es, podría producir un incremento de la actividad de la vía de la L-arginina-NO\*-monofosfato cíclico de 3',5'-guanosina (GMP<sub>c</sub>).

### La ruta de la L-arginina-NO\*-GMP<sub>c</sub>

En tejidos vasculares, la ruta de la L-arginina-NO\*-GMP<sub>c</sub> se inicia en las células endoteliales, las cuales, en condiciones fisiológicas, sintetizan bajas concentraciones de NO\* (en el rango pico-nanomolar) a partir de un aminoácido, la L-arginina, por acción de una enzima que es una de las isoformas de la sintetasa del NO\* (NOS), denominada sintetasa constitutiva endotelial del NO\* dependiente de Ca<sup>2+</sup>-calmodulina (NOSE, NOS III, NOS-3 o NOSce), normalmente de localización citoplasmática.<sup>11</sup>

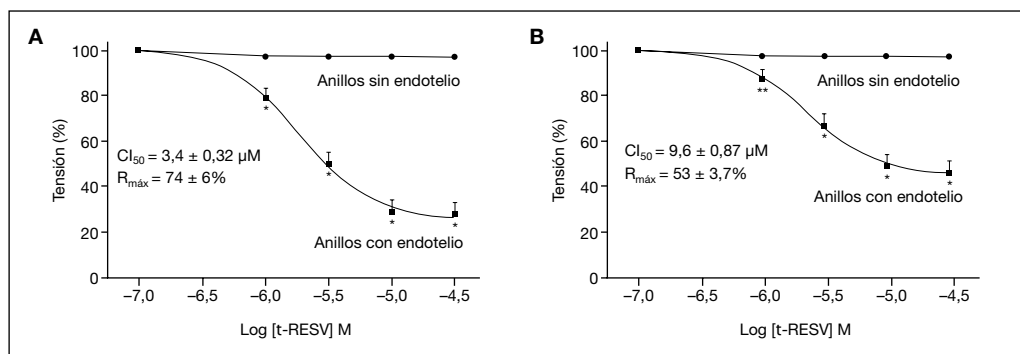


Figura 1. Curvas concentración-respuesta de la vasorrelajación inducida por el *t*-RESV (1-30  $\mu$ M) en anillos intactos de aorta de rata precontraídos con NA (1  $\mu$ M; panel A) o con altas concentraciones de KCl extracelular (60 mM; panel B). Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar (indicado por barras verticales) de cinco experimentos. Grado de significación estadística:  $^{**}p < 0.05$  o  $^{*}p < 0.01$  con respecto a la tensión máxima (100%).  $R_{m\acute{a}x}$  = porcentaja máxima de relajación.

Una vez producido y liberado por el endotelio, el NO $^*$  difunde a las células musculares lisas de la túnica media del vaso, en las cuales va a estimular una enzima presente en el citoplasma de esas células, la guanilil ciclasa soluble, que transforma el GTP, procedente del metabolismo celular, en un segundo mensajero, el GMP $_c$ , que por una serie de mecanismos no demasiado bien conocidos va a actuar sobre las células lisas vasculares haciendo que se relajen, es decir, produciendo vasodilatación.<sup>11,12</sup>

El NO $^*$  producido en el endotelio puede combinarse, en condiciones fisiológicas, con una serie de radicales libres que son los radicales superóxido (O $_2^{\bullet-}$ ). Los O $_2^{\bullet-}$  se producen tanto en la célula endotelial como en la célula lisa vascular, sobre todo por la acción de dos enzimas: la xantina oxidasa (XO), que utiliza como sustrato preferente la xantina, y la oxidasa del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH)/fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADPH) [NADH/NADPH o NAD(P)H oxidasa], que utiliza, sobre todo, como sustrato preferente en la célula lisa vascular el NADH (ver más adelante). El NO $^*$ , al combinarse con esos O $_2^{\bullet-}$ , se transforma en peroxinitrito (ONOO $^-$ ), que ya no tiene los efectos cardiovasculares beneficiosos del NO $^*$  (Fig. 2).<sup>11</sup>

La vía de la L-arginina-NO $^*$ -GMP $_c$  puede ser modulada por diversas herramientas farmacológicas que actúan a diferentes niveles, como la N $^G$ -nitro-L-arginina (L-NOARG), un inhibidor de todas las isoformas de la NOS y, por consiguiente, de la biosíntesis del NO $^*$ , o por el azul de metileno (AM) y el ODQ (dos conocidos inhibidores de la guanilil ciclasa soluble).<sup>12</sup> Precisamente son estos fármacos (herramientas farmacológicas) los que bloquean los efectos vasodilatadores del *t*-RESV. En efecto, la adición acumulativa de *t*-RESV (1-10  $\mu$ M) no relajó las contracciones inducidas por L-NOARG + NA, L-NOARG + KCl, AM + NA, AM + KCl, ODQ + NA y ODQ + KCl (n = 5, p > 0.05) en anillos intactos de aorta de rata.<sup>9</sup>

Por otro lado, el inhibidor de la síntesis de NO $^*$ , la L-NOARG (0,1 mM), invirtió la relajación inducida por el *t*-RESV, es decir, hizo que el tejido vascular se contrajera hasta un tono próximo al que presentaba antes de la adición del *t*-RESV. Además, el incremento en el tono inducido por la L-NOARG fue revertido, a su vez, por la L-arginina (0,1 mM), el sustrato fisiológico de la NOS, pero no por la D-arginina (0,1 mM), lo que indica la naturaleza competitiva y enantioselectiva de la interacción (Fig. 3).

Con todos estos resultados, cada vez era más evidente que los efectos vasorrelajantes

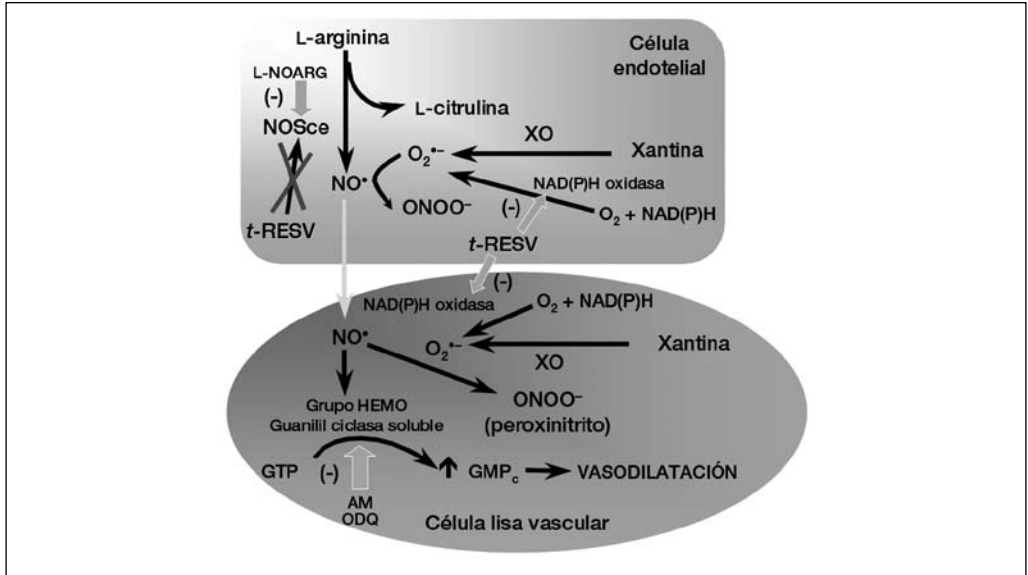


Figura 2. Representación esquemática de la ruta de la L-arginina-NO<sup>•</sup>-GMP<sub>c</sub>. Se indican los lugares en que pueden interferir el t-RESV, la L-NOARG, el AM y el ODQ (para más detalles ver el texto).

característicos dependientes del endotelio del t-RESV podrían ser mediados por un incremento de la vía de la L-arginina-NO<sup>•</sup>-GMP<sub>c</sub>, básicamente por dos mecanismos: a) incremento de la síntesis/liberación del NO<sup>•</sup> por las células

endoteliales y b) disminución de la biotransformación (inactivación) del NO<sup>•</sup>.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, se diseñaron una serie de experimentos en la aorta de rata destinados a evaluar:

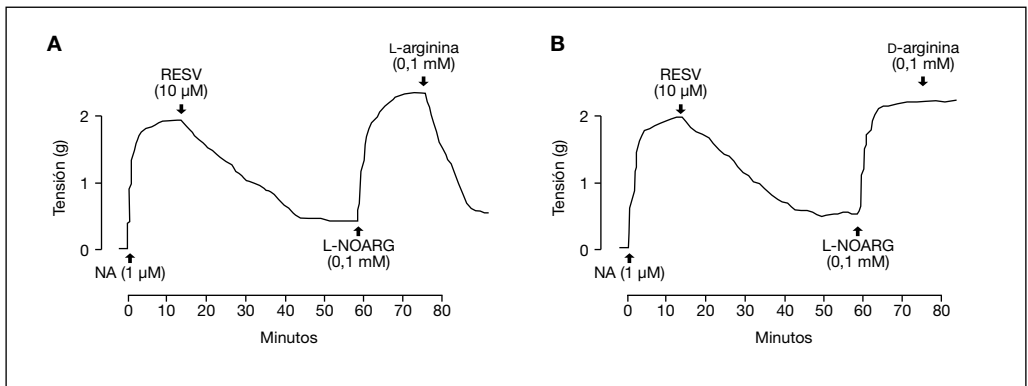


Figura 3. Registro representativo que muestra los efectos vasorrelajantes del t-RESV (10 μM) en anillos de aorta de rata con endotelio precontraídos con NA (1 μM). La vasorrelajación producida por el t-RESV fue revertida por el inhibidor de la NOSce, la L-NOARG (0,1 mM). Esta contracción inducida por la L-NOARG fue invertida, a su vez, por el sustrato fisiológico de la NOS, la L-arginina (0,1 mM; panel A), pero no por la D-arginina (0,1 mM; panel B). Las flechas indican el momento de la adición de los fármacos correspondientes.

- 1) El posible incremento de la biosíntesis de  $\text{NO}^*$ , viendo sobre todo la posible activación directa o indirecta de la NOSce.
- 2) La posible inhibición por parte del *t*-RESV de la biotransformación del  $\text{NO}^*$  en el organismo. De esta forma intentamos estudiar los posibles efectos antioxidantes del *t*-RESV, esto es, como *scavenger* (barredor, secuestrador, atrapador o quelante) de los  $\text{O}_2^{\bullet-}$  o bien como inhibidor de la biosíntesis de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , bien por inhibición directa de la actividad enzimática de la XO, o de la otra enzima que es capaz de sintetizarlo en el organismo en condiciones fisiológicas, la NAD(P)H oxidasa.

*¿Incrementa el t-RESV la síntesis/liberación de NO\* por las células endoteliales?*

Estudiamos, en primer lugar, los posibles efectos directos del *t*-RESV sobre la actividad enzimática de la NOSce, midiendo la conversión de L-[ $^3\text{H}$ ]arginina en L-[ $^3\text{H}$ ]citrulina y uti-

lizando homogenizados de aorta de rata como fuente de enzima.

Con los experimentos correspondientes nos llevamos la primera decepción, porque el *t*-RESV (1-10  $\mu\text{M}$ ) no modificó la actividad de la NOSce (Fig. 2), lo que sugiere que los efectos vasodilatadores del *t*-RESV no se deben a una activación directa de la NOS y, por consiguiente, a un incremento de la biosíntesis de  $\text{NO}^*$ .<sup>9</sup>

La posibilidad de una estimulación indirecta de la NOSce por el *t*-RESV fue evaluada con otros experimentos diferentes.

En diversas ocasiones se ha demostrado que, en la aorta de la rata, la activación de distintos subtipos de receptores muscarínicos por la acetilcolina o de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  endoteliales por agonistas selectivos (por ejemplo BHT-920), respectivamente, produce un aumento en la concentración de calcio libre citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ), que estimula la NOSce y la subsiguiente y rápida producción/liberación de  $\text{NO}^*$  (Fig. 4). Aunque el mecanismo todavía no está claro, este incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$

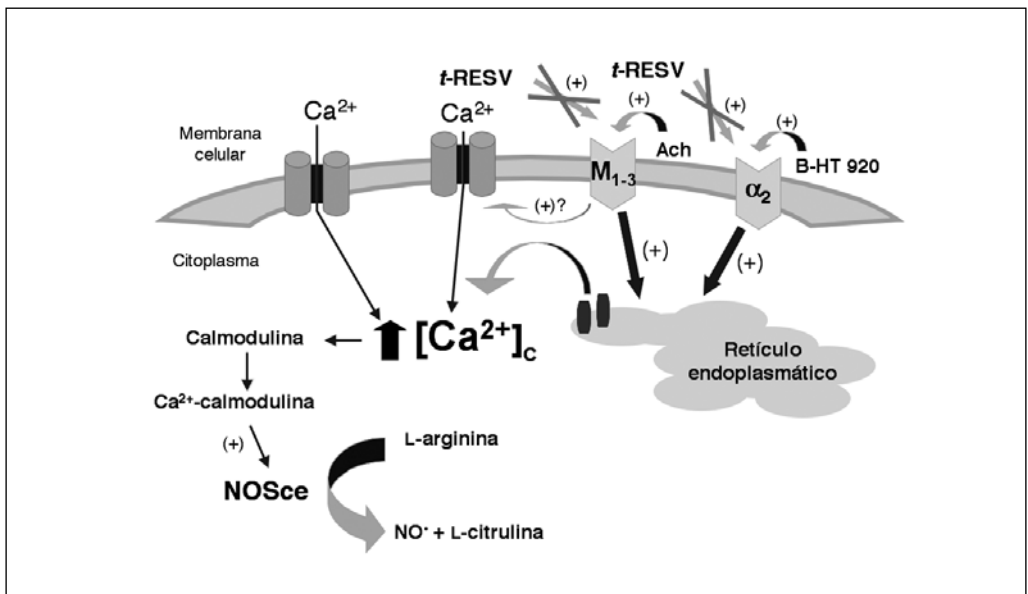


Figura 4. Esquema del mecanismo de la activación indirecta de la NOSce mediante la estimulación de receptores muscarínicos y receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  en la célula endotelial. Como se describe en el texto y se indica en la figura, nuestros experimentos demuestran que el *t*-RESV no es un agonista de esos receptores. Ach = acetilcolina.

parece deberse fundamentalmente a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares de almacenamiento (retículo endoplasmático), y posiblemente también a un aumento del flujo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los hipotéticos y controvertidos canales transmembrana de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor.<sup>13-15</sup> Todos estos efectos son bloqueados específicamente por antagonistas selectivos de los receptores anteriores, como la atropina (un conocido antagonista no selectivo de los diferentes subtipos de receptores muscarínicos) y la yohimbina (un agente bloqueante selectivo de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ ).<sup>12</sup>

Por ello, para averiguar si el *t*-RESV actúa como agonista de estos receptores y activa de forma indirecta la NOSce al desencadenar la cascada de eventos mencionados, estudiamos la influencia de estos antagonistas sobre los efectos vasodilatadores del *t*-RESV y nos llevamos nuestra segunda decepción, ya que las  $\text{Cl}_{50}$  del *t*-RESV frente a las contracciones inducidas por NA y KCl fueron prácticamente similares en ausencia y en presencia de yohimbina y de atropina (Tabla I), lo que sugiere que el *t*-RESV no activa receptores muscarínicos/receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y, por consiguiente, no estimula de forma indirecta la NOSce en la aorta de rata (Fig. 4).

*¿Disminuye el t-RESV la biotransformación (inactivación) del NO\*?*

En vista de estos resultados negativos investigamos (en una segunda serie de experi-

mentos) el posible efecto del *t*-RESV sobre la biotransformación del  $\text{NO}^*$ , para ver si podía atrapar los  $\text{O}_2^{\bullet-}$  encargados de su biotransformación a  $\text{ONOO}^-$ , tanto en la célula endotelial como en la célula vascular, o bien si podía actuar sobre cualquiera de las enzimas encargadas de la biosíntesis de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , esto es, sobre la XO o sobre la NAD(P)H oxidasa.

La potencial actividad del *t*-RESV como *scavenger* selectivo de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  fue evaluada utilizando el denominado sistema hipoxantina (HX)-XO, el cual se puede utilizar al mismo tiempo para estudiar los posibles efectos del *t*-RESV sobre la XO comercial (procedente de leche de manteca). Se ha descrito que la HX, en presencia de oxígeno, por acción de la XO se transforma en xantina,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Por otro lado, la xantina, que se genera en esa primera reacción, combinada con el oxígeno (por acción también de la XO) se transforma en ácido úrico,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los  $\text{O}_2^{\bullet-}$  generados por este sistema reaccionan con el azul de nitrotetrazolio (NBT) (que es reducido en la reacción) para producir formazán. La formación de este compuesto coloreado (formazán) y, por lo tanto, la cantidad de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  generados enzimáticamente, pueden medirse por espectrofotometría a 560 nm. Paralelamente, la producción de ácido úrico por la XO puede medirse a 265 nm (Fig. 5). Cuando un fármaco disminuye la cantidad de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (es decir, la reducción del NBT), y al mismo tiempo no afecta a la formación de ácido úrico, es considerado como un neutralizador selectivo de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Por otro lado, si un fármaco inhibe la actividad de la XO, entonces es capaz de disminuir tanto la concentración de ácido úrico como la de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .<sup>16</sup>

En nuestros experimentos, a diferencia de la superóxido dismutasa [SOD, 0,1-10 U/ml;  $\text{Cl}_{50}$  (media  $\pm$  error estándar) = 1,02  $\pm$  0,06 U/ml (n = 5)], un conocido *scavenger* selectivo de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , el *t*-RESV (1-10  $\mu\text{M}$ ), no modificó la producción de formazán por la reacción de los  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (generados por el sistema HX-XO) con el NBT (Fig. 5). Además, a diferencia del alopurinol [1-10  $\mu\text{M}$ ;  $\text{Cl}_{50}$  (media  $\pm$  error estándar) = 3,63  $\pm$  0,29  $\mu\text{M}$  (n = 5)], un inhibidor de

TABLA I.  $\text{Cl}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) de la vasorrelajación inducida por el *t*-RESV en anillos de aorta de rata con endotelio precontraídos con NA (1  $\mu\text{M}$ ) o con altas concentraciones de KCl extracelular (60 mM), en ausencia y en presencia de atropina (10  $\mu\text{M}$ ) y de yohimbina (1  $\mu\text{M}$ ). Cada valor representa la media  $\pm$  error estándar de cinco experimentos.

Protocolos	(-)-NA	KCl
<i>t</i> -RESV	3,4 $\pm$ 0,32	9,6 $\pm$ 0,87
Atropina + <i>t</i> -RESV	3,2 $\pm$ 0,23	9,33 $\pm$ 0,76
Yohimbina + <i>t</i> -RESV	3,3 $\pm$ 0,26	8,97 $\pm$ 0,88

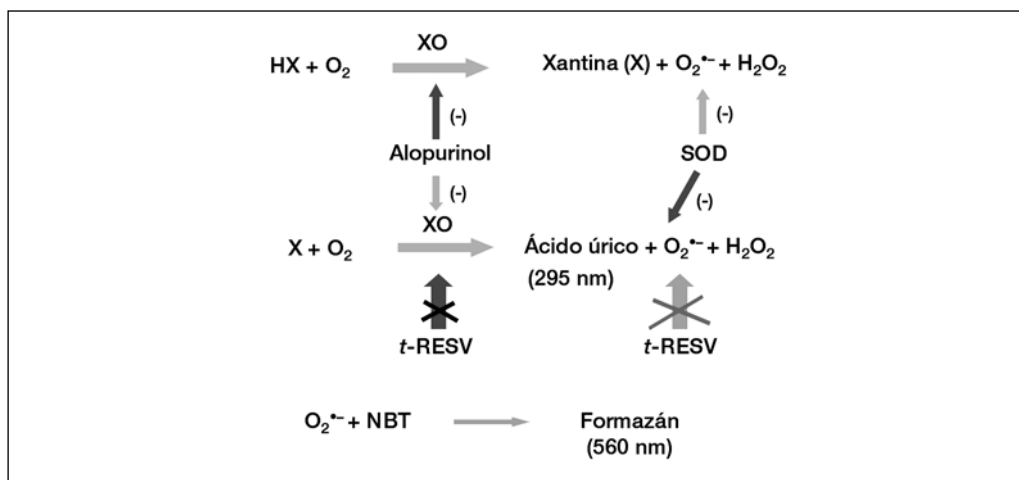


Figura 5. Representación esquemática de las reacciones producidas en el sistema HX-XO. Como se detalla en el texto y se indica en la figura, nuestros experimentos demuestran que el t-RESV no es un scavenger selectivo de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ni un inhibidor de la XO comercial.

referencia de la XO, el t-RESV no tuvo efecto sobre la oxidación enzimática de la xantina a ácido úrico catalizada por la XO (Figs. 5 y 6). Estos resultados indican claramente que el t-RESV no muestra propiedades neutralizadoras selectivas de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ni propiedades inhibitoras directas de la XO y, por lo tanto, que esas propiedades no están implicadas en los efectos vasorrelajantes dependientes del endotelio del t-RESV en la aorta de rata.<sup>9</sup> Era nuestra tercera decepción.

Con todos estos resultados negativos estábamos bastante deprimidos y desesperados, porque sólo nos quedaba una última posibilidad en la hipótesis de la que habíamos partido: que el t-RESV inhibiese la NAD(P)H oxidasa, la segunda enzima que participa en la biosíntesis de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

La NAD(P)H oxidasa es una enzima de membrana (aunque tiene también algunas subunidades citosólicas) que, a partir del oxígeno y del NADH (sustrato preferente en células vasculares) o el NADPH (sustrato preferente en células fagocíticas) procedentes del metabolismo celular, cataliza la biosíntesis de NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> y O<sub>2</sub><sup>•-</sup> [estequiometría: 2O<sub>2</sub> + NAD(P)H ⇒ 2O<sub>2</sub><sup>•-</sup> + NAD(P)<sup>+</sup> + H<sup>+</sup>] (Fig. 6).

La NAD(P)H oxidasa vascular difiere de la NAD(P)H oxidasa fagocítica en varias subunidades.<sup>16,17</sup>

Iniciamos los experimentos correspondientes para estudiar los posibles efectos del t-RESV sobre la actividad de la NAD(P)H oxidasa utilizando homogenizados de aorta de rata como fuente enzimática (la verdad es que sin muchas esperanzas), y nos llevamos una gran alegría al ver que el t-RESV es un potente inhibidor de esta enzima y, por consiguiente, es un buen antioxidante ya que disminuye la biosíntesis de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. En efecto, el t-RESV (1-10 µM), al igual que el difeniliodonio (0,5-3 µM) [DPI, un inhibidor de referencia de la NAD(P)H oxidasa], disminuyó notablemente, de forma dependiente de la concentración, la actividad enzimática de la NADH/NADPH o NAD(P)H oxidasa en la aorta de rata (Figs. 2 y 6), es decir, la señal de quimioluminiscencia específica emitida por la reacción entre la lucigenina y los O<sub>2</sub><sup>•-</sup> generados a partir del oxígeno y del NADH (el sustrato preferido por la NADH/NADPH oxidasa en tejidos vasculares). Los valores correspondientes de CI<sub>50</sub> fueron 4,81 ± 0,37 y 1,46 ± 0,10 µM (n = 5), respectivamente.<sup>9</sup>

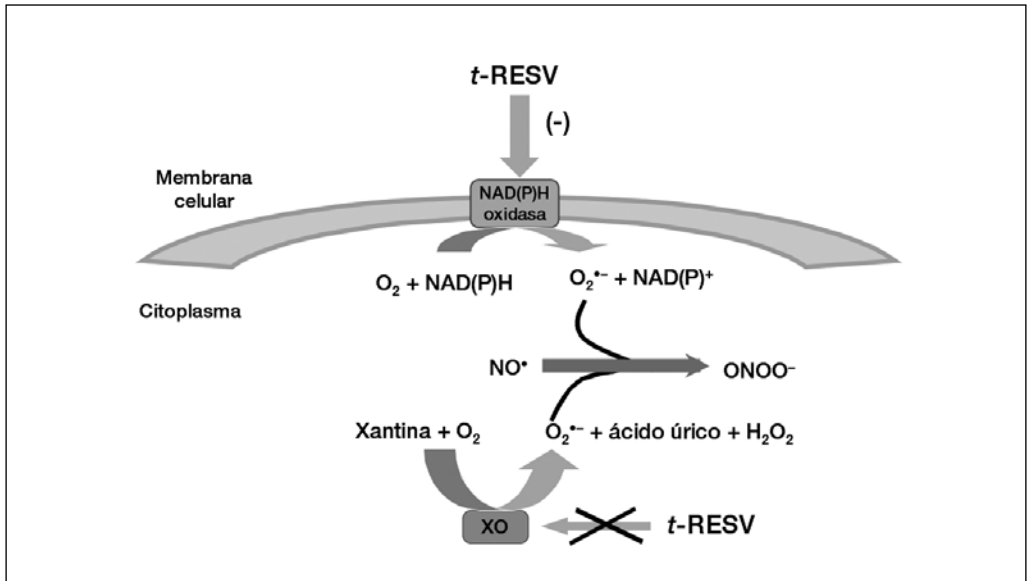


Figura 6. Esquema de la biosíntesis de  $O_2^{\bullet-}$  en las células vasculares (células lisas y células endoteliales) mediante la activación de la NAD(P)H oxidasa y de la XO. Como se describe en el texto y se indica en la figura, el t-RESV disminuye la actividad de la NAD(P)H oxidasa, pero no modifica la de la XO.

### Efectos cardioprotectores derivados del incremento de las concentraciones de $NO^{\bullet}$ producidas por el t-RESV

En resumen, los resultados anteriores demuestran que el efecto vasorrelajante característico dependiente del endotelio del t-RESV en la aorta de la rata parece deberse a un incremento de la actividad de la vía de la L-arginina- $NO^{\bullet}$ - $GMP_c$ , posiblemente mediante la inhibición de la actividad de la NADH/NADPH oxidasa vascular, la subsiguiente disminución de la biosíntesis celular basal de  $O_2^{\bullet-}$  y, por consiguiente, de la inactivación del  $NO^{\bullet}$  por dichos radicales, lo que da lugar a un incremento de las concentraciones de  $NO^{\bullet}$ . En este sentido, es preciso comentar que dicho incremento de las concentraciones de  $NO^{\bullet}$  en el organismo tiene efectos cardiosaludables por diversos mecanismos:

1) Potente actividad vasodilatadora (Fig. 2), altamente beneficiosa en la cardiopatía isquémica y en los efectos antianginosos de

la nitroglicerina y otros nitrovasodilatadores donadores de  $NO^{\bullet}$ .<sup>11</sup>

2) Potente efecto inhibitor de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes, lo cual va a ser clave para la prevención de la aterosclerosis, esto es, para inhibir la formación de ateromas. Como se puede ver en la Fig. 7, un grupo de glóbulos blancos (los monocitos), al atravesar los poros existentes entre las uniones de las células endoteliales, pueden pasar al subendotelio, es decir, al espacio existente entre las células endoteliales y las células vasculares lisas de la capa media del vaso. Ya en el espacio subendotelial, fuera del torrente circulatorio, los monocitos se convierten automáticamente en células fagocíticas, que son los macrófagos. Por otro lado, las LDL, cuando están circulando, sufren una serie de procesos de oxidación (normalmente por la acción de distintos radicales libres producidos en condiciones patológicas) y se transforman en LDL oxidadas (LDL-OX). A diferencia de las LDL normales, las LDL-OX son captadas por los



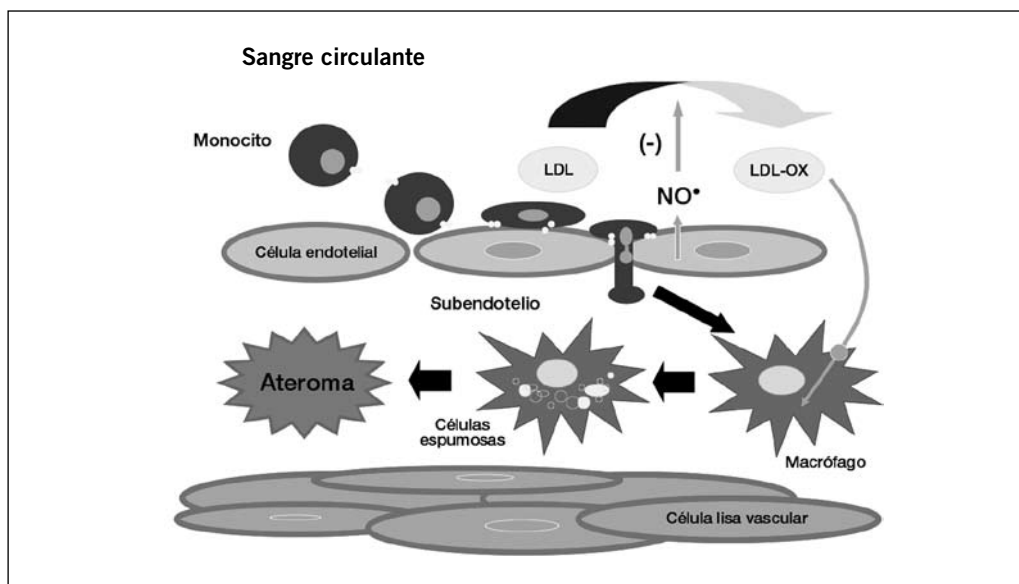


Figura 7. Representación esquemática de los efectos cardioprotectores del  $\text{NO}^*$  derivados de la inhibición de la oxidación de las LDL (para más detalles ver el texto). LDL-OX = LDL oxidadas.

macrófagos de forma indiscriminada, con lo cual se forman las llamadas células espumosas porque son células cargadas de grasa. La aparición de estas células es el paso inicial para que se desarrolle la placa lipídica calcificada (ateroma) en la pared del vaso sanguíneo. Pues bien, como se ha comentado anteriormente, el  $\text{NO}^*$  liberado de las células endoteliales es un potente inhibidor de la oxidación de las LDL, por lo cual éstas, al no estar oxidadas, no son captadas indiscriminadamente por los macrófagos derivados de los monocitos, no se transforman en células espumosas y, por consiguiente, no depositan grasa en la pared vascular y se previene la formación de la placa aterosclerótica.<sup>18</sup>

- 3) Potente efecto antiagregante plaquetario, impidiendo que se generen los trombos intraarteriales o intravasculares blancos, constituidos por masas blancas de plaquetas adheridas y agregadas a la placa aterosclerótica, que a medida que crece termina penetrando en la luz del vaso al perforar el endotelio vascular (Fig. 8).<sup>11</sup>

## Conclusiones

Teniendo en cuenta los efectos cardioprotectores del  $\text{NO}^*$  descritos anteriormente y asumiendo que la actividad de la ruta L-arginina- $\text{NO}^*$ -GMP<sub>c</sub> parece ser baja y estar alterada (disminución de la síntesis de  $\text{NO}^*$ / incremento de la producción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) en las enfermedades del sistema cardiovascular, como la hipertensión y la aterosclerosis,<sup>6,17</sup> probablemente debido a una actividad incrementada de la NADH/NADPH oxidasa, si el t-RESV mostrase un comportamiento similar en los vasos sanguíneos humanos nuestros resultados permitirían sugerir que este compuesto polifenólico natural podría desempeñar un papel importante en los efectos cardioprotectores producidos a largo plazo por el consumo diario de moderadas cantidades de vino.

Como se puede comprobar, tanto los estudios funcionales realizados en la aorta aislada de rata como los realizados a escala subcelular y molecular han sido clave para poder llegar a la conclusión anterior. Por estos moti-

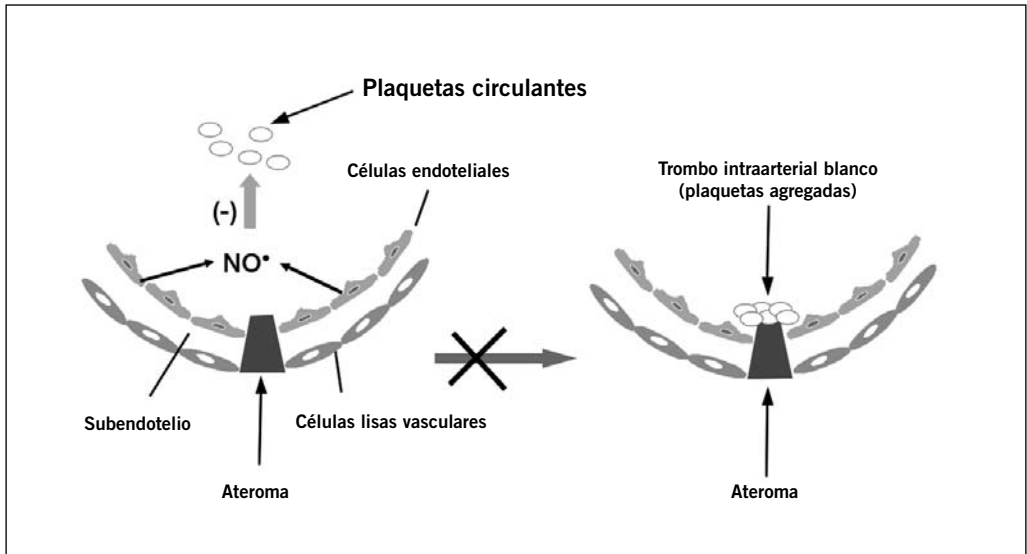


Figura 8. Esquema de los efectos inhibitorios del NO sobre la adhesión y la agregación de las plaquetas a la placa aterosclerótica.

vos, a pesar de que en la actualidad muchos farmacólogos sólo utilizan técnicas de biología molecular para generar sus resultados, a ser posible siempre se deberán realizar también simultáneamente el mayor número de experimentos *in vivo* e *in vitro* sobre tejidos aislados, células y fracciones subcelulares (con todas las ventajas e inconvenientes que cada uno de ellos lleva consigo). Solamente trabajando de esta forma podrá ser viable el estudio conjunto de los resultados obtenidos, su comparación y su posible extrapolación de unos tipos de experimentos a otros.

Ya para terminar, después de todo lo expuesto hasta aquí y ante la cuestión de si el vino es realmente recomendable, yo casi me atrevería a decir que dos o tres copitas diarias de vino pueden ser útiles para prevenir situaciones desagradables como un ataque de angina de pecho o un infarto de miocardio.

### Agradecimientos

Los estudios expuestos en este trabajo han sido financiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología

(proyectos SAF2000-0137 y SAF2002-0245), por la Consellería de Innovación, Industria e Comercio de la Xunta de Galicia (proyectos PGDIT02B-TF20301PR y INCITE07PXI203039ES), por el Ministerio de Sanidad y Consumo (FISS P1061537) y por la ayuda económica recibida con la concesión del Premio en Farmacología 2003 (Sociedad Española de Farmacología/Almirall-Prodesfarma).

El autor está muy agradecido a la Sociedad Española de Farmacología y a los laboratorios Almirall-Prodesfarma por haberle concedido el Premio en Farmacología 2003, así como a la Consellería de Educación e Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia por la ayuda concedida para la reducción de la actividad docente (curso académico 2007-2008) dentro del programa de promoción de intensificación de la actividad investigadora en el Sistema Universitario de Galicia (SUG).

### BIBLIOGRAFÍA

1. St. Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*. 1979; 1:1017-20.
2. Renaud S., de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992;339:1523-6.

3. Arts IC, Hollman PCh. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:317S-25S.
4. Manach C, Mazur A, Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16:77-84.
5. Zern TL, Fernández ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr.* 2005;135:2291-4.
6. Orallo F. Biological effects of *cis*- versus *trans*-resveratrol. En: Aggarwal BB, Shishodia S, editores (University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, USA). *Oxidative stress and disease (series)*. 20. Resveratrol in Health and Disease. Boca Raton, USA: CRC Press; 2006. p. 577-600.
7. Pérez-Vizcaíno F, Duarte J, Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res.* 2006;40:1054-65.
8. Orallo F, Camiña M. Study of the endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilator effects of resveratrol in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 1998;124:108P.
9. Orallo F, Álvarez E, Camiña M, Leiro JM, Gómez E, Fernández P. The possible implication of *trans*-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol.* 2002;61:294-302.
10. Furchgott RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res.* 1983;53:557-73.
11. Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:191-220.
12. Alexander SPH, Mathie A., Peters JA. *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 2nd edition (2007 revision). *Br J Pharmacol.* 2007;150: S1-S168.
13. Eglème C, Godfraind T, Miller RC. Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of the endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 1984;81:16-8.
14. Boulanger ChM, Morrison KJ, Vanhoutte P. Mediation by M<sub>3</sub>-muscarinic receptors of both endothelium-dependent contraction and relaxation to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Br J Pharmacol.* 1994;112:519-24.
15. Busse R, Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med.* 1995;27:331-40.
16. Orallo, F. Comparative studies of the antioxidant effects of *cis*- and *trans*-resveratrol. *Curr Med Chem.* 2006;13:87-98.
17. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87:245-313.
18. Stocker, R, Keaney, J.F. Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84:1381-1478.

## DISCUSIÓN

**S. ERILL:** ¿Qué concentraciones de *t*-RESV se consiguen en el organismo tras la ingesta diaria de tres copas de vino?

**F. ORALLO:** Se consiguen concentraciones en sangre muy parecidas a las que acabo de exponer. El grupo de Alberto Bertelli, de la Universidad de Milán, ha demostrado que el *t*-RESV se va acumulando también en diferentes tejidos del organismo (hígado, riñón y corazón). Además, hay que tener en cuenta que las concentraciones de *t*-RESV varían mucho dependiendo del tipo de vino que se ingiera. El vino tinto, en líneas generales, por la forma de preparación, contiene más *t*-RESV que el vino blanco. Por consiguiente, después de un consumo moderado y diario, con el vino tinto

se alcanzan concentraciones plasmáticas más altas de *t*-RESV que con el vino blanco.

**M.J. SANZ:** Parte de los efectos del *t*-RESV son revertidos por la L-NAME (inhibidor de las isoformas de la NOS). ¿Qué ocurre con la ciclooxigenasa (COX)?

**F. ORALLO:** Se ha descrito en distintas publicaciones que el *t*-RESV inhibe la actividad enzimática de las isoformas de la COX, fundamentalmente la de la COX-1. Como parece que la investigación de la actividad farmacológica de los isómeros del resveratrol y de sus derivados no interesa en este país, porque me están denegando todos los proyectos que solicito, en la actualidad en Santiago de

Compostela nos dedicamos a evaluar, entre otras cosas, los efectos sobre la COX-1 y la COX-2 de nuevos fármacos antiinflamatorios de origen natural y sintético. Al haber tenido que poner en marcha y a punto las correspondientes técnicas de medida de la actividad enzimática, hemos aprovechado para realizar algunos experimentos con el *t*-RESV y hemos observado que dicho polifenol inhibe la COX-1 a concentraciones similares a las que tiene efectos vasorelajantes en la aorta de rata.

**M.J. SANZ:** En colaboración con el Dr. Orallo hemos observado claros efectos antiinflamatorios en un modelo crónico de inflamación en ratas tratadas durante un mes con 15 mg de *t*-RESV por vía oral. Y respondiendo al Dr. Erill, creo que hay vinos que llegan a concentraciones de *t*-RESV de 75 mg por litro.

**A.M. PLANAS:** ¿Creéis que podría haber un beneficio agudo del tratamiento con *t*-RESV? ¿Dosis más altas podrían tener algún efecto no deseado?

**F. ORALLO:** Hasta ahora sólo se han descrito en humanos efectos beneficiosos en tratamientos crónicos y se han iniciado muy pocos estudios clínicos debido a que, al ser un compuesto polifenólico de origen natural, el *t*-RESV no se puede patentar. De todos modos, en Estados Unidos y Canadá se están realizando ensayos clínicos con el *t*-RESV y con algunos derivados sintéticos para el tratamiento del cáncer de colon y de infecciones recurrentes por el VHS-1 (creo que tales ensayos se encuentran en las fases I/II). Además, el grupo de David Sinclair, de la Universidad de Harvard, está intentando conseguir financiación para realizar estudios clínicos relacionados con los efectos beneficiosos que el *t*-RESV tiene sobre el envejecimiento, fundamentalmente por ser un potente activador de la actividad enzimática de las sirtuinas. Por otro lado, al igual que los estudios de toxicidad realizados en la fase I de los ensayos clínicos que he citado anteriormente, los pocos estudios toxicológicos

aislados llevados a cabo hasta la fecha en humanos demuestran que el *t*-RESV es seguro y que no ocasiona reacciones adversas cuando se administra en dosis únicas de 0,5, 1, 2,5 y 5 g por vía oral a personas sanas de aproximadamente 70 kg de peso.

**J.M. BAEYENS:** El resveratrol y los antiinflamatorios no esteroideos producen un efecto analgésico mediado por el óxido nítrico, el GMP<sub>c</sub> y la apertura de los canales de potasio dependientes de ATP. ¿En este modelo también se ha observado la apertura de los canales de potasio? ¿Los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos ejercen un efecto similar al del resveratrol?

**F. ORALLO:** No hemos realizado ningún estudio sobre esto.

**A.G. FERNÁNDEZ:** Teniendo en cuenta que el vino supone la ingesta concomitante de etanol, lo que puede estar contraindicado en un número apreciable de casos, ¿podría comentar qué otros alimentos contienen *t*-RESV?

**F. ORALLO:** Cacahuètes, arándanos y moras de moral, principalmente.

**F. PÉREZ-VIZCAÍNO:** Nosotros trabajamos con flavonoides y hemos observado que en plasma se encuentran como glucosulfocojugados, con lo cual hemos tenido que repetir la farmacología basándonos en estos metabolitos. ¿Sucedo lo mismo con el resveratrol?

**F. ORALLO:** Prácticamente no se han realizado estudios de este tipo en humanos. De todas formas, como sucede con otros fármacos, aunque se ha descrito que el *t*-RESV genera varios metabolitos, entre ellos los correspondientes glucurónidos y sulfatos, nunca se produce una biotransformación instantánea, con lo cual inicialmente también habrá en sangre *t*-RESV sin metabolizar. Además, creo que dichos glucurónidos y sulfatos conservan en parte la actividad farmacológica que tiene el compuesto natural. En el vino, aparte del *t*-RESV se encuentran presentes polímeros

y glucósidos de este polifenol. Dichos derivados son hidrolizados a *t*-RESV en el tubo digestivo, el cual luego es absorbido como tal. Esto contribuye a que en plasma se alcancen concentraciones de *t*-RESV próximas a las terapéuticas después de un consumo diario de cantidades moderadas de vino.

**A.M. PLANAS:** ¿El *t*-RESV se acumula en el cerebro?

**F. ORALLO:** Está publicado que atraviesa la barrera hematoencefálica y que accede al SNC, pero me parece que no se ha descrito que el *t*-RESV se acumule en el cerebro.

**J.M. BAEYENS:** El equivalente en el uso clínico del *t*-RESV serían los nitratos, y con un uso continuado producen tolerancia. ¿Se ha descrito algo similar con el *t*-RESV?

**F. ORALLO:** Que yo sepa, no se ha descrito que el *t*-RESV produzca tolerancia.

**P. D'OCÓN:** La tolerancia que generan los nitratos se debe en gran parte al metabolismo previo que sufren, y quizá el mecanismo no sea comparable al del resveratrol, lo cual justificaría que éste no presente esa tolerancia por actuar directamente, sin necesidad de una metabolización previa.