



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE KINESIOLOGÍA**

**“ Determinación del efecto del extracto seco estandarizado de semilla de  
*Vitis vinifera* en la disfunción endotelial vascular de ratas inducida por  
concentraciones altas de glucosa.”**

**Natalia Francisca Alvarez Lucero**

**Lilian Verónica Solis Navarro**

**-2004-**

**“ Determinación del efecto del extracto seco estandarizado de semilla de  
*Vitis vinifera* en la disfunción endotelial vascular de ratas inducida por  
concentraciones altas de glucosa.”**

Tesis

Entregada a la

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

En cumplimiento parcial de los requerimientos

Para optar al grado de

**LICENCIADO EN KINESIOLOGÍA**

FACULTAD DE MEDICINA

Por

***Natalia Francisca Alvarez Lucero***

***Lilian Verónica Solís Navarro***

**2004**

**Director de Tesis:** Miguel A. Morales Segura  
Profesor Asistente de Farmacología

**Patrocinante de Tesis:** Sra. Sylvia Ortiz Zúñiga, *M.Sc.*

## ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
Endotelio Vascular	10
Contracción del músculo liso	10
Relajación del músculo liso	11
Hiperglicemia	11
Estrés oxidativo	14
Disfunción Endotelial	16
<i>Vitis vinifera</i>	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVO ESPECÍFICO	21
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
JUSTIFICACIÓN	22
TIPO DE ESTUDIO	23
DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	23
HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	23
VARIABLES	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26

DISEÑO EXPERIMENTAL	26
Inducción experimental de hiperglicemia	28
Tratamiento farmacológico	29
Determinación del grado de disfunción endotelial	29
Obtención y preparación de los segmentos de aorta	30
Contracción con Fenilefrina	33
Relajación inducida por Acetilcolina	33
Determinación de dosis de extracto de Vitis vinifera	34
Soluciones, sales y fármacos	34
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	52
PROYECCIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	68
Fisiología del endotelio	68
Glicosilación no enzimática de proteínas	72
Teoría del Sorbitol	73
Antioxidantes	74
APÉNDICE	75
Fotos del Laboratorio	75
Registros Representativos	77

## ABREVIATURAS

<b>ACh</b>	: Acetilcolina
<b>AGE</b>	: Producto de glicosilación avanzada
<b>AINES</b>	: Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos
<b>COX</b>	: Ciclooxigenasa
<b>nNOS</b>	: Óxido nítrico sintasa neuronal
<b>DAG</b>	: Diacilglicerol
<b>DCCT</b>	: Diabetes Control and Complication Trial
<b>DE</b>	: Disfunción Endotelial
<b>DMSO</b>	: Dimetilsulfóxido
<b>EDHF</b>	: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
<b>eNOS</b>	: Óxido nítrico sintasa endotelial
<b>ET-1</b>	: Endotelina -1
<b>EVv</b>	: extracto seco estandarizado de semilla de <i>Vitis vinifera</i>
<b>FAD</b>	: Flavinadeninucleótido
<b>FE</b>	: Fenilefrina
<b>FMN</b>	: Flavinmononucleótido
<b>GLU</b>	: Glucosa
<b>INDO</b>	: Indometacina
<b>iNOS</b>	: Óxido nítrico sintasa inducible
<b>KHm</b>	: Krebs Henseleit modificado
<b>LDL</b>	: Lipoproteína de baja densidad
<b>NO</b>	: Óxido nítrico
<b>NOS</b>	: Óxido nítrico sintasa

**PKC** : Proteína quinasa C  
**RL** : Radical Libre  
**ROS** : Especies reactivas de oxígeno  
**SOD** : Superóxido dismutasa  
**THB** : Tetrahidrobiopterina

## RESUMEN

El endotelio vascular tiene por función, la mantención de la homeostasis, y el control del tono vascular. Variados factores contribuyen a provocar disfunción del endotelio. En esta investigación se indujo DE vascular con una alta concentración de glucosa.

El estudio pretende demostrar el efecto preventivo del fitofármaco antioxidante Extracto de *Vitis vinifera* (Evv) frente a la DE inducida por glucosa (46mM).

En este modelo *in vitro*, se extrajeron anillos aórticos de rata macho *Sprague Dawley*, que se dividieron en cinco grupos experimentales: grupo control, grupo 1 incubado con glucosa (46mM), grupo 2 tratado con Evv (5,35 mg/ml), grupo 3 tratado con DMSO (100  $\mu$ M) y grupo 4 tratado con INDO (10  $\mu$ M). Los grupos 3 y 4 fueron utilizados para dilucidar el posible mecanismo de acción de EVv.

Se evaluó el daño endotelial midiendo la respuesta de relajación endotelio dependiente inducida por acetilcolina.

Los resultados obtenidos mostraron en el grupo 1 una DE de un 49,13%, generada por la alta concentración de glucosa (46mM) a través de mecanismos que todavía no están claros, en el grupo 2 la DE se previno significativamente ( $p < 0.001$ ) con EVv y los resultados de los grupos 3 y 4 indicarían que posiblemente los RL y la vía de la COX estarían implicados en el mecanismo de inducción de DE mediante una alta concentración de glucosa.

**Palabras claves:** Disfunción endotelial, Hiperglicemia y Diabetes, Radicales Libres, Estrés Oxidativo, Antioxidantes, *Vitis vinifera*.

### **ABSTRACT**

Vascular endothelium controls homeostasis and vascular tone. Endothelial dysfunction (ED) is produced by many factors. In this study, we induced ED with a high concentration of glucose (46mM).

The study intends to demonstrate the preventative effect of *Vitis vinifera* extract (VvE) in high glucose-induced ED (46mM). The aim of this study was to prove the hypothesis that VvE has a prevented effect against glucose-induced ED.

The aortic rings were extracted from rats which were randomly assigned to five groups: Control group, group 1 (high glucose 46mM), group 2 (VvE + high glucose 46mM), group 3 (DMSO + high glucose 46mM) and group 4 (Indometacin + high glucose 46mM). Group 3 and 4 were used to find out the VvE's pathway. ED was evaluated by measuring the ACh-induced endothelium-dependent relaxation response.

Results showed that high glucose (46mM) induced notable acute ED in *in vitro* aortic rings, through a mechanism not yet clear, that in group 2 VvE significantly prevented ( $P < 0.001$ ) the ED and the results of group 3 and 4 should show that the free radicals and the COX's pathway can be similar to ED induced by high glucose.

**Keyword:** Endothelial dysfunction, Hyperglycemia and Diabetes, Free radicals, Oxidative Stress, Antioxidant, *Vitis vinifera*.

## INTRODUCCIÓN

Las células endoteliales son responsables del tono presor del músculo liso vascular, mediante la liberación de sustancias vasoactivas. Los procesos patológicos que alteran a las células endoteliales, conllevan a una DE, que consiste en la pérdida parcial o total de liberación y/o producción de NO, con la consecuente disminución de la capacidad de inducir relajación del músculo liso vascular. La DE produce trastornos en la perfusión tisular, isquemia del tejido adyacente, necrosis tisular, aumentos crónicos en la presión arterial media y formación de placas ateromatosas.

Una de las patologías generadoras de DE vascular es la Diabetes, esta enfermedad en las últimas décadas ha aumentado fuertemente su morbimortalidad en el mundo. Por esto resulta importante estudiar un mecanismo para prevenir el daño que genera esta enfermedad sobre el endotelio vascular.

Los antioxidantes se han utilizado para aminorar los efectos nocivos cardiovasculares de la Diabetes. El EVv, por su contenido de proantocianidinas polifenólicas tiene una demostrada acción antioxidante *in vitro*, superior a las vitaminas C y E por sí solas o en combinación.

Por estas razones expuestas en el presente trabajo, se planteó determinar la eficacia del EVv en la prevención de la DE vascular provocada por una concentración elevada de glucosa.

## REVISION BIBLIOGRAFICA

### Endotelio Vascular

El endotelio vascular es un tejido epitelial unicelular, multifuncional y de gran plasticidad. Actúa como una barrera mecánica semipermeable entre la sangre y el vaso arterial, y además, como una glándula autocrina, paracrina y endocrina (Vane y cols, 1990). Regula el transporte capilar de nutrientes, hormonas y productos de desecho metabólico entre la sangre y los tejidos, la proliferación del músculo liso, la agregación plaquetaria, la adhesión de monocitos, la hemostasis, la trombolisis, la inflamación, algunas respuestas inmunes, la producción de radicales libres y regulación del tono vascular (Vogel, 1997). Esta regulación del tono vascular, se debe a un equilibrio de sustancias vasoconstrictoras y vasorrelajadoras (Rojas y Morales. 2003). Las sustancias que producen contracción son la ET-1, el tromboxano A<sub>2</sub> y la angiotensina II y las que producen relajación son la prostaciclina, la bradicinina, el EDHF y el factor relajante derivado del endotelio u NO.

El NO es el relajante más potente del organismo. Fisicoquímicamente es un gas anfipático, que difunde a través de las membranas fácilmente (Furchgott y Zawadsky, 1980; Ignarro y cols, 1987). (Fisiología del endotelio, Anexos)

### Contracción del músculo liso

El principal responsable de la contracción del músculo liso vascular es el ión calcio. Frente a un estímulo agonista alfa-adrenérgico, como el producido por la FE, se produce una contracción característica de dos fases. La primera fase, transiente, exhibe un comienzo rápido (menos de un minuto), debido a la salida de

ión calcio desde el retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma. Debido a lo anterior, se produce una despolarización de la membrana que induce la apertura de canales de calcio voltaje dependiente, permitiendo la entrada del calcio extracelular. Esta segunda fase, sostenida, presenta un desarrollo temporal más lento. (Karakı y cols, 1997)

### **Relajación del músculo liso**

La relajación del músculo liso vascular puede ocurrir por diferentes mecanismos, por ejemplo: El uso de agentes antagonistas de calcio, bloquean la apertura de los canales de calcio voltaje dependiente, al igual que las sustancias que activan la apertura de canales de potasio, que inducen la hiperpolarización del potencial de membrana e inhiben la apertura de los canales de calcio voltaje dependientes, con la consiguiente disminución de la concentración de calcio, lo que disminuye la capacidad de contracción del músculo liso (Weston y cols. 1992).

El mecanismo principal del NO es activado a través de receptores de membrana, difundiendo hacia el músculo liso, donde estimula la enzima guanilato ciclasa, la cual aumenta el GMPc y provoca una disminución de la concentración de calcio (Waldman y cols. 1988). Un mecanismo similar es a través de la prostaciclina, que actúa a través de la adenilato ciclasa, induciendo el aumento del AMPc (Karakı y cols. 1997).

### **Hiperglicemia**

La hiperglicemia en la diabetes, es el factor metabólico más importante relacionado con la microangiopatía (Lorenzi y cols, 1986) y parece ser un

importante causante del desarrollo de complicaciones micro y macrovasculares (Inoguchi y cols, 2003). Este hecho fue confirmado por el estudio DCCT para la microangiopatía en el caso de la diabetes tipo 1 y corroborado por el *United Kingdom Prospective Diabetes Study*, publicado a fines de 1998 para el caso de la diabetes tipo 2.

Diferentes mecanismos bioquímicos y fisiopatológicos han sido propuestos para explicar los efectos adversos de la hiperglicemia en células vasculares (Greene y cols. 1987; Baynes, 1991; Sheetz y cols. 2002)

#### *Activación proteína quinasa C*

Entre estos mecanismos esta ampliamente aceptado que los niveles altos de glucosa inducen la activación persistente de la vía del DAG- PKC (Craven y cols. 1989; Wolf y cols. 1991; Inoguchi y cols. 1992).

La PKC es una enzima que pertenece a una familia de serina-treonina quinasas que son activadas por fosfolípidos ácidos (Takai y cols. 1977), particularmente por fosfatidilserina, pero que poseen diferentes requerimientos de calcio, DAG y ésteres de forbol para su activación. En la diabetes, la PKC está consistentemente aumentada, esto genera como efecto la activación de fosfolipasa A<sub>2</sub> aumentando el ácido araquidónico lo que estimula la producción de tromboxano A<sub>2</sub>. Además la PKC, inhibe la bomba de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>, al parecer mediante la producción de la prostaglandina E<sub>2</sub>. Esta inhibición facilita la contracción del músculo liso. También estimula la producción de vasoconstrictores como la ET-1, puede inhibir la eNOS, y puede activar o inhibir la iNOS.

Además, concentraciones elevadas de glucosa producen un aumento en la producción de “*novo*” de DAG, activando la PKC, que a su vez estimula a la NADPH oxidasa (Inoguchi y *cols.* 2003), esta última enzima considerada por algunos autores como la más importante fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los vasos sanguíneos (Mohazzab y *cols.* 1994; Griendling y *cols.* 1994; Rajagopalan y *cols.* 1996). Además existe un feedback positivo, por el cual los radicales libres generados por la PKC activan la fosfolipasa D que hidroliza la fosfatidilcolina y así provocar nuevamente la activación del DAG y PKC (Gutterman, 2002).

La NADPH oxidasa es un complejo enzimático de membrana plasmática que oxida el NADPH citosólico a NADP<sup>+</sup> y red de oxígeno, con la concomitante liberación de radical superóxido. En solución los radicales superóxido son rápidamente convertidos en peróxido de hidrógeno que a su vez genera radicales hidroxilo. Los tres compuestos son muy reactivos pudiendo dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

Otro mecanismo de producción de RL y ROS son la Glicosilación no enzimática de proteínas, junto con la teoría del sorbitol o vía de la “*Aldosa reductasa*”, descritas en Anexo.

### **Estrés oxidativo**

En condiciones normales la célula mantiene un estado de equilibrio redox caracterizado por un balance entre la producción de especies prooxidantes, tales como las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, y su consumo mediante

sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Si este equilibrio se rompe, ya sea por un aumento en la cantidad neta de prooxidantes, una disminución en la capacidad antioxidante de la célula, o ambas, estamos en la presencia de un estado de estrés oxidativo (Sies 1986, Videla 2000).

Este proceso produce daño celular y ha sido asociado a procesos fisiológicos como el envejecimiento (Cao y cols. 1995) y también a diferentes patologías como aterosclerosis, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias, y otras (Lunec, 1990). El daño oxidativo depende del balance entre la generación de radicales libres y el sistema antioxidante del organismo.

Por nuestro metabolismo aeróbico la reducción del oxígeno genera especies reactivas, entre ellos algunos RL. Se define RL como aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial de alta inestabilidad. En la molécula de oxígeno se conocen las siguientes especies reactivas: anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de Hidrógeno y oxígeno singulete, estos dos últimos no son RL.

Las principales fuentes productoras de radicales libres son:

- *Mitocondria*: durante el proceso de fosforilación oxidativa, el sistema de transporte mitocondrial no es perfecto y se producen iones superóxido cuya dismutación enzimática conduce a la formación de peróxido de hidrógeno (Turrens, 1994)

- *Leucocitos*: excepto Linfocito T y B, constituyen una fuente importante cuando se activan por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (complemento, interleuquinas, etc), poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de O<sub>2</sub> que en presencia de hierro se transforma en OH<sup>-</sup>. Esta situación se da particularmente en los procesos inflamatorios. (Market y cols, 1984.)

La enzima xantina dehidrogenasa, está presente en los endotelios. Su función es la depuración de las xantinas que son productos del consumo del ATP, formando ácido úrico. La enzima como tal, se comporta como oxidante cuando sufre un cambio en su estructura molecular ante diversas noxas virando a la forma oxidasa.

### **Disfunción Endotelial**

Se define DE como la pérdida parcial o total de las funciones de las células endoteliales y se caracteriza por un desbalance entre los factores de relajación y contracción del endotelio (Egashira y cols, 1993, Anderson y cols. 2003).

La DE representa la pérdida de la capacidad del endotelio para modular el tono vascular y para inhibir los procesos de agregación plaquetaria, adherencia de neutrófilos y de proliferación celular.

La DE ha sido asociada a un gran número de patologías como: Diabetes, Hipertensión arterial (Li y cols, 1997), Hipercolesterolemia, Aterosclerosis

(Vanhoutte, 1991) e Insuficiencia Cardíaca (Kubo y cols, 1991; Buikema y cols, 1993; Ueno, 1994; Wang y cols, 1994; Vanhoutte, 1998)

La reducción de los factores relajantes dependientes del endotelio ha sido demostrada en arterias de diferentes modelos experimentales de hipertensión (Bell 1993; Boegehold 1993; Konishi y cols. 1993; Vanhoutte y cols. 1995). En concordancia con ello, se ha comprobado la reducción de la respuesta vasodilatadora a la ACh y otros vasodilatadores mediados por endotelio en pacientes hipertensos, (Linder y cols. 1990; Panza y cols. 1990; Panza y cols. 1993; Panza y cols. 1995; Taddei y cols. 1995; Higashi y cols. 1995; Kelm y cols. 1996; Li y cols. 1997) mientras que ello no ocurre por la acción de vasodilatadores exógenos independientes del endotelio.

La hipercolesterolemia inducida por dietas hipergrasas altera la relajación endotelio dependiente (Shimokawa y cols. 1989; Kolodgie y cols. 1990). En humanos con arteriosclerosis y/o hipercolesterolemia, las relajaciones endotelio-dependientes se hallan asimismo alteradas ( Fosterman y cols. 1988)

La DE ocurre en ausencia de engrosamiento de la íntima y puede constituir un evento patogénico precoz en la arteriosclerosis (Redy y cols. 1994), las respuestas anormales con la acetilcolina se hallan directamente ligadas a los factores de riesgo en la enfermedad coronaria.

## ***Vitis vinifera***

La vid es originaria de Asia menor, especialmente de la región del Mar Caspio. Luego fue introducida en Europa y más tarde en el resto de los continentes. Esta vitácea, materia prima del vino, despertó el interés científico desde que se reconociera la “paradoja francesa”, en la que se observó una menor frecuencia de accidentes cardiovasculares del pueblo francés respecto a otros pueblos del mundo desarrollado, manteniendo una dieta rica en grasas saturadas. Investigando en forma más exhaustiva, se pudo determinar que gran parte de la población francesa era consumidora de vino, lo cual llevó a pensar que en la vid existirían sustancias con determinadas cualidades protectoras.

El extracto seco de *Vitis vinifera*, es rico en flavonoides. Algunos de estos son las proantocianidinas, compuestos vasoactivos de comprobada actividad antioxidante (vease en Anexo) y antielastasa (Jonadet y cols. 1983; Meunier y cols. 1989). En ese sentido, han demostrado poseer propiedades captadoras de radicales superóxido, e hidroxilo e inhibidoras de la peroxidación lipídica, (Ozaki y cols 1990) de igual manera que lo hacen los antocianósidos de *Vaccinum myrtillus* y *Ribes nigrum* (Uchida y cols. 1987; Ozaki y cols. 1990; Maffei y cols. 1994), siendo más activas aún que los compuestos antioxidantes de G. Biloba, vitaminas E (1000 veces más), C (575% más eficaz), betacaroteno (575% más eficaz) y que los taninos condensados de *Cupressus sempervirens*. (Bagchi 1997; Alonso 1998).

Las proantocianidinas también son conocidos como taninos condensados o polímeros de catequina. Las proantocianidinas poseen una alta capacidad antioxidante, como capturador de radicales libres e inhibidor de la peroxidación

lipídica; también se ha demostrado que tiene propiedades hipotensoras (Andriambeloson y cols, 1997; Ajay y cols. 2003), angioprotectoras y vasorrelajadoras (Diebot y cols. 2001).

La principal fuente natural de proantocianidinas la constituye el orujo y el tegumento de las semillas de la uva negra (*Vitis vinifera*) aunque también se encuentra en un gran número de frutos y plantas de colores rojo, azul y púrpura (Mullins, 1992). Las proantocianidinas son las responsables de las propiedades astringentes de las frutas.

Éstas poseen una absorción oral incompleta, alcanzándose la concentración plasmática máxima a los 45 minutos, la vida media de dosis única es de 5 horas, sus metabolitos son excretados principalmente por el riñón, y un 45% de la dosis es eliminada intacta a través de las heces. Presentan un perfil de baja toxicidad y no se han descrito efectos colaterales.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### Objetivo General

Determinar la capacidad de prevención del extracto seco estandarizado de semilla de *Vitis vinifera* en la disfunción endotelial provocada por una alta concentración de glucosa, el cual fue administrado en anillos aórticos de ratas macho *Sprague Dawley*, mediante un procedimiento *in vitro*.

### Objetivo Específico

- Reproducir un modelo experimental *in vitro* de disfunción endotelial vascular provocada por una alta concentración de glucosa en anillos aórticos de rata macho *Sprague Dawley*.
- Determinar el efecto del extracto seco estandarizado de semilla de *Vitis vinífera*, en la disfunción endotelial vascular provocada por una alta concentración de glucosa en anillos aórticos de rata macho *Sprague Dawley*.
- Determinar si se previene la disfunción endotelial vascular provocada por una alta concentración de glucosa en presencia de un secuestrador de radicales libres, como es el dimetilsulfóxido, en anillos aórticos de rata macho *Sprague Dawley*.
- Determinar si se logra prevenir la disfunción endotelial vascular generada por una alta concentración de glucosa mediante indometacina, inhibidor de la COX-1, en anillos aórticos de rata macho *Sprague Dawley*.

## **Preguntas de Investigación**

*¿ Es prevenible la Disfunción Endotelial Vascular inducida in vitro en anillos aórticos de rata macho Sprague Dawley, por una alta concentración de glucosa, con la adición del extracto estandarizado de semilla de *Vitis vinifera*?*

## **Justificación**

En Chile como en el resto del mundo las enfermedades crónicas no trasmisibles, entre las que se cuentan los trastornos cardiovasculares, se encuadran dentro de las primeras causas de morbi-mortalidad. Actualmente se reconoce a la disfunción endotelial como una alteración que precede a la manifestación de patologías cardiovasculares. No obstante, también puede ser una consecuencia de gran diversidad de patologías que tienen en común una exacerbación del estrés oxidativo, tales como aterosclerosis, hipertensión, dislipidemia, envejecimiento y diabetes. Este tema es de vital importancia si consideramos que sólo en Chile en el año 2000 fallecieron 78.814 personas por enfermedades del sistema circulatorio, ocupando con un 27.9 %, el primer lugar de las defunciones por grupos de causas de muerte (Anuario de estadísticas vitales 2001)

Estos aspectos determinan la importancia de estudiar posibles alternativas que puedan conducir a una reversión temprana del proceso de disfunción endotelial, provocado por diversas causas. Diversos estudios preclínicos y clínicos han señalado que la disfunción endotelial puede ser revertida con antioxidantes como la vitamina C y E. En experimentos *in vitro* se estableció que el extracto estandarizado de semilla de *Vitis vinifera* (Torres y Vera 2003), rico en

polifenoles, es más eficiente que estas vitaminas como secuestrador de especies radicalarias derivadas del oxígeno, tales como el anión superóxido. Además se ha podido comprobar que este extracto resulta bastante eficaz en el control del estrés oxidativo en experimentos *in vivo* en animales sometidos a isquemia y reperusión.

## **TIPO DE ESTUDIO**

*Correlacional*

## **DISEÑO DE INVESTIGACION**

Experimental *in vitro*

## **HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN**

**H1:** el tratamiento con extracto seco estandarizado de semilla de *Vitis vinífera* (EVv) previene la aparición de disfunción endotelial vascular, provocada por glucosa 46 mM, en anillos aórticos de rata macho *Sprague Dawley*.

**HO<sub>1</sub>:** el tratamiento del EVv no previene la aparición de disfunción endotelial vascular, provocada por glucosa 46 mM en anillos aórticos de rata macho *Sprague Dawley*.

**H2:** el tratamiento del EVv previene en un 100% la aparición de la disfunción endotelial vascular, provocada por glucosa 46 mM, en anillos aórticos de rata macho *Sprague Dawley*.

## **VARIABLES**

### **1. Extracto seco estandarizado de *Vitis vinífera* (Variable independiente)**

#### **a) Definición Conceptual:**

Extracto seco liofilizado de semilla de *Vitis vinifera*, estandarizado por el Laboratorio Garden House S.A, a un 85% de proantocianidinas. (Diebolt y cols. 2001)

#### **b) Definición Operacional:**

Dosis necesaria para prevenir la disfunción endotelial, a una concentración de 5.35 ng/ml de extracto seco de *Vitis vinifera*, durante 20 minutos.

### **2. Disfunción Endotelial (Variable Dependiente)**

#### **a) Definición Conceptual:**

Desbalance en los factores de relajación y contracción derivados del endotelio; alteración en la función del endotelio, modificación de la relajación vascular. Disfunción vascular endotelial. (Scalbert y cols. 2000)

#### **b) Definición Operacional:**

Cuantificación de la relajación vascular en respuesta a dosis crecientes de acetilcolina, medido en preparaciones de anillos de aorta torácica aislada de rata,

previamente contraídas con fenilefrina. Uso de instrumento: polígrafo Grass (modelos 7D y 5D).

## **2. Desconcertantes:**

- a) Variación interindividual de las ratas *Sprague-Dawley*.
- b) Variación inter-ejecutor de la manipulación del experimento.
- c) Variación de la respuesta de relajación en función del tiempo.

Las variables desconcertantes fueron controladas respectivamente con: una contracción y relajación inicial, que permitió verificar el estado normal de las aortas, con la asignación de funciones específicas durante los experimentos, y por ultimo con el grupo control.

## MATERIALES Y METODOS

### ANIMALES

Se utilizaron 12 ratas macho de la cepa *Sprague Dawley*, con un peso promedio de 311,4 g (280 g – 330 g). Las ratas se adquirieron en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Las condiciones estándares de manejo de animales de experimentación, mantenidas con alimentación normal y agua *ad libitum*, bajo las normas internacionales dadas por la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicada por el National Institute of Health (publicación 85-23, revisión 1985).

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 5 grupos, a las cuales se les extrajo la aorta torácica y se obtuvieron anillos aórticos de éstas, los que fueron tratados *in vitro*, como se describe a continuación.

Se realizó un **grupo control**, el cual tiene por objetivo avalar el procedimiento a seguir en el experimento, actuando como un instrumento de validez interna.

#### Grupos experimentales:

##### 1. GRUPO 1 o Glucosa 46mM (n=8):

1. **Control:** Contracción con fenilefrina (FE) 1 $\mu$ M y relajación con alícuotas a concentraciones crecientes (1x10<sup>-8</sup> M a 1x10<sup>-4</sup> M) de ACh.

2. **Tratado:** Incubación con KHm conteniendo Glucosa 46mM por 60 minutos, renovando la solución cada 15 minutos; se realiza una contracción con FE 1 $\mu$ M y se procedió a relajar con concentraciones crecientes (1x10<sup>-8</sup> M a 1x10<sup>-4</sup> M) de ACh.
- 
2. **GRUPO 2 o Tratado con EVv y Glucosa 46mM (n=9):**
    1. **Control:** Contracción con FE 1 $\mu$ M y relajación con alícuotas a concentraciones crecientes (1x10<sup>-8</sup> M a 1x10<sup>-4</sup> M) de acetilcolina (ACh).
    2. **Tratado:** Incubación por 20 minutos con 5.35 ng/ml de extracto seco estandarizado de Vitis vinífera, adicionado al KHm conteniendo Glucosa 46mM por 60 minutos, renovando la solución cada 15 minutos; se realizó una contracción con FE 1 $\mu$ M y se procedió a relajar con concentraciones crecientes (1x10<sup>-8</sup> M a 1x10<sup>-4</sup> M) de ACh.
- 
3. **GRUPO 3 o tratado con DMSo y glucosa 46mM (n=3):**
    1. **Control:** Contracción con FE 1 $\mu$ M y relajación con alícuotas a concentraciones crecientes (1x10<sup>-8</sup> M a 1x10<sup>-4</sup> M) de acetilcolina (ACh).
    2. **Tratado:** Incubación con DMSo 100mM junto con KHm a una concentración de 46mM de Glucosa por 60 minutos; manteniendo las mismas concentraciones de DMSo y Glucosa, se realizó la contracción con FE 1 $\mu$ M y relajación adicionando alícuotas sucesivas para lograr en el baño concentraciones crecientes (1x10<sup>-8</sup> M a 1x10<sup>-4</sup> M) de ACh.

**4. GRUPO 4 o o tratado con Indometacina y glucosa 46mM (n=6):**

1. **Control:** Contracción con FE 1 $\mu$ M y relajación con la adición sucesiva de alícuotas para alcanzar en el baño concentraciones crecientes (1x10<sup>-8</sup> M a 1x10<sup>-4</sup> M) de ACh.
2. **Tratado:** Incubación con Indometacina (10 $\mu$ M) junto con una concentración de 46mM de Glucosa por 60 minutos; manteniendo las mismas concentraciones de Indometacina y Glucosa, se realizó la contracción con FE 1 $\mu$ M y relajación con alícuotas sucesivas para alcanzar en el baño concentraciones crecientes (1x10<sup>-8</sup> M a 1x10<sup>-4</sup> M) de ACh.

**INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE HIPERGLICEMIA:**

La inducción de la alta concentración de glucosa experimental se realizó mediante el método descrito por Tesfamariam y *cols.*, 1990 y por Cosentino y *cols.* 2003. Se aumentó 4 veces la concentración normal de glucosa en el KHm (46mM), manteniéndose en los baños durante 60 minutos y durante la contracción y relajación de la aorta.

Se determinó la disfunción endotelial a través del polígrafo Grass (modelos 7D y 5D), método implementado por Morales y *cols.* 1998; el cual consiste en realizar eutanasia a las ratas, para obtener la aorta y realizar la preparación de los segmentos de aorta, midiendo la funcionalidad endotelial en el polígrafo del laboratorio de Farmacología.

## **TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO**

Posterior a la ejecución del grupo 1, se realizó en el grupo experimental 2 la EVv (5,35 ng/ml), agregando 10 ml de KHm con una concentración de glucosa normal (11,5mM), más los 100µl de EVv en cada baño por 20 minutos previos a la exposición de concentraciones altas de glucosa (46mM) e inmediatamente después la relajación.

El extracto seco estandarizado de *Vitis vinifera* fue disuelto en agua destilada, que se preparó momentos antes de su administración. Al grupo control se le administró en el baño 10 ml de KHm con una glucosa normal y se les agregó 100µl de EVv (Torres y Vera 2003).

El grupo experimental 3 se incubó con DMSO a 100 µM junto con KHm con glucosa 46 mM, para ésto se extrajo 71 µl del frasco a temperatura ambiente, agregándolo directo al baño de los anillos aórticos (Peters y cols.2000)

En el grupo experimental 4 se realizó un procedimiento similar al anterior, donde se incubó con Indometacina 10 µM junto con KHm alto en glucosa (46mM). La Indometacina se disolvió en etanol absoluto una concentración de 40 µM y se extrajo 50 µl de la solución para agregarlo al baño de los anillos aórticos (Cordero 1996).

## **DETERMINACIÓN DEL GRADO DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL**

La relajación inducida por ACh en los anillos aórticos de los grupos experimentales 1, 2, 3 y 4 fue comparada con los valores de relajación obtenidos en los anillos aórticos de los grupos controles respectivos, expresados como

porcentaje respecto de la contracción máxima alcanzada con FE (1 $\mu$ M.). La alteración significativa ( $p < 0.001$ ) de la respuesta máxima control fue definida como disfunción endotelial.

El grado de disfunción endotelial se determinó a la concentración de ACh, que indujo la máxima relajación en los anillos aórticos del grupo control y se expresó como el valor porcentual de la diferencia entre la relajación máxima observada en el grupo tratado en relación a su respectivo grupo control.

### **OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS SEGMENTOS DE AORTA**

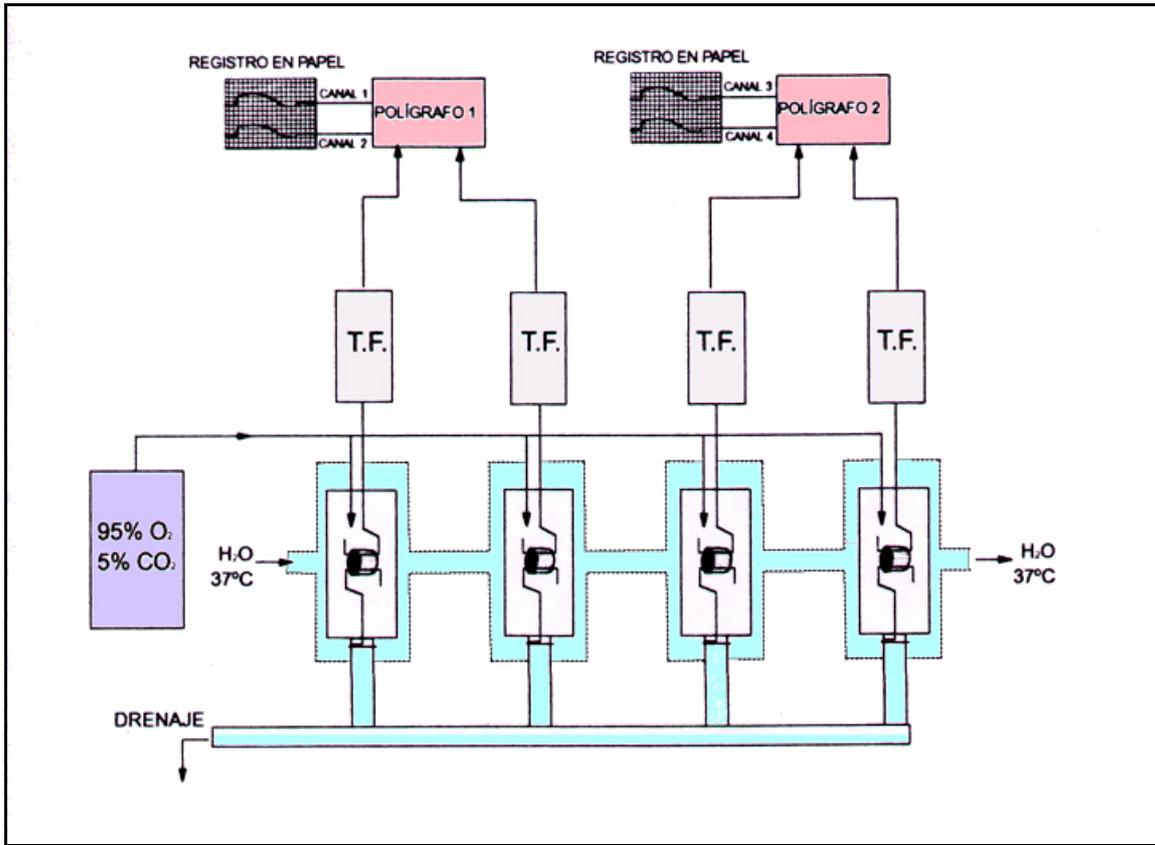
Las ratas de todos los grupos experimentales se sacrificaron con una sobredosis de halotano (Zeneca Laboratories, Inglaterra), se les realizó neumotórax con el fin de extraer un segmento de aorta torácica, se limpió el trozo de aorta del tejido graso, conectivo y restos de sangre coagulada, cuidando de no dañar el tejido endotelial (Morales y cols. 1998); el trozo de aorta se lavó en solución KHm a 37°C.

Del segmento inmediatamente inferior al cayado aórtico, se cortaron cuatro anillos de una longitud aproximada de 2 a 3 mm. Dos ganchos de acero inoxidable, atados cada uno a un hilo de seda de 15 cm de longitud, fueron introducidos a través del lumen de cada anillo aórtico y éstos se colocaron en el interior de baños de vidrio de doble pared llenos con 10 ml de solución KHm, termorregulados a 37,0°C  $\pm$  0,5°C° mediante un baño de recirculación (Lauda Thermo-Temp) y constantemente burbujeados con carbógeno (95% H<sub>2</sub>O y 5% CO<sub>2</sub>). Los anillos aórticos se fijaron mediante el hilo de sus ganchos, uno al fondo

del baño y, el otro, a un transductor de fuerza Grass FT-03, conectados a polígrafos Grass (modelos 7D y 5D) para la determinación de la contracción isométrica. (Figura 1, Apéndice 1)

Los anillos aórticos fueron sometidos a una tensión basal de 1,5 g y se estabilizaron en solución KHm por un período de una hora (*estabilización*), cambiando la solución cada 15 minutos para evitar la acumulación de metabolitos.

Tanto las contracciones como las relajaciones inducidas en los anillos aórticos, fueron expresadas como porcentaje de relajación respecto de la contracción máxima inducida por FE, estandarizado al peso seco de la aorta ensayada. Los valores absolutos de contracción se expresaron en unidades miliNewton, mN.



**Figura 1:** Esquema del sistema utilizado para el montaje de los anillos aórticos y el registro de su contracción y relajación.

**T.F.** : Transductor de Fuerza FT 03

**Polígrafo1** : Grass 5D

**Polígrafo 2** : Grass 7D

## **CONTRACCIÓN CON FE**

Después del período de estabilización, los anillos aórticos fueron contraídos con 1  $\mu\text{M}$  FE hasta alcanzar una contracción máxima estable, o de meseta, para luego relajarlos, lavando el tejido con solución KHm a 37°C.

Este procedimiento de contracción-relajación se repitió de tres a cuatro veces, hasta lograr una respuesta contráctil máxima estable. Después de un tiempo de recuperación de 20 a 30 minutos entre cada ciclo y, una vez alcanzada la respuesta contráctil máxima estable, los anillos aórticos estuvieron en condiciones para realizar el protocolo de relajación con ACh, como se describe a continuación.

Los anillos aórticos que se consideraron en el estudio sólo fueron los que superaron una contracción mínima de 4,9mN, equivalentes a un desplazamiento de 9,5 mm en el papel de inscripción poligráfica.

## **RELAJACIÓN INDUCIDA POR ACH**

Para la obtención de gráficos concentración de ACh versus relajación, a los anillos aórticos precontraídos con FE 1 $\mu\text{M}$  y estabilizados en 10 mL de KHm, se les adicionó sucesivamente alícuotas de concentraciones crecientes de ACh para alcanzar en el baño un rango de  $1 \times 10^{-8}$  M a  $1 \times 10^{-4}$  M. Las alícuotas fueron calculadas considerando la corrección de volumen por la adición anterior.

## **DETERMINACIÓN DE DOSIS DE EXTRACTO DE VITIS VINIFERA**

Se utilizó como referencia la dosis determinada en la tesis Torres y Vera, 2003, de 5,35 ng/ml, concentración de EVv que no indujera una relajación *per se* mayor a un 10 %.

## **SOLUCIONES, SALES Y FÁRMACOS**

La composición de la solución KHm fue la siguiente (en mM): NaCl 122; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O 2,0; MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 15,5; EDTA 0,021; Glucosa 11,5. La solución se preparó en agua destilada, equilibrada por 15 minutos con carbógeno (95% H<sub>2</sub>O y 5% CO<sub>2</sub>; AGA Gases Médicos, Santiago, Chile) y ajustada a pH 7,40 ± 0,10 con HCl al 10% (v/v) o con NaOH 0,1N.

Las sales necesarias para la preparación de la solución KHm y las soluciones requeridas para ajustar el pH, fueron de grado analítico con al menos 99,5% de pureza. Se utilizó (*L*)-fenilefrina, acetilcolina-HCl (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo, USA).

El extracto seco estandarizado de semilla de *Vitis vinífera* (IH636), con 85% proantocianidinas (polifenoles) p/p (0,8 mg de polifenoles por miligramo de extracto seco), fue gentilmente donado por Laboratorios Garden House S.A., Santiago, Chile.

Todos los compuestos fueron disueltos en agua destilada para administración en los baños, en solución KHm, pH 7,40 a 37°C, para su adición al baño de órgano.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los resultados son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) para todas las mediciones obtenidas de los 5 grupos experimentales. Se realizó el test estadístico *t* de Student, para analizar las diferencias entre controles y tratados. Se fijó el nivel de confianza en al menos 95% ( $p < 0,001$ ). (Tabla 1, 2, 3 y 4)

## RESULTADOS

La respuesta contráctil y relajación de anillos aórticos representativas del grupo control, grupo 1 (glucosa 46mM) y grupo 2 (EVv), se observa en la figura 2. Las curvas se caracterizaron por tener una contracción de fase ascendente rápida continuada de una fase de evolución temporal más lenta hasta alcanzar una contracción máxima estable (CME) o de meseta.

### Control

En el grupo control, la primera y la segunda relajación fueron dependientes de la concentración de ACh y no se apreciaron diferencias significativas que reflejara un cambio dependiente en el tiempo de aplicación de ambos protocolos de relajación. El máximo de relajación promedio observado fue de  $97.72 \% \pm 1.19\%$ . La CME de los grupos controles fue de  $9,86 \text{ mN} \pm 2,72 \text{ mN}$ , con un  $n=9$ . (Apéndice 2, registros poligráficos representativos de grupo Control, tratado con glucosa 46mM y tratado con EVv y glucosa 46mM)

### Efecto KHm-glucosa 46mM sobre la relajación de anillos aórticos

Los registros obtenidos de los anillos aórticos incubados con KHm glucosa (46 mM), evidenciaron una alteración de la relajación inducida por ACh y dependiente de endotelio. Como se observa en la Tabla 1 y en el gráfico I, tras 60 minutos de exposición a KHm glucosa 46mM, se indujo un significativo ( $P<0,001$ ) desplazamiento con respecto a la curva control de la primera relajación, alcanzando una relajación máxima de  $46.31\% \pm 3.13\%$ , que equivale a una

disminución en 49.93% respecto al grupo control (n=6). Las curvas observadas son concentración-dependientes y de tipo sigmoideas.

#### **Desarrollo de contracción en anillos aórticos KHm-glucosa 46mM**

Como resultado de la incubación con Glucosa 46 mM, no se observaron cambios en las contracciones máximas inducidas por FE 1 $\mu$ M.

#### **Efecto de EVv sobre los anillos aórticos incubados con KHm-Glucosa 46mM**

Los valores de relajación obtenidos en el grupo 2 (Glucosa 46mM + EVv) alcanzaron un máximo de 94,89%  $\pm$  2,6%. No se apreciaron diferencias significativas (P<0,001) en los valores de relajación del grupo 2 con respecto a su control (Tabla 2, Gráfico II).

#### **Efecto de DMSo sobre los anillos aórticos incubados con KHm a una concentración alta en Glucosa (46mM)**

Los registros obtenidos del Grupo experimental 3 (Glucosa 46mM + DMSo), muestran que en presencia de DMSo la relajación de los anillos aórticos inducida por ACh fue de 100% (Tabla 3 y grafico III).

#### **Efecto de Indometacina sobre los anillos aórticos incubados con KHm-glucosa (46mM)**

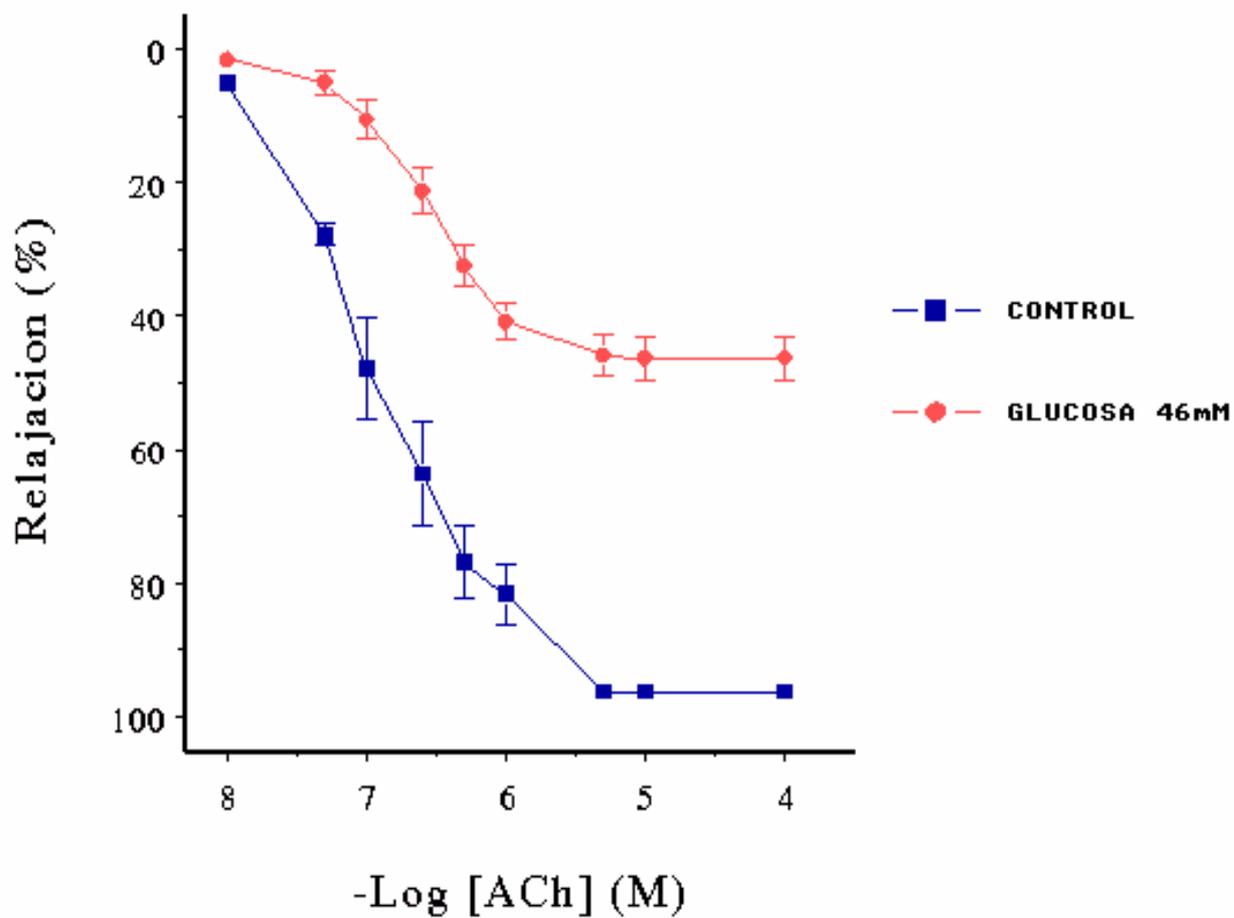
Los anillos aórticos del grupo 4 mostraron que no existió diferencia significativa (P<0.001) entre el estudio experimental y su control, los cuales

llegaron a valores máximos de relajación de 89.36% + 2.835%, lo cual se puede observar en la Tabla 4 y gráfico IV.

**Tabla 1:** Efecto de Glucosa 46mM sobre la relajación de anillos aórticos inducida por acetilcolina. Valores corresponden al promedio de la relajación (%)  $\pm$  EEM, n=8, tanto para el control como para el tratado con glucosa 46mM.

Ach [M]	Control (11,5 mM)	Glucosa (46mM)	% DE	P
$1 \times 10^{-8}$	5,15 $\pm$ 1,22	1,43 $\pm$ 1,22	72,23 %	
$5 \times 10^{-8}$	27,80 $\pm$ 1,67	4,94 $\pm$ 1,76	82,23 %	
$1 \times 10^{-7}$	47,78 $\pm$ 7,58	10,45 $\pm$ 2,88	78,13 %	
$2,5 \times 10^{-7}$	63,58 $\pm$ 7,69	21,22 $\pm$ 3,55	66,62 %	*
$5 \times 10^{-7}$	76,86 $\pm$ 5,37	32,29 $\pm$ 3,01	57,99 %	*
$1 \times 10^{-6}$	81,61 $\pm$ 4,54	40,81 $\pm$ 2,70	50,00 %	*
$5 \times 10^{-6}$	96,24 $\pm$ 1,34	45,77 $\pm$ 3,19	47,56 %	*
$1 \times 10^{-5}$	94,24 $\pm$ 1,34	46,31 $\pm$ 3,13	49,14 %	*
$1 \times 10^{-4}$	94,24 $\pm$ 1,34	46,31 $\pm$ 3,13	49,14 %	*
$1 \times 10^{-5}$	94,24 $\pm$ 1,34	46,31 $\pm$ 3,13	49,14 %	*

**\* = P < 0,001**

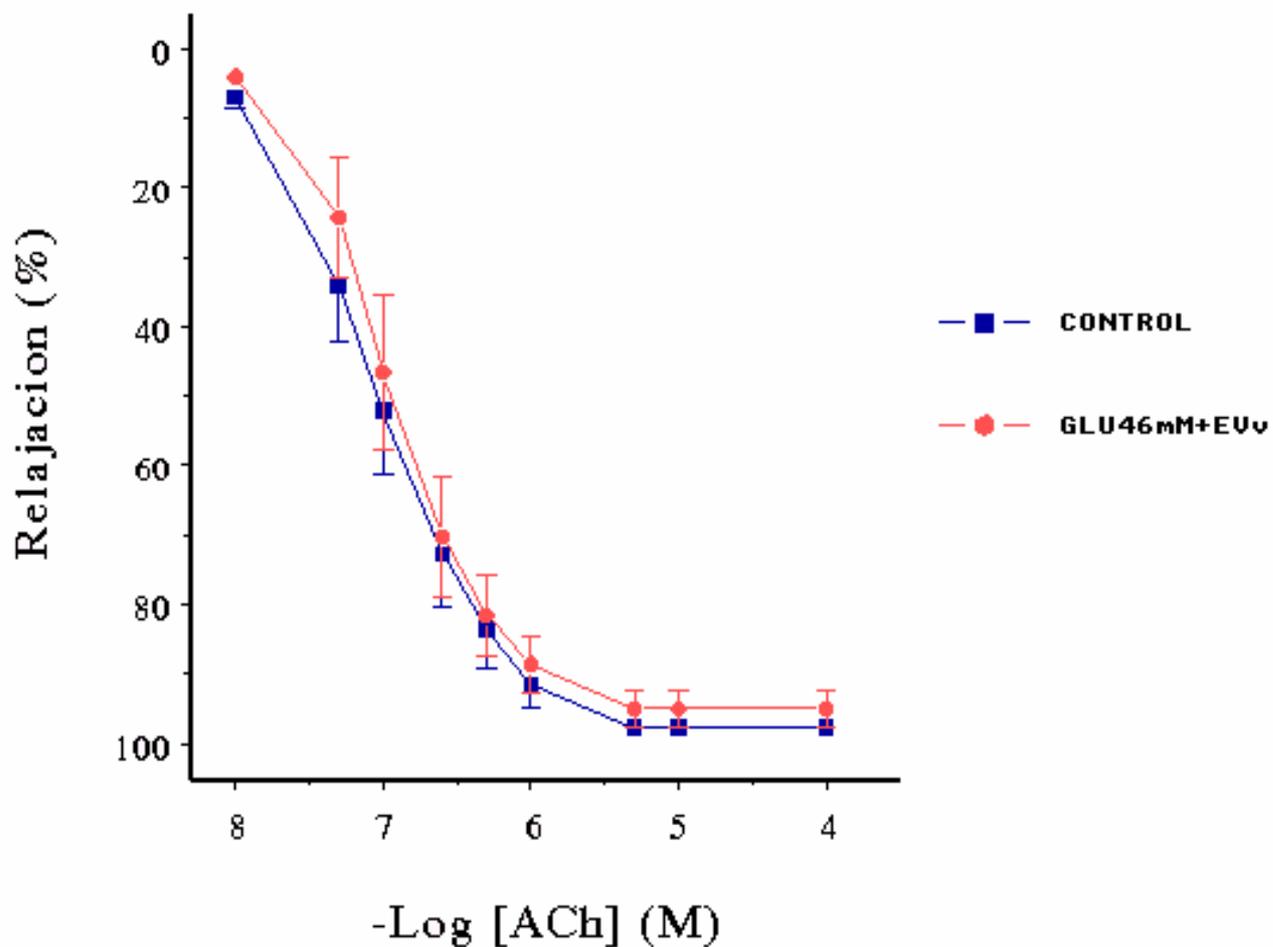


**GRAFICO I:** Curva de relajación inducida por acetilcolina en presencia de KHM a glucosa 46mM con respecto a su control. Los valores son expresados en porcentajes de relajación  $\pm$  EEM, n=8

**Tabla 2:** Efecto de Glucosa 46mM previa incubación con Evv (5,35 mg/ml) sobre la relajación de anillos aórticos inducida por acetilcolina. Valores corresponden al promedio de la relajación (%)  $\pm$  EEM, n=9 tanto para el control como para el tratado con Evv (5.35 mg/ml) + glucosa 46mM.

Ach [M]	Control (11,5 mM)	EVv + Glucosa (46mM)	P
$1 \times 10^{-8}$	7,04 + 1,55	4,05 + 1,35	+
$5 \times 10^{-8}$	34,03 $\pm$ 8,21	24,31 $\pm$ 8,68	+
$1 \times 10^{-7}$	52,18 + 9,16	46,62 + 11,19	+
$2,5 \times 10^{-7}$	72,78 + 7,69	70,24 + 8,79	+
$5 \times 10^{-7}$	83,63 $\pm$ 5,47	81,52 $\pm$ 5,87	+
$1 \times 10^{-6}$	91,58 $\pm$ 3,39	88,58 $\pm$ 4,17	+
$5 \times 10^{-6}$	97,71 + 1,19	94,89 + 2,61	+
$1 \times 10^{-5}$	97,71 $\pm$ 1,19	94,89 $\pm$ 2,61	+
$1 \times 10^{-4}$	97,71 $\pm$ 1,19	94,89 $\pm$ 2,61	+
$1 \times 10^{-5}$	97,71 $\pm$ 1,19	94,89 $\pm$ 2,61	+

**\* = P < 0,001, + = no significativo**

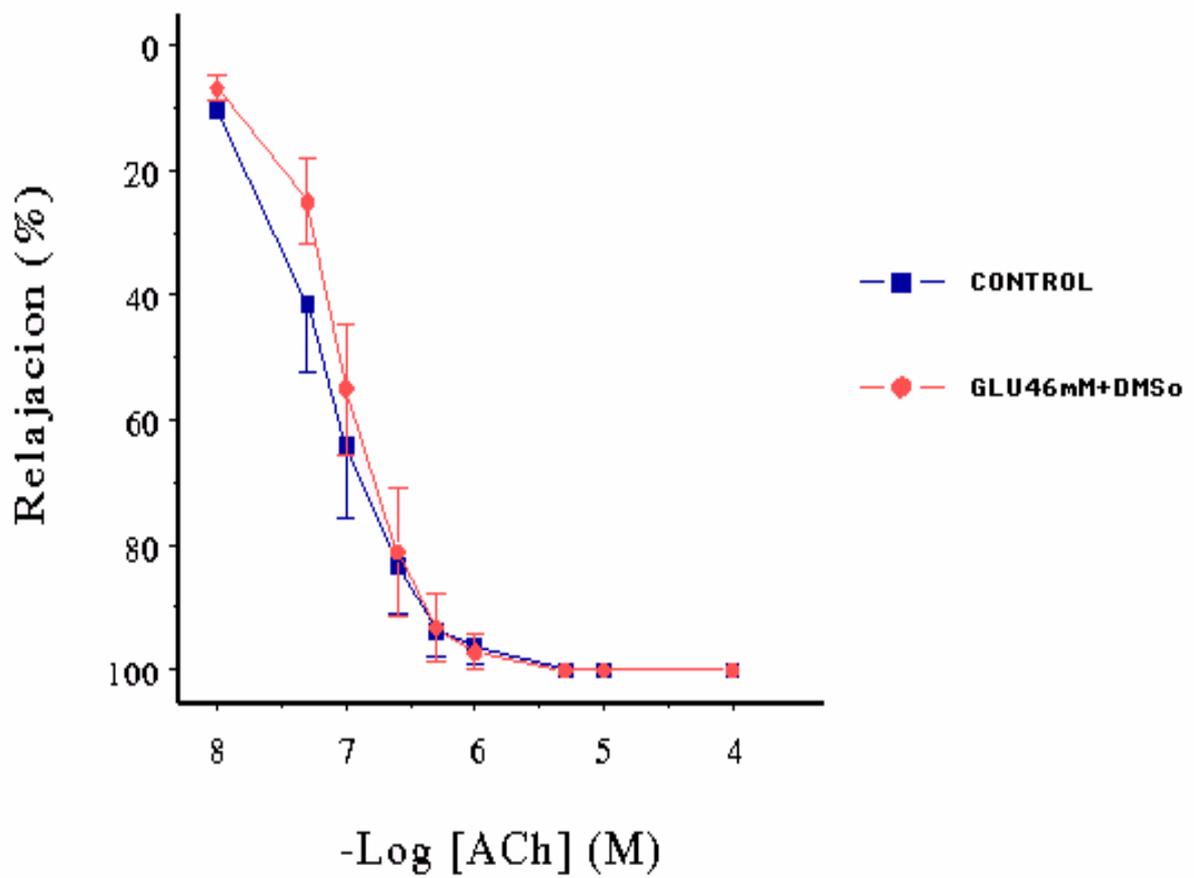


**GRAFICO II:** Curva de relajación inducida por acetilcolina en presencia de KHM a glucosa 46mM previamente incubado con Evv (5,35 mg/ml), con respecto a su control. Los valores son expresados en porcentajes de relajación  $\pm$  EEM, n=9

**Tabla 3:** Efecto de Glucosa 46mM en presencia de DMSo sobre la relajación de anillos aórticos inducida por acetilcolina. Valores corresponden al promedio de la relajación (%)  $\pm$  EEM, n=3 tanto para el control como para el tratado con DMSo + glucosa 46mM.

Ach [M]	Control (11,5 mM)	Glucosa (46mM) + DMSo	P
$1 \times 10^{-8}$	10,53 + 1,019	6,82 + 2,15	+
$5 \times 10^{-8}$	41,46 + 10,86	25,03 + 6,93	+
$1 \times 10^{-7}$	63,91 + 11,81	55,05 + 10,57	+
$2,5 \times 10^{-7}$	83,28 $\pm$ 7,57	81,15 $\pm$ 10,17	+
$5 \times 10^{-7}$	93,79 + 3,98	93,37 + 5,43	+
$1 \times 10^{-6}$	96,14 $\pm$ 2,71	97,1 $\pm$ 2,9	+
$5 \times 10^{-6}$	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	+
$1 \times 10^{-5}$	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	+
$1 \times 10^{-4}$	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	+
$1 \times 10^{-5}$	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	+

**\* = P < 0,001, + = no significativo**

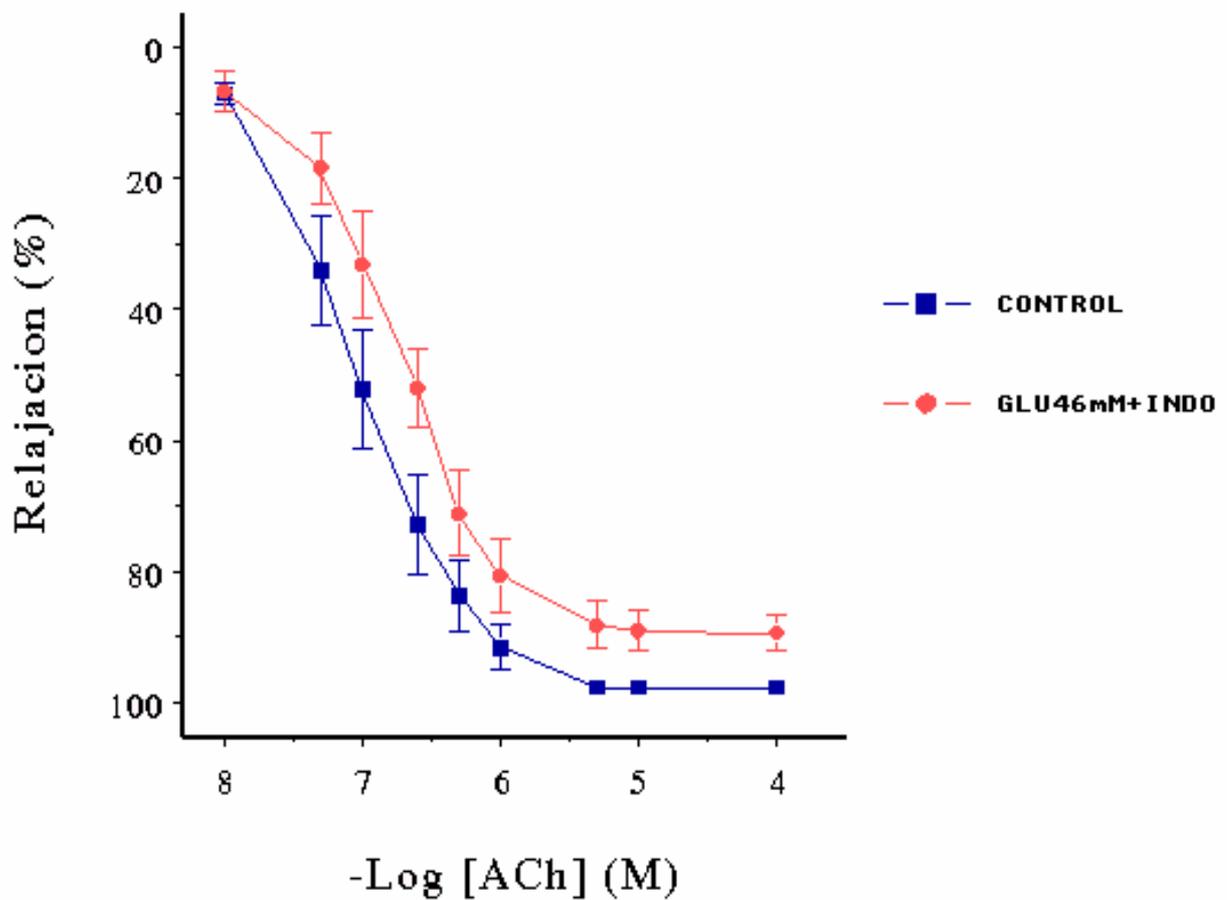


**GRAFICO III:** Curva de relajación inducida por acetilcolina en presencia de KHm a glucosa 46mM + DMSO, con respecto a su control. Los valores son expresados en porcentajes de relajación  $\pm$  EEM, n=3

**Tabla 4:** Efecto de Glucosa 46mM en presencia de Indometacina sobre la relajación de anillos aórticos inducida por acetilcolina. Valores corresponden al promedio de la relajación (%)  $\pm$  EEM, n=6 tanto para el control como para el tratado con Indometacina + glucosa 46mM.

Ach [M]	Control (11,5 mM)	Glucosa (46mM) + INDO	P
$1 \times 10^{-8}$	7,86 + 1,55	6,68 + 3,21	+
$5 \times 10^{-8}$	34,03 $\pm$ 8,21	18,38 $\pm$ 5,49	+
$1 \times 10^{-7}$	52,18 + 9,19	33,06 + 8,07	+
$2,5 \times 10^{-7}$	72,78 + 7,69	51,84 + 5,99	+
$5 \times 10^{-7}$	83,64 $\pm$ 5,47	71,13 $\pm$ 6,57	+
$1 \times 10^{-6}$	91,59 $\pm$ 3,393	80,56 $\pm$ 5,67	+
$5 \times 10^{-6}$	97,72 $\pm$ 1,19	88,11 $\pm$ 3,61	+
$1 \times 10^{-5}$	97,72 $\pm$ 1,19	89,05 $\pm$ 3,15	+
$1 \times 10^{-4}$	97,72 $\pm$ 1,19	89,36 $\pm$ 2,84	+
$1 \times 10^{-5}$	97,72 $\pm$ 1,19	89,36 $\pm$ 2,84	+

**\* = P < 0,001, + = no significativo**

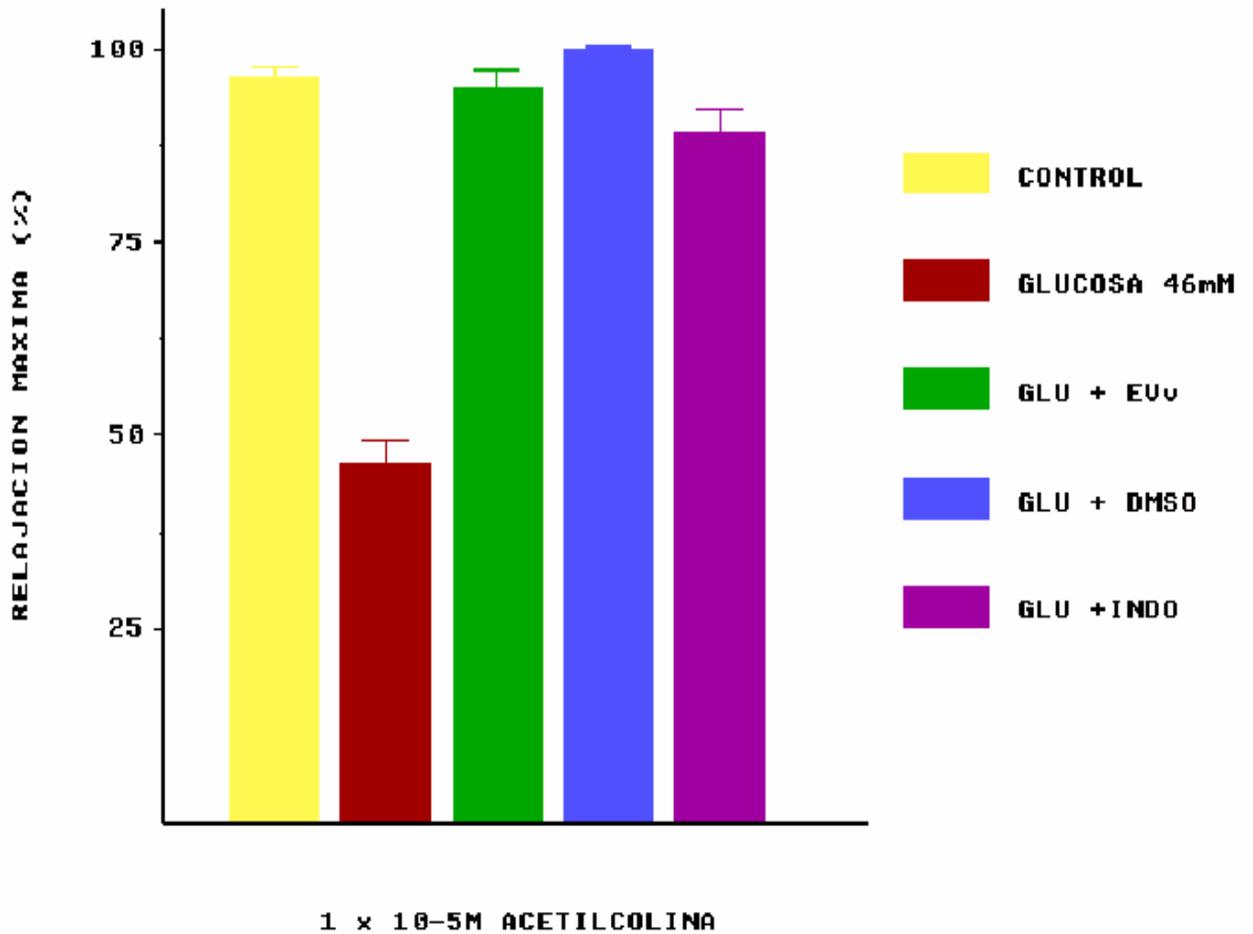


**GRAFICO IV:** Curva de relajación inducida por acetilcolina en presencia de KHM a glucosa 46mM + Indometacina, con respecto a su control. Los valores son expresados en porcentajes de relajación  $\pm$  EEM, n=6

### **Comparación entre grupos experimentales**

Al comparar los grupos que fueron tratados con KHm glucosa 46mM, se puede apreciar la diferencia significativa del grupo Glucosa 46mM con respecto a los tres grupos restantes a los que se les agregó EVv, DMSO e Indometacina respectivamente.

Se destaca en la comparación de los grupos 2, 3 y 4 que no existió diferencia significativa entre ellos, llegando a la conclusión que no se produjo DE en estos grupos, lo que demostró la prevención total de DE del EVv, DMSO e Indometacina. (Gráfico V)



**GRÁFICO V:** Relajaciones máximas observadas en presencia de EVv, DMSO e Indometacina en anillos aórticos tratados con glucosa 46mM.

## DISCUSIÓN

Al reproducir un modelo experimental que induce la DE, evaluamos la capacidad de prevención del EVv sobre la DE inducida por concentraciones altas de glucosa.

Se puede apreciar una alteración en la respuesta relajadora del endotelio, presentando una disminución significativa (49,93%) en la respuesta del efecto máximo (eficacia) inducida por ACh (grafico V),similar a lo obtenida por Tesfamariam y cols. 1990, en ambos trabajos se utilizó una concentración de glucosa cuatro veces más alta de lo normal, aunque en nuestro caso, para obtener dicha respuesta fue necesaria una hora de incubación, a diferencia de Tesfamariam que incubó durante 6 horas. Esta diferencia pudo deberse a los animales de experimentación utilizados, que en el caso de Tesfamariam fueron conejos.

En este estudio agudo de exposición a concentraciones altas de glucosa, el EVv logró prevenir parcialmente la DE, no encontrándose diferencia significativa en toda la curva de relajación, respecto al control, después de haber administrado EVv al baño e incubado con glucosa 46mM (tabla 2, gráfico II). El EVv también fue capaz de revertir en un 40% la DE generada por diabetes tipo I en ratas aloxanizadas en un modelo experimental *in vivo* (Muñoz, 2002). En ambos casos el factor común de la disfunción endotelial fue el aumento de la concentración de glucosa. (GráficoV)

Los niveles altos de glucosa son sin duda el rasgo metabólico característico de la diabetes Mellitus, además de considerarse el factor patogénico desencadenante de las alteraciones multisistémicas que provoca esta patología (Lorenzi y *cols*, 1986; Inoguchi y *cols*, 2003).

Si bien, no es del alcance de este diseño experimental determinar el mecanismo por el cual se produjo la DE, es probable que el papel de los RL y en especial de los ROS, sea preponderante. Para estudiar lo anterior, se realizó un experimento con DMSO, reconocido capturador de RL (Peters y *cols*, 2000), logrando prevenir completamente la DE (tabla 3 y gráfico III). Esto nos indicó que la producción de RL estaría implicada en la inducción de DE por alta glucosa, como lo refiere la bibliografía actual (Triana, 2001; Inoguchi y *cols*, 2003)

La disminución de los cofactores NADPH y THB podría inhibir la formación de NO en el endotelio, lo que explicaría la disminución de la relajación endotelio dependiente.

La tercera vía propuesta como generadora de daño endotelial vascular por alta glucosa son los AGEs; la glicosilación afecta la función de proteínas celulares, especialmente en la membrana de la célula endotelial, sin embargo la generación de los productos de glicosilación avanzada corresponde a un proceso lento en respuesta a la exposición crónica a niveles elevados de glucosa (Triana, 2001), lo que no correspondió al modelo agudo utilizado en este diseño experimental, por lo que se apoya aún más el rol de los RL en un modelo de producción aguda de DE, donde la vías PKC-DAG y sorbitol serían los principales generadores de ROS.

Además de los mecanismos propuestos, se postula que altas concentraciones de glucosa activan la vía de la COX (Tesfamariam y cols, 1990) con el consecuente aumento de factores contráctiles derivados de esta vía, como prostaglandinas y tromboxano A<sub>2</sub>. Por este motivo se realizó un cuarto experimento que consistió en inhibir esta vía mediante Indometacina, inhibidor específico de la COX-1, derivando en una respuesta de relajación endotelio dependiente sin diferencia significativa respecto al control (tabla 4, gráfico IV y V), coincidiendo nuestros resultados con los descritos en la literatura. De lo que se deduce que la DE por niveles elevados de glucosa fue provocada, al menos por dos mecanismos distintos: la vía de la COX y la generación de ROS.

Podemos concluir que existe más de una vía implicada en la DE provocada por la alta concentración de glucosa en estado agudo *in vitro*.

El mecanismo de acción de EVv no se ha dilucidado aún y parece ser multifactorial (Morales y cols, 2003) entre los posibles mecanismos se describe: Potente capturador de RL (Ozaki y cols 1990) y relajador *per se*, por efecto inhibidor del gen para la transcripción (Corder y cols, 2001). Nuestro diseño experimental no permitió discriminar un mecanismo de acción específico, sin embargo, nuestros resultados con DMSO (Gráfico V) nos permite especular que el secuestro de RL estaría involucrada, esto es ampliamente aceptado y hay cada vez mas literatura que lo respalda (Cosentino y cols., 2003) aunque no se podrían excluir otros mecanismos.

Cabe destacar que en este modelo se midió el grado de DE en función de la respuesta relajadora endotelio dependiente, por lo tanto no sabemos si otras de las importantes funciones del endotelio se encuentran alteradas, aunque es

esperable. Este hecho es relevante ya que la alteración de la función endotelial es considerada actualmente la causa principal de la ateromatosis, lo que desencadena dos enfermedades de alto impacto en nuestra sociedad: los accidentes vasculares encefálicos, patología que esta en aumento y asociada a un alto índice de discapacidad; e infartos agudos al miocardio, primera causa de muerte en Chile (Anuario de estadísticas vitales, 2001, INE).

## CONCLUSIONES

Los niveles altos de glucosa durante 60 minutos *in vitro* produjeron una disfunción endotelial de 49.93%.

El extracto seco estandarizado de semilla de *Vitis vinifera* previno la disfunción endotelial inducida por niveles elevados de glucosa (46mM).

## **PROYECCIONES**

En la actualidad, los fitofármacos adquieren cada día más importancia, es por eso la necesidad de seguir desarrollando investigaciones para perfeccionar y aumentar los conocimientos acerca de la terapéutica que emplea estos fármacos.

Nuestro trabajo ha dado pautas que permiten orientar la realización de estudios clínicos, lo que podría conducir a terapias combinadas entre fármacos o al uso de éstos como coadyuvantes.

Dado que la disfunción endotelial es la base de las patologías cardiovasculares, este tipo de terapia surge como una nueva alternativa para actuar como un complemento para programas de rehabilitación cardiovascular y como una herramienta farmacológica capaz de mejorar la calidad de vida de las personas que padezcan algunos de los factores de riesgo de disfunción endotelial.

## Bibliografía

1. **Acuña V, Zubiaguirre MC.** 2002. Determinación de la capacidad del extracto liofilizado de *Mangifera indica* en la protección *in vitro* de la alteración vascular inducida por estrés oxidativo en aortas de rata. Tesis de Grado al título profesional de Licenciado de Kinesiología, Escuela de Kinesiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
2. **Ajay M, Gilani AH, Mustafa MR.** 2003. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences* 74(4): 603-612.
3. **Alonso J.** 1998. Tratado de Fitomedicina, Bases Clínicas y Farmacológicas. ISIS ediciones SRL, Buenos Aires.
4. **Anderson T, Buchanan M, Verma S.** 2003. Endotelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. *Circulation*, 108: 2054-2059.
5. **Andriambelason E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Astoclet JC, Andriantsitohaina R.** 1997. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 120: 1053-1058.
6. **Bagchi D.** 1997. Oxygen free radical scavenging abilities of Activin, a grape seed proanthocyanidin extract and vitamins C and E in vitro. *Res. Corm. Molec. Pathol. and Pharmacology* 95 (2): 17989.
7. **Baynes JW.** 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405–412.

8. **Bell D.** 1993. Vascular smooth muscle responses to endothelial autocooids in rats with chronic coarctation hypertension. *J Hypertens.* 11: 65-74.
9. **Bieirwaltes W.** 1994. Nitric oxide participates in calcium-mediated regulation of renin release. *Hypertension* 23 (suppl 1): 140-144
10. **Boegehold M.** 1993. Enhanced arteriolar vasomotion in rats with chronic salt-induced hypertension. *Microvasc Res.* 45: 83-94.
11. **Bohm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Krok A.** 1998. Flavonols, Flavone and anthocyanins as natural antioxidants of foods and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Ernahrungswiss,* 2:147-63.
12. **Boulanger C, Lüscher T.** 1990. Release of endothelin from the porcine aorta; inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 85: 587-590
13. **Boulanger C, Lüscher T.** 1991. Hirudin and nitric oxide donors inhibit the thrombin-induced release of endothelin from the intact porcine aorta. *Circ Res* 68: 1768-1772.
14. **Bravo L.** 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56:317-33.
15. **Buikema H, Van Gilst WH, Van Veldhuisen DJ, de Smet BJ, Scholtens E, Lie KI, Wesseling H.** 1993. Endothelium-dependent relaxation in two different models of chronic heart failure and the effect of ibopamine. *Cardiovasc Res* 27:2118-2124.
16. **Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR.** 1996. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing. *Cir Res* 78:415-423.

17. **Cao G, Cutler RG.** 1995. Protein oxidation and aging. *Arch Biochem Biophys* 320: 106-14.
18. **Cooke JP.** 1992. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest.* 90:1168.
19. **Corder R., Douthwaite J., Lees D, Khan N., Santos A., Wood E., Carrier M.** 2001. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* 414: 863-864.
20. **Cordero L.** 1996. Efecto del clonixino e indometacina en la relajación dependiente del endotelio en aorta de rata. Tesis de título cirujano dentista. Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
21. **Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Luscher TF.** 2003. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* Feb 25; 107(7): 1017-23
22. **Craven PA, DeRubertis FR.** 1989. Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. Possible mediation by glucose. *J Clin Invest* 83: 1667–1675.
23. **Del Monte MA, Rabbani R, Diaz TC, Lattimer SA.** 1991. Sorbitol, myo-inositol and rod outer segment phagocytosis in glucose-exposed cultures human retinal pigment epithelial cells: in vitro modeling of the myo-inositol depletion hypothesis of diabetic complications. *Diabetes* 40:1335-45.
24. **Dieber-Rotheneder M, Puhl H, Waeg G, Striegl G, Esterbauer H.** 1991. Effect of oral supplementation with D-alfa-tocopherol on the vitamin E

content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *J Lipid Res* 32: 1325-32.

25. **Diebolt M, Bucher B, Adriantsitohaina R.** 2001. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension* 38: 159-165.
26. **Dohi Y, Hahn A, Boulanger C, Bühler F, Luscher TF.** 1992. Endothelin stimulated by angiotensin II augments vascular contractility of hypertensive resistance arteries. *Hypertension* 19: 131-137
27. **Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Yamada A, Urabe Y, Takeshita A.** 1993. Evidence of impaired endothelium-dependent coronary vasodilatation in patients with angina pectoris and normal coronary angiograms. *N Engl J Med* 328:1659-1664r.
28. **Ferrandiz ML, Alcaraz MJ.** 1991. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions* 1991; 32:283-8.
29. **Fisher SK, Heacock AM, Agranoff BW.** 1992. Inositol lipids and signal transductions in the nervous system: an update. *J Neurochem* 58: 18-38.
30. **Formica JV, Regelson W.** 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 33:1061-80.
31. **Fosterman U, Mugge A, Alheid U, Haverich A, Frolich JC.** 1988. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic coronary arteries. *Cir Res* 62:185-190.

32. **Furchgott RF, Zawadski JV.** 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 286:373-376.
33. **Gabbay K.** 1973. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *N Engl J Med.* 288: 831-6.
34. **Greene DA, Lattimer SA, Sima AA.** 1987. Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Engl J Med* 316: 599–606.
35. **Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexande RW.** 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74: 1141–1148.
36. **Groot H de, Rauen U.** 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* 3:249-55.
37. **Gutterman D.** 2002. Vascular Dysfunction in Hyperglycemia Is Protein Kinase C the Culprit?. *Circ Res.* 90:5-7
38. **Halliwell B, Gutteridge J.** 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280: 1-8.
39. **Hertog M, Feskens EJM.**1994. Hollman PCH, et al. Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr. Cancer* 22:175–84
40. **Higashi Y, Oshima T, Ozono R, Watanabe M, Matsuura H, Kajiyama G.** 1995. Effects of L-arginine infusion on renal hemodynamics in patients with mild essential hypertension. *Hypertension* 25: 898-902.

41. **Hirono I.** 1987. Bioactive molecular. Naturally occurring carcinogenes of plant origin. Toxicology phatology and Biochemistry. *Biol Pharm Bull* 2:120-58.
42. **Huang M, Manning R, Leblanc M, Hester RL.** 1995. Overall hemodynamic studies after the chronic inhibition of endothelial derived nitric oxide in rats. *Am J Hypertens* 8: 358-364
43. **Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G.** 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9265-9269
44. **INE.** 2001. Anuario Nacional de Estadísticas, Chile.
45. **Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL.** 1992. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: Differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11059–11063
46. **Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh H, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsuni H, Nawata H.** 2003. Protein Kinase C-Dependent Increase in Reactive Oxygen Species (ROS) Production in Vascular Tissues of Diabetes: Role of Vascular NAD(P)H Oxidase. *J Am Soc Nephrol* 14: S227-S232
47. **Jonadet M, Meunier M, Bastide J, Bastide P.** 1983. Anthocyanosides extracted from *Vitis vinifera*, *Vaccinium myrtillus* and *Pinus maritimus*. I. Elastase-inhibiting activities in vitro. II. Compared angioprotective activities in vivo. *J Pharm Belg.* Jan-Feb; 38(1): 41-6

48. **Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Sato M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakasawa H, Won K, Sato K.** 1997. Calcium Movements, Distribution, and Functions in Smooth Muscle. *Pharmacol. Rev.* 49(2): 157-230.
49. **Kato K, Zorunski CF.** 1993. Nitric oxide inhibitors facilitate the induction of hippocampal long-term potentiation by modulating NMDA receptors. *J Neurophysiology* 70:1269-73.
50. **Kelm M, Preik M, Hafner D, Strauer BE.** 1996. Evidence for a multifactorial process involved in the impaired flow response to nitric oxide in hypertensive patients with endothelial dysfunction. *Hypertension*, 27: 346-353.
51. **Kilpatrick EV, Cocks TM:** 1994. Evidence for differential roles of nitric oxide (NO) and hyperpolarization in endothelium-dependent relaxation of pig isolated coronary artery. *Br J Pharmacol* 112:557-565.
52. **Knowles RG, Moncada S.** 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298: 249-258
53. **Kolodgie FD, Virmani R, Rice HE, Mergner WJ.** 1990. Vascular reactivity during the progression of atherosclerotic plaque. A study of Watanabe heritable hiperlipidemic rabbits. *Circ Res.* 66:1112-1126.
54. **Konishi M, Su C.** 1993. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension*, 5: 881-886.

55. **Kubes P, Suzuki M, Granger DN.** 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4651-4655.
56. **Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Williams RE, Heifetz SM.** 1991. Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation*; 84:1589-1596.
57. **Lee AY, Chung SS.** 1999. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J*; 13(1): 23-30.
58. **Li J, Zhao S, Li X, Zhuo QC, Gao M, Lu SK.** 1997. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. *Int J Cardiol* 61: 165-169.
59. **Lindahl M, Tagesson C.** 1997. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation* 21:347-56.
60. **Linder L, Kiowsky W, Bühler F, Luscher TF.** 1990. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. *Circulation*, 81: 1762-1767.
61. **Lorenzi M, Montisano D, Toledo S, Barrieux A.** 1986. High Glucose Induces DNA Damage in Cultured Human Endothelial Cells. *J. Clin. Invest.* 77: 322-325.
62. **Lunec J.** 1990. Free Radicals: their involvement in disease processes. *Ann Clin Biochem* 27: 173-82.

63. **Lüscher T, Vanhoutte P.** 1986. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 8: 344-348.
64. **Lüscher T, Raij L, Vanhoutte P.** 1987. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl-rats. *Hypertension* 9: 157-163.
65. **Lüscher T.** 1991. Vascular biology of coronary artery and bypass graft disease. *Curr Opin Cardiol* 8: 963-74
66. **Lüscher T, Boulanger C, Dohi Y, Yang ZH.** 1992. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 19:117-121.
67. **Maffei Facino R, Carini M, Aldini G, Bombardelli E, Morazzoni P, Morelli R.** 1994. Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidines from *Vitis vinifera*. A mechanism for their capillary protective action. *ArzeimForsch.* 44,592-601.
68. **Market M, Andrew PC, Babiar BM.** 1984. Measurement of superoxide production by human neutrophils. *Methods Enzimol* 105:358-65.
69. **McCann SM, Rettori V.** 1996. The role de nitric oxide in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 211(1): 7-14
70. **McDaniel ML.** 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exper Biol Med* 211(1): 24-32.
71. **Meunier M, Duroux E, Bastide P.** 1989. Free Radical Scavenger Activity of Procyanidolic Oligomers and Anthcyanosides with Respect to Superoxide Anion and Lipid Peroxidation, *Plantes medicinales et phytotherapie*, Tomo XXIII, 4,267-274.

72. **Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS.** 1994. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 266: H2568–H2572.
73. **Morales M.** 1998. ¿Es posible la inducción de Disfunción Endotelial vascular por antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)? I Congreso internacional de farmacología. Sociedad Cubana de Farmacología. La Habana, Cuba.
74. **Morales M., Figueroa H. Bustamante S.** 2003. Bases farmacológicas y clínicas del extracto de *Vitis vinifera* en patologías asociadas al estrés oxidativo. *Rev. de Fitoterapia.* 3 (2): 135-144.
75. **Mullins MG.** 1992. Biology of the grapevine (biology of horticultural crops). *Ed. Cambridge University Press.* Pp 37-80.
76. **Muñoz J.** 2002. Reversión de la disfunción vascular por extracto de *Vitis Vinifera* en ratas diabéticas. Memoria de grado para optar al título profesional de Médico Veterinario. Departamento de Patología Animal, Universidad de Chile.
77. **Newby A, Henderson A.** 1990. Stimulus secretion coupling in vascular endothelial cells. *Annu Rev Physiol* 52: 661-674
78. **Njoroge FG, Monnier VM.** 1989. The chemistry of the Maillard reaction under physiological conditions: a review. *Prog Clin Biol Res* 304: 85-91.
79. **Ozaki M, Uchida S, Furukawa K, Akashi T, Niwa M, Nonaka G, Nishioka Y.** 1990. Flavonoids in Biology and Medicine III: Current Issues in *Flavonoid Research.* *Nat. Univ. Singapore.* N.P. Das. De. Pp. 259-265

80. **Panza J, Quyyumi A, Brush J, Epstein SE.** 1990. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 323: 22-27.
81. **Panza J, Casino P, Kilcoyne C, Quyyumi AA.** 1993. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 87: 1468-1474.
82. **Panza J, García C, Kilcoyne C, Quyyumi AA, Cannon RO.** 1995. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation* 91: 1732-1738.
83. **Peters S., Mathy M.J., Pfaffendorf M., Van Zwieten P.** 2000. Reactive oxygen species-induced aortic vasoconstriction and deterioration of functional integrity. *Arch. Pharmacol.* 36B: 127-133.
84. **Pieper,** 1997. Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin. *Cardiovasc. Pharmacol.* 29:8-15.
85. **Pietta PG.** 2000. Flavonoids as antioxidant. *J Nat Prod* 63:1035-42.
86. **Radomski MW, Palmer RM, Moncada S.** 1987. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 2: 1057-1058.

87. **Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG.** 1996. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NAD/NADPH oxidase activation. *J Clin Invest* 97: 1916–1923
88. **Redy KG, Nair, Sheehan HM, Hodgson JM.** 1994. Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 23:833-843.
89. **Rojas M., Morales M.** 2003. Nitric Oxide, an Iceberg in Cardiovascular Physiology. Far beyond vessel tone control. *Archives of Medical Research.* Sept. : 3-83.
90. **Romero JC, Licea M.** 1996. Patogénesis de la polineuropatía diabética. *Rev Cubana Endocrinol* (7)1
91. **Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C.** 2000. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol* 16:91-8.
92. **Sander M, Hansen P, Victor R.** 1995. Sympathetically mediated hypertension caused by chronic inhibition of nitric oxide. *Hypertension* 26: 691-695.
93. **Scalbert A., Williamson G.** 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenoles. *J. Nutr.* 130: 2073s-2085s.
94. **Sheetz MJ, King GL.** 2002 Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 288: 2579–2588.

95. **Shimokawa H, Vanhoutte PM.** 1989. Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circ Res* 64:900-914.
96. **Sies H.** 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed. Engl.* 25: 1058-1071.
97. **Southorn P, Powis G.** 1988. Free radicals in Medicine I. Chemical Nature and Biologic Reactions. *Mayo Clin Proc* 63: 381-9.
98. **Stewart D, Langleben D, Cernacek P, Cianflone K.** 1990. Endothelin release is inhibited by coculture of endothelial cells with cells of vascular media. *Am J Physiol* 259: H1928.
99. **Sudheesh S, Sandhya C, Sarah KA, Vijayalakshmi NR.** 1999. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytother Res* 13:393-6.
100. **Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A.** 1995. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* 91: 1981-1987.
101. **Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., Nishizuka, Y.** 1977. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J. Biol. Chem* 252: 7603-7609
102. **Taylor SG, Weston AH.** 1988. Endothelium-derived hyperpolarizing factor; a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci* 9:272-274

103. **Tesfamariam B., Brown M., Deykin D., Cohen R.** 1990. Elevated glucose promotes generation of Endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J. Clin. Invest.* 85: 929-932
104. **The Diabetes Control and Complications Trial Data Group.** 1995. The effect of intensive diabetes management on macrovascular events and risk factors in the Diabetes Control and Complications Trial. *Am J Cardiol* 75: 894-903.
105. **The United Kingdom Prospective Diabetes Study Data Group.** 1998. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352: 837-53.
106. **Triana M.** 2001. La hiperglicemia y sus efectos toxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc.* 2(2): 131-41
107. **Torres R, Vera R.** 2003. Determinación del efecto del extracto seco estandarizado de *Vitis Vinifera* en la disfunción endotelial inducida por Clonixinato. Tesis de Grado al título profesional de Licenciado de Kinesiología, Escuela de Kinesiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
108. **Turrens J.** 1994. Fuentes intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicas. *Antioxidante y Calidad de Vida* 1:16-9

109. **Ueno M, Kawashima S, Tsumoto S, Morita M, Iwasaki T.**1994. Impaired endothelium-dependent vasodilatory responses in hindlimb blood flow in dogs with congestive heart failure. *Jpn Circ J* 58:778-786.
110. **Uchida S, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Nonaka G, Nishioka I, Niwa M, Ozaki M.** 1987. Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals. *Medic. Science Research.* 15, 831.
111. **Vane JR, Anggard EE, Botting RM.** 1990. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* 323:27-36.
112. **Vanhoutte P.** 1991. Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets. *Eur Heart J* 12 (suppl E): 25-32.
113. **Vanhoutte P.** 1993. The other endothelial derived vasoactive factors. *Circulation* 87 (suppl V): V9-V17.
114. **Vanhoutte P, Boulanger C.** 1995. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res* 18: 87-98.
115. **Vanhoutte PM:** 1996. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Harwood Academic Publishers.* The Netherlands. In press
116. **Vanhoutte PM.** 1998. Endothelial dysfunction and inhibition of converting enzyme. *Eur Heart J* 19 (suppl): J7-J15.
117. **Videla L.A.** 2000. Energy metabolism thyroid calorigenesis, and oxidative stress: functional and cytotoxic consequences. *Redox report* 5:265-275.
118. **Vinson JA.** 1998. Flavonoids in food as in vitro and in vivo antioxidants. *Adv Exp Med Biol* 439:151-64.

119. **Vogel RA.** 1997. Coronary risk factors, endothelial function and atherosclerosis: a review. *Clin Cardiol.* 20:426-32.
120. **Waldman SA, Murad F.** 1988. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: The guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12: Suppl5: S115-S118.
121. **Wang J, Seyedi N, Xu XB, Wolin MS, Hintze TH.** 1994. Defective endothelium-mediated control of coronary circulation in conscious dogs after heart failure. *Am J Physiol* 266:H670-H680.
122. **Weston AH, Edwards G.** 1992. Recent progress in potassium channel opener pharmacology. *Biochem Pharmacol.* 43: 47-54.
123. **Wolf BA, Williamson JR, Easom RA, Chang K, Sherman WR, Turk J.** 1991. Diacylglycerol accumulation and microvascular abnormalities induced by elevated glucose levels. *J Clin Invest* 87: 31–38
124. **Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T.** 1988. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle  $Ca^{2+}$  channels. *J Hypertens (Supl):*6:188-191
125. **Yang Z, Von Segesser L, Bauer G, Stulz P, Turina M, Luscher T.** 1991. Different activation of endothelial arginine and cyclooxygenase pathway in human internal mammary artery and saphenous vein. *Cir Res* 68:52-60.

## ANEXOS

### Fisiología del endotelio

El NO es sintetizado a partir de la L-arginina a través de la NOS, produciendo además de NO, L-citrulina (Cooke, 1992). Además de la L-Arginina, se requiere también de cuatro cofactores para la formación del NO: FMN, FAD, THB y NADPH. Existen 3 diferentes tipos de NOS: inducida, neuronal y endotelial; estas 2 últimas son constitutivas (Knowles y cols. 1994). Una vez producido, el NO difunde hacia la túnica media del músculo liso, estimulando la guanilato ciclasa en la célula muscular. Esto hace aumentar los niveles de GMPc, disminuyendo los niveles citosólicos de calcio, lo que produce relajación (Waldman y cols. 1988). El NO también actúa en la defensa contra infecciones, la plasticidad de la sinapsis (Kato y cols. 1993) y en la reproducción (McCann y cols, 1996). También se ha establecido que inhibe la agregación y adhesión de monocitos y plaquetas al endotelio (Radomski y cols. 1987), bloquea la activación de leucocitos (Kubes y cols, 1991) la oxidación de lipoproteínas de baja densidad e inhibe la secreción de insulina (McDaniel, 1996).

La prostaciclina es un eicosanoide derivado del ácido araquidónico que actúa por medio de la COX aumentando el AMPc en plaquetas y células musculares lisas vasculares (Newby y cols. 1990). La síntesis de esta sustancia se realiza preferentemente a nivel de la túnica media y adventicia. La síntesis de prostaciclina también ha sido puesta en evidencia en las células intersticiales de la médula renal, los glomérulos de la corteza, adipocitos humanos, fibroblastos de la piel en leucocitos y células de la mucosa gástrica. Esta sustancia actúa en forma sinérgica con el NO.

Otro mecanismo de relajación es por medio del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). La naturaleza química del EDHF no está clara. En algunos vasos, los ácidos epoxieicosatrienoico, formados a partir del ácido araquidónico por la acción del citocromo P-450, podrían corresponder al EDHF (Campbell y *co/s.* 1996). La hiperpolarización de las células del músculo liso inducidas por el EDHF están mediadas por un aumento del movimiento de  $K^+$ , sin embargo, no se ha establecido en forma definitiva cual es el tipo de canales de  $K^+$  involucrados, aunque parecen ser calcio dependientes en lugar de  $K^+$ /ATP dependientes (Taylor y *co/s.* 1988; Vanhoutte y *co/s.* 1996). Estudios fisiológicos anteriores han demostrado que la ACh y otros dilatadores endotelio-dependientes causan hiperpolarizaciones endotelio-dependientes y relajaciones que son debidas al EDHF (Vanhoutte y *co/s.*1996). La contribución de la hiperpolarización en la vasodilatación endotelio-dependiente varía en función del tamaño de las arterias y es predominante en los vasos de mayor resistencia (Campbell y *co/s.* 1996). En las grandes arterias prevalece la acción del NO, pero ante situaciones en que éste se halla inhibido, el EDHF puede suplir a éste en su función vasodilatadora ( Kilpatrick y *co/s.* 1994; Vanhoutte y *co/s.*1996).

Entre las sustancias contráctiles está la endotelina-1 (ET-1), péptido de 21 aminoácidos (Yanagizawa y *co/s.* 1988). La ET-1 es la única sintetizada por el endotelio en forma de proendotelina, la cual se transforma en endotelina por una endopeptidasa. La ET-1 causa relajación en pequeñas cantidades, pero en grandes cantidades produce una contracción importante. La producción de endotelina es estimulada por fuerzas mecánicas, hipoxia, trombina, arginina vasopresina, angiotensina II, interleukina y otros mediadores (Lüscher y *co/s.*

1991; Dohi y cols. 1992). La producción de endotelina puede ser reducida mediante mecanismos inhibitorios que incluyen vías dependientes de GMPc activadas por NO (Boulanger y cols. 1991) y péptido auricular (Lüscher y cols., 1992), y vías relacionadas con AMPc activadas por prostaglandinas (Stewart y cols. 1990).

Además existen prostanoides derivados de la vía del ácido araquidónico (vía de la COX), que actúan en la contracción (Yang y cols., 1991), como el tromboxano A<sub>2</sub> y la prostaglandinas (Teschfariam y cols. 1990).

### ***Glicosilación no enzimática de proteínas***

Se define como la unión de la glucosa al grupo *épsilon amino* de la lisina de las proteínas plasmáticas y tisulares, o al grupo *alfa amino* terminal de la cadena polipeptídica, o a los grupos *amino de las bases* de los ácidos nucleicos. La glicosilación trae como consecuencia que las proteínas originales modifiquen su estructura, sus propiedades físico-químicas y sus funciones biológicas. El grado de glicosilación dependerá de la concentración de glucosa en el medio y del tiempo de vida media de la proteína. Casi todas las proteínas del organismo se glicosilan. Como ejemplos de ellas tenemos: albúmina, hemoglobina, colágeno, inmunoglobulinas, etc. Esta modificación trae unido cambios funcionales y modificación del tejido.

Como consecuencia de reacciones químicas se producen en el transcurso de pocas horas, productos inestables (base de *Shiff*) y en días productos estables

(productos de *Amadori*) que estarán en equilibrio en dependencia de los niveles de glucosa en el medio y del tiempo de vida media de la proteína.

Cuando las concentraciones de glucosa se mantienen altas durante varias semanas, los productos inestables que se producen en la cascada de reacciones se estabilizan y se transforman en los llamados productos finales de glicosilación AGE (Advanced Glycosylation End Product) (Njoroge *y cols.* 1989), que no regresan a su estado original.

Las proteínas modificadas por los AGE se unen a receptores específicos en las células endoteliales y en los macrófagos para ser catabolizada. Cuando la Prot-AGE se une al receptor sobre las células endoteliales se estimula la liberación del factor tisular, y se desencadena la vía extrínseca de la coagulación. Por otra parte hay un incremento en la producción de la *ET-1* que induce un aumento en la vasoconstricción del vaso, por lo tanto favorece la aparición de una DE al unirse la Prot-AGE a sus receptores específicos, con la consecuente liberación de citoquinas adversas para las células endoteliales. Esta disfunción endotelial provoca en el vaso un incremento en la permeabilidad, una disminución en la antitrombogenicidad, una disminución en la actividad fibrinolítica y el incremento de la adhesión de plaquetas y monocitos, todo lo cual provoca una superficie endotelial permeable y trombogénica. (Triana 2001)

### ***Teoría del sorbitol***

La teoría del sorbitol, propuesta hace 30 años (Gabbay 1973), establece que en presencia de un exceso de glucosa, se produce una saturación de la

hexoquinasa. Debido a esto, la enzima aldosa reductasa convierte la glucosa en sorbitol y posteriormente en fructosa, por acción de la sorbitol deshidrogenasa. El incremento del sorbitol daña los tejidos que necesitan insulina y aquellos cuyo contenido intracelular de glucosa es semejante al plasma (córnea, retina, nervios periféricos, glomérulo renal y cerebro) (Romero y cols .1996). Estudios experimentales confirman que la exposición de células a un ambiente hiperosmolar, provoca un incremento significativo en el sorbitol intracelular y reduce la concentración de mioinositol (Del Monte y cols.1991; Fisher y cols. 1992) Este sería un mecanismo bioquímico posible por el cual la hiperglicemia podría deteriorar la función y la estructura de las células afectadas por las complicaciones diabéticas (Lee y cols. 1999).

En resumen, el aumento de la actividad de la enzima “aldosa reductasa” estimulada por el aumento de la concentración de glucosa, transforma a la glucosa en sorbitol, y este último es metabolizado a fructosa a través de la *Sorbitol-deshidrogenasa* produciendo sorbitol, fructosa, disminución del NADPH y aumento del NADH. El aumento de la fructosa causa fructosilación de las proteínas, un fenómeno muy similar a la glicosilación. El consumo de NADPH favorece el aumento de RL al disminuir el cociente glutatión reducido / oxidado, además aumenta la actividad de la vía de las pentosas, activando a su vez a la PKC y finalmente, el aumento del NADH favorece la síntesis de DAG, estimulando también la vía de PKC.

## **Antioxidantes**

Se define como cualquier sustancia que en concentraciones normales posee afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un RL. Cediendo un electrón y transformándose en un RL debil no tóxico, otra forma de acción es la de los antioxidantes enzimáticos, que catalizan la degradación sucesiva de los RL onvirtiéndolos en estructuras químicas menos agresivas

El sistema antioxidante del organismo se divide en el sistema enzimático, constituido por enzimas tales como la SOD, catalasa y glutatión peroxidasa y el sistema no-enzimático, constituido principalmente por la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), ácido ascórbico, carotenoides ( $\beta$ -caroteno y licopeno), albúmina, ácido úrico, bilirrubina y otros (Southorn y *cols.* 1988; Halliwell y *cols.*1990). El sistema antioxidante puede ser reforzado o debilitado por factores externos, tales como la dieta, ejercicio, tabaquismo, consumo de vitaminas, etc. Asimismo, el consumo de antioxidantes naturales o sintéticos puede reforzar los mecanismos antioxidantes del organismo (Dieber-Rotheneder y *cols.*1991)

Los flavonoides son una clase de pigmentos vegetales hidrosolubles. Los flavonoides se clasifican en categorías, aunque existe controversia sobre cómo dividirlos. En un sistema, los flavonoides se clasifican en isoflavonas, antocianidinas, flavanos, flavonoles, flavonas y flavanonas (Hertog y *cols.* 1994) Poseen propiedades antioxidantes (Bohm y *cols.*, 1998; Vinson 1998, Acuña y Zubiaguirre 2002), antiinflamatorias, antitrombóticas (Pietta, 2000), antimicrobianas (Russo y *cols.*, 2000), antialérgicos (Hirono y *cols.*, 1987),

antitumorales (Hirono y cols, 1987; Russo y cols, 2000) e inhiben enzimas (Groot y cols. 1998; Formica y cols, 1995), además de prevenir y revertir la disfunción endotelial (Muñoz 2002; Torres y Vera, 2003)

Existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de RL (Bravo, 1998; Russo y cols, 2000). Otros autores se refieren además a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa, la COX, la mieloperoxidasa, la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (Ferrandiz y cols. 1991) evitando la generación de ROS *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A<sub>2</sub> (Lindahl y cols. 1997), al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa y la SOD (Sudheesh y cols. 1999). De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de RL y en la formación del radical en sí.

## APÉNDICE

### 1. FOTOS DEL LABORATORIO

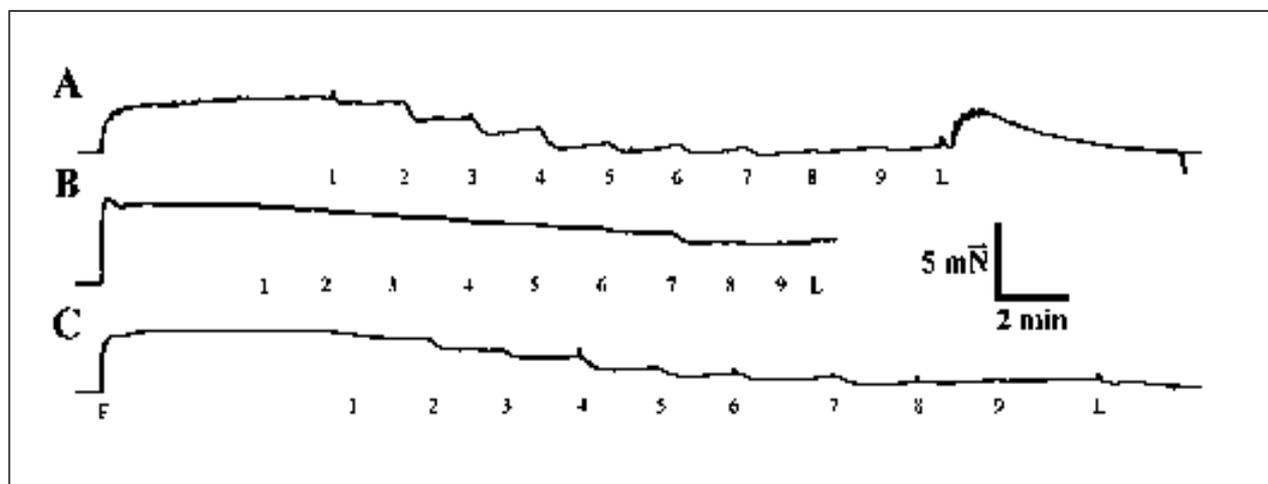


**Imagen 1:** Se observa los baños en los cuales se mantuvieron los segmentos de aorta vivas y el Polígrafo Grass.



**Imagen 2:** Se observa los baños en los cuales se mantuvieron los segmentos de aorta vivas y el Polígrafo Grass.

## 2. REGISTROS REPRESENTATIVOS



**Figura 2:** Registro poligráfico de anillos aórticos contraídos con fenilefrina  $1\mu\text{M}$  y relajados con concentraciones crecientes de acetilcolina. Los anillos aórticos se contraerón con FE  $1\mu\text{M}$  (F) y se relajaron agregando alícuotas sucesivas de ACh ( $1 \times 10^{-8}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M). Contracción y relajación de un anillo aórtico representativo del grupo control (A), grupo 1 o KHm con glucosa 46mM (B) y grupo 2 o incubación previa de Evv más KHm con glucosa 46mM (C). (L=lavado de la preparación con solución KHm  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=7.40$ ). Calibración horizontal 2 minutos, calibración vertical 5mN.