

Universidad de Chile

Facultad de Medicina
Escuela de Kinesiología

Determinación del efecto del extracto seco estandarizado de *Vitis vinifera* en la disfunción endotelial inducida por Clonixinato de lisina.

Tesis Entregada a la UNIVERSIDAD DE CHILE En cumplimiento parcial de los requerimientos Para optar al grado de LICENCIADO EN KINESIOLOGÍA

Rodrigo Hernán Torres Castro.

Roberto Eugenio Vera Uribe.

Director de Tesis: Sandro E. Bustamante Delgado, M.Sc. Profesor Asistente de Farmacología Patrocinante de Tesis: Sra. Sylvia Ortiz Zúñiga, M.Sc.

- 2003 -

INFORME DE APROBACIÓN .	1
RESUMEN .	3
ABSTRACT .	5
INTRODUCCIÓN .	7
REVISION BIBLIOGRAFICA . .	9
Células Endoteliales y Óxido Nítrico . .	9
Contracción de Músculo Liso Vascular .	11
Relajación Músculo Liso .	11
Disfunción Endotelial .	12
Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) . .	13
Clonixinato de Lisina .	16
Disfunción por AINEs . .	17
Flavonoides . .	17
Vitis vinífera . .	17
Problema . .	21
Justificación .	23
OBJETIVOS . .	25
Objetivo General .	25
Objetivos específicos . .	25
HIPÓTESIS .	27
MATERIALES Y METODOS .	29
Análisis estadístico .	33
RESULTADOS . .	35
DISCUSIÓN .	41
CONCLUSIONES . .	45
PROYECCIONES . .	47
Referencias y BIBLIOGRAFÍA . .	49

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE LICENCIATURA

Se informa a la Escuela de Kinesiología de la Facultad de Medicina que la Tesis de Licenciatura presentada por los candidatos:

Rodrigo Hernán Torres Castro.

Roberto Eugenio Vera Uribe.

Ha sido aprobada por la Comisión informante de Tesis como requisito para optar al grado de licenciado en Kinesiología, en el examen de Tesis rendido el 15 de Enero de 2004.

Director de Tesis

Prof. As. M.Sc. Sandro E. Bustamante Delgado

.....

Comisión Informante de Tesis

Q.F. Dra. Myma Rojas García.

.....

Prof. As. M.Sc. Silvia Ortis Zúñiga.

.....

Dr. Gonzalo Andrés Rivera Lizama

.....

Prof. As. Kigo. Rodrigo A. Rojo Castro.

.....

RESUMEN

Las células endoteliales (CE) son responsables de la síntesis y liberación de sustancias vasoactivas ante un estímulo neuronal, hormonal o físico. Procesos patológicos, factores ambientales o el envejecimiento del individuo, dañan las CE y alteran su función. Se denomina disfunción endotelial (DE) a la capacidad disminuída de las CE de inducir vasorrelajación ante el estímulo agonista colinérgico. Los AINEs son fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos que bloquean la COX. Experimentos preliminares han mostrado que el clonixinato de lisina (Clx), un AINE antranílico, induce DE aguda en anillos de aorta *in vitro*, por un mecanismo no dilucidado. El extracto de *Vitis vinifera* (EVv) es rico en flavonoides, compuestos con acción antioxidante. Se intenta determinar si el EVv es capaz de prevenir *in vitro* la DE inducida por Clx. Se montaron anillos aórticos de ratas en baños termorregulados para la determinación isométrica de fuerza, asignándose al azar en tres grupos: control, grupo 1 (G1) y grupo 2 (G2). El G1 se incubó con 100 μ M Clx y el G2 con 5,35 ng/mL EVv junto con 100 μ M Clx. Determinamos y comparamos la DE en los anillos aórticos precontraídos con fenilefrina respecto del control. El G1 mostró una notable DE la que fue significativamente ($p < 0,05$) prevenida por la incubación con EVv. Los resultados obtenidos muestran que el EVv puede prevenir la DE inducida por Clx *in vitro*. Si bien, se requieren otros experimentos para explicar el mecanismo por el cual Clx induce DE y de prevención del EVv, este fitofármaco se perfila como una alternativa de protección vascular para los pacientes que utilizan crónicamente el Clx.

Palabras claves: Disfunción endotelial, AINEs, clonixinato de lisina, *Vitis vinifera*, proantocianidinas, fitofármacos.

ABSTRACT

Endothelial cells (EC) control synthesis and release of vasoactive substances on response to either neuronal, hormonal or physical stimulus. Pathological processes, environmental factors, and normal ageing, damage EC and alters its function. Endothelial dysfunction (ED) is the reduced ability of EC to induce relaxation of vascular smooth muscle by cholinergic agonists. NSAIDs are antiinflammatory, analgesic, and antipyretic drugs that block COX. Previous experiments have been shown that lysine#clonixinate (Clx), an antranilic NSAID, induce acute ED in *in vitro* aortic rings, by a mechanism not yet clear. *Vitis vinifera* extract (EVv) is rich in flavonoids, compounds with antioxidant activity. The aim of this work was to determine if EVv is able to prevent *in vitro* Clx#induced ED. Rat aortic rings were mounted in thermoregulated organ baths to measure isometric force, and were randomly assigned to three groups: control, group 1 (G1), and group 2 (G2). G1 was incubated with 100 μ M Clx, and G2 with 5.35 ng/mL EVv + 100 μ M Clx. We determine and compare ED of phenylephrine#precontracted aortic rings respect control. G1 showed a notable ED which was significantly ($p < 0,01$) prevented by EVv incubation. Our results show that EVv is able to prevent *in vitro* Clx#induced ED. Eventhoughts further experiments are required to explain the mechanisms by which Clx induces ED and prevents it by EVv, this phytomedicine would have a pharmacological profile as an alternative vascular protection to patients that use Clx chronically.

Keywords: Endothelial dysfunction, NSAIDs, lysine#clonixinate, *Vitis vinifera*, proanthocyanidines, phytomedicines.

INTRODUCCIÓN

El endotelio vascular es fundamental para muchas funciones, como la mantención de la homeostasis vascular. El estado de conocimiento actual ha permitido establecer una vinculación entre un buen estado de salud cardiovascular y la indemnidad de este tejido. Es ampliamente aceptado que una multiplicidad de factores fisiológicos, conductuales, fisiopatológicos, farmacológicos y ambientales, contribuyen a producir la pérdida parcial o completa de la actividad de las células endoteliales, un trastorno funcional denominado disfunción endotelial (DE). Podemos citar a modo de ejemplo el envejecimiento, tabaquismo crónico, estrés oxidativo, diabetes mellitus, dislipidemia, hipertensión arterial, el uso crónico de ciertos fármacos, inhalación de compuestos derivados de la quema de combustibles fósiles, acumulación de exposición a radiación ultravioleta.

Investigaciones preliminares realizadas en el laboratorio de Farmacodinamia y Fitofarmacología, lugar en el cual se ha desarrollado el presente trabajo de investigación, se demostró que la administración aguda de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) de uso común, el Clonixinato de Lisina (Clx), Ibuprofeno y Ketorolaco, pueden producir DE en anillos de aorta *in vitro*. El mecanismo a través del cual inducen la DE no está del todo esclarecido. A la luz de experimentos aún no publicados, se postula un mecanismo de interferencia de la síntesis del óxido nítrico (NO), afectando de esta manera la capacidad de relajación endotelio dependiente del músculo liso vascular. Dado que los AINEs se comercializan en Chile como medicamentos de venta libre y, que la población los utiliza en forma indiscriminada, particularmente el Clx por acción analgésica, se transforma en un potencial problema de salud pública.

De la cutícula de las semillas de la uva negra (*Vitis vinifera*), especialmente de la variedad cabernet, se obtiene un extracto acuoso rico en polifenoles, mismos que han sido asociados a efectos protectores de la función cardiovascular por numerosas publicaciones científicas. Entre los polifenoles más importantes de *V. vinifera*, están las proantocianidinas, antocianidinas y procianidinas, las que poseen demostrada capacidad antioxidante y uno de sus principales órganos blanco, de un punto de vista farmacológico, lo constituye el endotelio vascular, favoreciendo la capacidad de relajación del músculo liso vascular.

Se han sugerido otros mecanismos de protección cardiovascular de *V. vinifera*, basado en recientes publicaciones que han mostrado que las procianidinas suprimirían la transcripción del gen de endotelina¹, un potente vasoconstrictor, modificando el tono muscular liso al favorecer la relajación y, potencialmente, prevenir la DE.

En base a lo anterior, es de interés determinar si el extracto de *Vitis vinifera* puede prevenir o disminuir la DE inducida por Clx.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Células Endoteliales y Óxido Nítrico

El endotelio vascular es una monocapa de células escamosas de tipo epitelial y constituyen una barrera semipermeable que separa la pared vascular de la sangre (Ortega y de Artiñano, 1997). Regulan la homeostasis y mantienen un equilibrio constante entre los procesos de trombosis-fibrinólisis. El control de la homeostasis de la pared arterial involucra la producción de sustancias vasorrelajantes y vasoconstrictoras que, en un sujeto sano, están en equilibrio, manteniendo el tono del músculo liso. Los agentes vasoconstrictores, producidos y liberados por las células endoteliales, son, entre otros, la endotelina-1 (Yanagizawa y cols., 1988), el tromboxano A₂ y la Angiotensina II. Los agentes vasorelajadores derivados del endotelio son prostaciclina, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio y el EDRF u óxido nítrico (NO) (Boulanger y Vanhoutte, 1994).

El descubrimiento del EDRF se realizó en 1980 cuando Furchgott y Zawadski demostraron que el endotelio vascular era esencial para la acción vasodilatadora de la acetilcolina (ACh); la eliminación del endotelio evitaba que la ACh produjera relajación del músculo liso y, por el contrario, producía vasoconstricción. Bautizaron como EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor) la sustancia liberada por el endotelio responsable

de producir la vasodilatación observada. Poco más tarde, se demostró que el EDRF correspondía al NO (Palmer y cols., 1987; Ignarro y cols., 1987; Radomski y cols., 1987).

El NO fue el primer mediador de naturaleza gaseosa descrito en sistemas celulares animales, fisicoquímicamente de alta liposolubilidad y con un electrón desapareado en su orbital externo. Si bien esta última característica le confiere propiedades de radical libre, tiene una reactividad muy débil (Ignarro, 1989; Vaughn y cols., 1998). Su alta liposolubilidad le permite transportarse intra e intercelularmente de acuerdo a la Ley de Fick, pero su vida media es muy breve debido a que muchos compuestos, como la hemoglobina, pueden reaccionar con él y bloquear su acción, en un proceso denominado secuestro (Liu y cols., 1998).

Para fines de la década de los ochenta, la descripción de la ubicuidad y multifuncionalidad del NO fue tan notoria, que en 1992 los editores de la revista *Science* proclamaron al NO como la molécula del año (Culotta y Koshland, 1993). El NO reduce la agregación plaquetaria (Radomski y cols., 1987; Adams, 1994; Houston y Buchanan, 1994; Polamowska, 1994) y bloquea la activación de leucocitos (Kubes y cols., 1991). Se ha demostrado que el NO posee un rol preponderante en funciones como, aprendizaje y memoria (Kato y Zorunski, 1993; Llew, 1995), regulación del sueño (Llew, 1995), reproducción (McConn y Rettori, 1996), y se le ha asociado a trastornos patológicos como la enfermedad de Alzheimer (Dawson y Dawson, 1993). Posee actividad como agente vasodilatador, neurotransmisor y mediador de la inflamación (Chuman y cols., 1996). Es responsable de la progresión de lesiones ateromatosas (Lomg y cols., 1993; Tsao y cols., 1994; Radomski y Sales, 1995), e inhibe la secreción de insulina (McDaniel, 1996).

En la célula endotelial, la activación de receptores muscarínicos por ligandos neurohormonales endógenos o por agonista exógenos, induce la síntesis y liberación de NO, el que difunde desde la célula endotelial al citoplasma de la célula de músculo liso vascular, donde activa a la enzima guanilato ciclasa produciendo un incremento de GMP cíclico, con la consecuente relajación del músculo liso vascular por disminución de la concentración de ión calcio (Mondaca y López, 1992).

La síntesis del NO es mediada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). La catálisis utiliza como sustrato al aminoácido L-Arginina dando como productos el aminoácido L-Citrulina y NO (Palmer y cols., 1988; Cooke, 1992; Mondaca y Higgs, 1993; Remezal, 1994). Además de la L-Arginina, se requieren también cuatro cofactores: flavinmononucleótido (FMN), flavinadeninaducleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (TBH) (Kwon y col., 1989; Tayeh y Marletta, 1987; Mayer y cols., 1997; Gross y cols., 2000) y fosfato de nicotinamida adeninaducleótido (NADPH). La NOS puede ser inhibida farmacológicamente por derivados estructurales no hidrolizables de su sustrato, como L-NAME y L-NMMA.

Se han identificado tres isoformas de la NOS. La neuronal (nNOS), la inducible (iNOS) y la endotelial (eNOS) (Knowles y Mondaca, 1994; Fostermann y Kleinert, 1995). En contraposición a la NOS inducible, la nNOS y la eNOS se denominan NOS constitutivas (cNOS), debido a que constantemente producen NO.

La iNOS se encuentra fundamentalmente dentro de los macrófagos, es inducida por citoquinas durante la respuesta inmune (Liu y cols., 1993) y puede funcionar

independiente de Ca^{2+} y Calmodulina (Michel y cols., 1996). La iNOS genera mil veces más NO que las cNOS y, su producción, perdura por más tiempo. Sus efectos, por ende, son más severos, pertinaces y sistémicos que los de las cNOS (Barnes, 1996).

La expresión de las cNOS producen una cantidad limitada de NOS, la cual es activada por Ca^{2+} y Calmodulina (Cooke y Dzau, 1997). La nNOS ha sido identificada en neuronas, músculo esquelético (Kobzick y cols., 1994), células pancreáticas, células renales y células del epitelio respiratorio (Kobzick y cols., 1993). En tanto la eNOS ha sido encontrada en membranas de células endoteliales vasculares, plaquetas (Radomski y cols., 1990), endocardio (Bredt y cols., 1991), miocardio y también en algunas neuronas del hipocampo (Dinerman y cols., 1994).

La eNOS es la fuente principal de NO en el endotelio vascular (Schulz y cols., 1992). Es esencial para el control del tono vascular en respuesta a varios tipos de estimulación, incluyendo estímulos mecánicos y químicos, esto últimos dependientes de receptor (ACh) como independientes de receptores (ionóforos de Ca^{2+}) (Furchgott, 1993).

Contracción de Músculo Liso Vascular

Al igual que en otros tejidos musculares, la contracción del músculo liso vascular se debe a la entrada del ión calcio. La contracción se inicia con un estímulo adecuado; éste puede ser de origen neuronal, neurohumoral, paracrino o autocrino.

Los estímulos con agonistas α -adrenérgicos inducen una respuesta contráctil cuyo desarrollo temporal exhibe dos fases; la primera fase, transiente, asciende rápidamente (menos de un minuto). Estudios biofísicos han demostrado que la respuesta transiente inducida por agonistas adrenérgicos se debe a la movilización del Ca^{2+} intracelular contenido en el retículo sarcoplásmico que sale a través de los canales de Rianodina hacia el citoplasma de la célula muscular lisa (Karakı y cols, 1997). El aumento transiente de la concentración citoplásmica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), induce la despolarización del potencial de membrana, alcanzando el umbral de apertura de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes de la membrana plasmática, promoviendo la entrada de Ca^{2+} extracelular, lo que se refleja en la segunda fase de contracción, de aumento sostenido en el tiempo mientras dure la estimulación (Karakı y cols, 1997).

La respuesta contráctil inducida por estímulos despolarizantes, por ejemplo con soluciones isotónicas extracelulares altas en K^+ , exhiben sólo una fase de contracción, la que corresponde a la entrada de Ca^{2+} a través de canales de calcio voltaje dependientes, careciendo de la capacidad de movilizar $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Karakı y cols, 1997).

Relajación Músculo Liso

La relajación del músculo liso puede ocurrir por diferentes mecanismos. Los agentes

antagonistas del calcio, efectivamente bloquean los canales de calcio voltaje dependiente. De igual modo, los bloqueadores del canal de Rianodina promueven la relajación muscular lisa. Ambos mecanismos, por tanto, aumentan la relajación dependiente de endotelio observada en humanos y animales (Karaki y cols, 1997).

Se ha descrito otro mecanismo para inducir la relajación del músculo liso por medio de fármacos que activan la apertura de canales de potasio. Estos canales al abrirse permiten la salida del ión K^+ , hiperpolarizando el potencial de membrana e inhibiendo la apertura del canal de calcio voltaje dependiente; como consecuencia de ello, disminuye la concentración de $[Ca^{2+}]_i$, por lo cual disminuye la capacidad contráctil del músculo liso (Weston y Edwards, 1992; Kuriyama y cols, 1995). Kuriyama y cols, en arteria mesentérica de conejo, encontraron que los activadores de canales de K^+ inhibían el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por agonistas adrenérgicos. Paralelamente a la baja en la concentración del ión calcio, disminuiría tanto la producción de IP_3 como la salida de ión Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico.

El NO producido en la célula endotelial como consecuencia final de la activación de receptores de membrana (como los muscarínicos), difunde desde el endotelio hacia el músculo liso, estimulando la guanilato ciclasa y aumentando los niveles de GMP cíclico, lo que determina una disminución del $[Ca^{2+}]_i$ e inhibiendo el aparato contráctil (Arnold y cols, 1977; Waldman y Murad, 1988). La prostaciclina, un prostanoide que se sintetiza a partir del ácido araquidónico por medio de la enzima ciclooxigenasa, actúa de manera sinérgica con el NO a través de la adenilato ciclasa, induciendo el aumento del AMPc.

Se han descrito otras sustancias capaces de inducir relajación del músculo liso, como la insulina, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la adrenomedulina, anestésicos volátiles, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y el ión magnesio o, bien, situaciones fisiopatológicas como hipoxia (Karaki y cols, 1997). Los mecanismos de acción de estos agentes no se discuten porque escapan al dominio del modelo experimental de la presente tesis.

Disfunción Endotelial

La célula endotelial participa en la facilitación del paso de macromoléculas en forma bidireccional desde la sangre al los tejidos y de los tejidos a la sangre, estas células poseen una ubicación estratégica, participando en los cambios hemodinámicos, produciendo sustancias autocrinas y paracrinas frente a estímulos adecuados y desarrollando un balance entre los factores bioactivos para mantener la homeostasis vascular. La disfunción endotelial altera este balance, predisponiendo la pared del vaso a vasoconstricción, adherencia de leucocitos, activación de las plaquetas, mitogénesis, pro-oxidación, trombosis, deterioro en la coagulación, inflamación vascular y arteriosclerosis. La determinación de la función endotelial se refiere a la medición de la respuesta de la célula endotelial frente a un estímulo. En humanos se puede medir la vasorelajación endotelio dependiente en la circulación coronaria y periférica. En suma la medición de la función plaquetaria e inflamación y la activación de leucocitos, son formas

de medir la función endotelial. (Anderson y cols., 2003).

Desde la década del 1980 se ha demostrado que, entre otros, los factores de riesgo implicados en la aterogénesis, son capaces de activar y/o lesionar las células endoteliales. La pérdida parcial o total de las funciones de las células endoteliales se define como disfunción endotelial, pero en la literatura cardiovascular y, en el presente trabajo, la *disfunción endotelial* (DE) se define operacionalmente como "la pérdida parcial o total de la capacidad de relajación endotelio dependiente de la célula muscular lisa inducida por un agonista colinérgico", resultando en una menor o nula producción de NO en la célula endotelial.

Variados estudios han demostrado que la DE afecta a grandes y pequeños vasos (Minor, 1990). La DE suele ser un signo clínico temprano en la instauración de al menos una treintena de patologías (Calles-Escandon y Cipolla, 2001), existiendo una relación biunívoca entre la DE y la patología; la DE ha sido asociada a la hipertensión (Calver y cols., 1992; Panza y cols., 1993; Treasure, 1993; Iiyama y cols., 1996; Gokce y cols., 1999), diabetes mellitus (Johnstone y cols., 1993), aterosclerosis (Ludmer y cols., 1986; Mugge y cols., 1991) y dislipidemias (Sorensen y cols., 1994).

Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Existen varios tipos de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), aun cuando varían en su farmacocinética y farmacodinamia, estos poseen características en común tales como el hecho de que son ácidos orgánicos débiles, a excepción de un profármaco, la nabumetona.

Los AINEs poseen propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Desde las observaciones experimentales de Horton en 1963 y los trabajos de Vane (1971), Smith y Willis (1971) y Ferreira (1972), se ha reconocido que el mecanismo por el cual actúan los AINEs es la inhibición de la vía de la ciclooxigenasa (COX), la que realiza la conversión de ácido araquidónico a prostaglandinas (Figura 1).

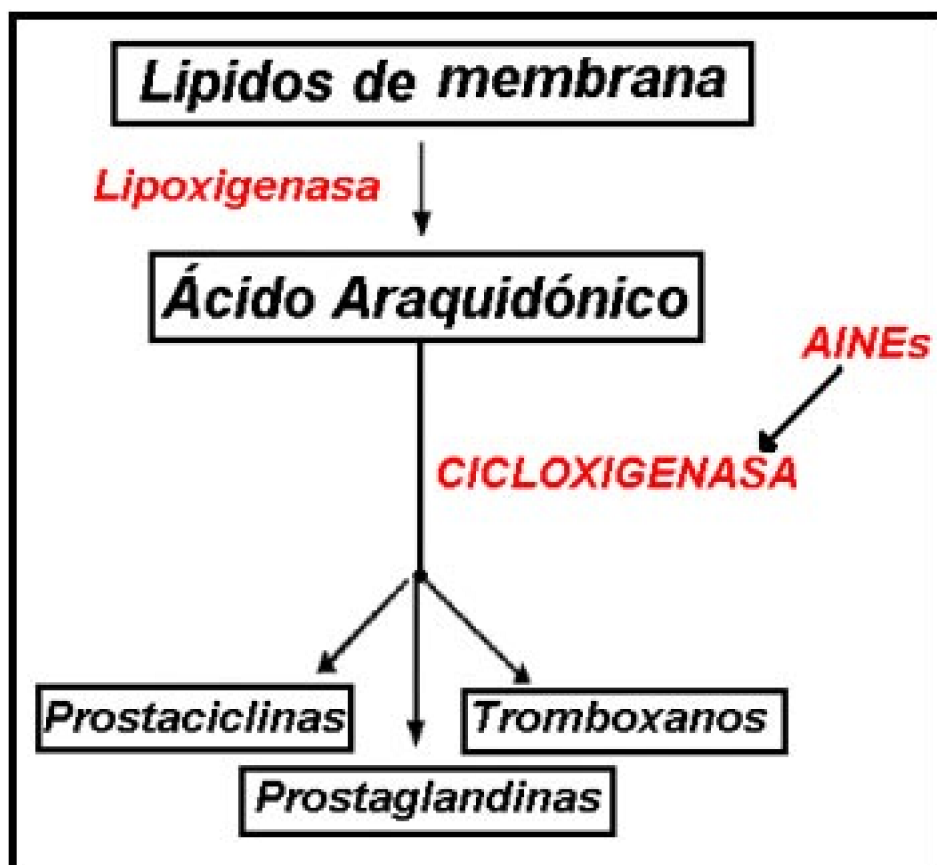


Figura 1. Esquema de la vía de síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico.

La farmacología de los AINEs está ampliamente estudiada y difundida (Flores, 1992; Katzung, 2001). La actividad antiinflamatoria de los AINEs es mediada por la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas. Varios tienen un mecanismo adicional, incluyendo la inhibición de la quimiotaxis, la regulación a la baja de la interleukina $\square 1$, reducción de la producción de los radicales superóxido, e interferencia en los eventos celulares mediados por calcio.

La aspirina acetila de manera irreversible y bloquea la ciclooxigenasa plaquetaria, pero los demás AINEs son inhibidores reversibles. Los AINEs más antiguos poseen selectividad variable e incompleta en relación a la inhibición de COX $\square 1$ y COX $\square 2$, pero existen en forma reciente inhibidores altamente selectivos para la isoforma COX $\square 2$.

La inhibición de la síntesis de la lipooxigenasa que efectúan los AINEs más recientes es limitada. De los fármacos disponibles actualmente, la indometacina y el diclofenaco reducen la síntesis tanto de prostaglandinas como de leucotrienos.

Los AINEs reducen la inflamación mediante la inhibición de la liberación de mediadores de granulocitos, basófilos y células plasmáticas, junto con disminuir la sensibilidad de los vasos a bradicinina e histamina, afectan la producción de linfocina de los linfocitos T y reducen la vasodilatación. Todos los AINEs poseen propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas en grado variable, y todos (excepto los fármacos selectivos COX $\square 2$) pueden inhibir la agregación plaquetaria y producir irritación gástrica.

Producen analgesia de intensidad leve a moderada, alcanzando un techo inferior a los analgésicos opiáceos. Su acción es producida por la inhibición de la síntesis periférica de prostaglandinas, que inhibe la acción sensibilizadora de los eicosanoides sobre las terminaciones nerviosas nociceptivas. En el efecto analgésico de los AINES interviene también una acción sobre el sistema nervioso central, al deprimir la excitación neuronal en el núcleo ventral del tálamo, algunos como el metamizol pueden aumentar la capacidad inhibitoria de la sustancia gris periacueductal sobre los mecanismos del dolor en el asta posterior de la medula espinal.

La acción antipirética sólo se manifiesta cuando la temperatura corporal está aumentada por la acción de pirógenos, es decir cuando hay fiebre, y salvo condiciones muy especiales no producen hipotermia. Los antipiréticos no bloquean la producción del pirógeno por parte de los macrófagos, ni la penetración del pirógeno en el sistema nervioso central. La administración de salicilatos disminuye el aumento de la temperatura provocada por pirógenos o por ácido araquidónico, pero no la provocada por prostaglandinas. A nivel neuronal, el salicilato recupera la actividad de las neuronas del área preóptica talámica anterior, área que está encargada de poner en marcha los mecanismos disipadores de calor y que responde con estimulación al aumento de temperatura.

Los AINEs se agrupan en distintas familias según su naturaleza química.

Salicilatos. Su núcleo fundamental es el ácido salicílico, tienen propiedades antipiréticas, antiinflamatoria y analgésica. El fármaco prototipo es la aspirina.

Paraaminofenoles. Son derivados de la anilina y el más utilizado es el paracetamol, destacan su acción antipirética y analgésica, aunque su actividad antálgica es de un efecto techo menor que el de los salicilatos.

Pirazolónicos. Se utilizan principalmente con fines analgésicos y antipiréticos, el metamizol o dipirona pertenece a este grupo.

Propiónicos. Todos presentan las tres acciones comunes de los AINEs; el primero de este grupo fue el ibuprofeno.

Antranílicos o Fenamatos. Poseen mayor capacidad analgésica de origen central. El Clonixinato de lisina es un representante de esta familia.

Derivados del ácido acético. Existen varias series de derivados, indolacéticos (indometacina), pirrolacético (ketorolaco), fenilacético (diclofenaco), piranoacético (etodolaco).

Enólicos. Tienen las acciones comunes de los AINEs y son una clase de ácidos ólicos entre los que se encuentra el piroxicam. El meloxicam posee una mayor selectividad anti COX-2.

Metanosulfonamidas. Se caracteriza por presentar acción antiinflamatoria, antipirética, analgésica y antioxidante. Produce menor irritación gástrica por ser más selectivo de la COX-2.

Inhibidores selectivos de COX-2. Son de reciente introducción y producen menor irritación gástrica. El prototipo de esta familia es el refecoxib.

Clonixinato de Lisina

El Clonixinato de Lisina (Clx) es un AINE ampliamente conocido, cuya administración es en forma oral y parenteral. Este fármaco pertenecería según algunos autores al grupo de los fenamatos, derivados del ácido fenil antralínico (Figura 2), que incluye el ácido mefenámico, ácido niflúmico, ácido meclofenámico y clonixino (Paeile y Saavedra, 1989); no obstante, otros autores lo clasifican como un grupo aparte de los fenamatos (Velasco y cols., 1992).

El Clx, aunque similar al ácido mefenámico, es más potente como analgésico que como antiinflamatorio, lo cual sugiere que puede actuar sobre el sistema nervioso central (Pellisier y cols., 1984). Su acción analgésica ha sido demostrada en diversos estudios clínicos, mostrándo eficacia en el tratamiento de dolores post-operatorios, cefaleas, neuralgias, odontalgias, dolores oncológicos, cólicos renales y dolores musculares (Finch y cols., 1971; Paredes y cols., 1986; Paredes y cols., 1988), con ciertas ventajas sobre otros agentes antiinflamatorios no esteroideos debido a su menor actividad de agregación plaquetaria (Ankel y cols., 1976) y una buena relación antiinflamatoria/ulcerogénica (Watnick y cols., 1971).

Desde el punto de vista farmacológico, el Clx tiene un proceso de absorción lento y prolongado. La concentración plasmática máxima de Clx en seres humanos se alcanza dos horas después de su administración. Al cabo de 24 horas, el 62% es excretado en la orina y el 1% en las heces (Katchen y cols., 1973).

En estudios post quirúrgicos y de parto, se ha evaluado la potencia analgésica del Clx, encontrándose que la administración oral de 600 mg es equianalgésica a la de 10 mg de morfina administrada parenteralmente (Finch y cols., 1971). Varios autores han señalado que aunque hay gran semejanza entre el efecto analgésico del Clx y los opiáceos, la acción central del Clx no es mediada por receptores opiáceos (Ferreira y cols., 1979; Bustamante y cols., 1989b; Willier y cols., 1989; Jurna y Brune, 1990).

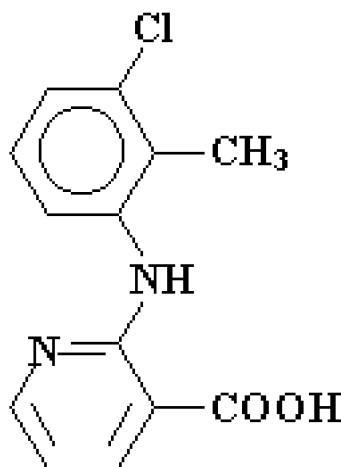


Figura 2. Estructura química del clonixinato de L-lisina.

Disfunción por AINEs

La administración *in vitro* de Clx (40 y 100 μM) produce una notable DE dosis dependiente en anillos de aorta de rata, modificando el pD_2 de la ACh en un valor cercano a dos (Cordero, 1996). Los mismos efectos han sido observados al utilizar los AINEs ketoprofeno, ibuprofeno y ketorolaco (Aguilera y Piñeiro, 1997). Sin embargo, la administración *in vitro* del bloqueador específico COX-1 indometacina, no reproduce la DE (Cordero, 1996). Resultados preliminares aún no publicados obtenidos en el Laboratorio de Farmacodinamia y Fitofarmacología (comunicación personal), han mostrado que células endoteliales de cordón umbilical humano incubadas durante 24 horas con Clx 40, 100 y 250 μM , expresan una menor actividad de la enzima eNOS y, que la cantidad de proteína eNOS determinada por Western Blot, es significativamente menor que en células control.

El conjunto de resultados parece indicar que la DE inducida por AINEs y, particularmente por Clx, estaría mediada por una disminución en la biodisponibilidad celular de eNOS y por ende, una menor producción de NO.

Flavonoides

Se clasifican en diez grupos de acuerdo a diferencias en su estructura química. Los grupos más importantes de los flavonoides son las proantocianidinas, flavonoles, flavonas, catequinas, epicatequinas y flavononas (Hertog y Cols., 1993). Los flavonoides poseen demostrada capacidad antioxidante y eliminan radicales libres como el anión superóxido, el oxígeno singlete y especies reactivas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno. Pueden, además, quelar metales a través de ligandos. Se ha demostrado que quercetina, un flavonol, puede inhibir *in vitro* la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), evitando la citotoxicidad de las LDL oxidadas (Hertog y Cols., 1993).

Vitis vinifera

La vid es una de las plantas con más larga data en la historia de la agricultura. Existen escritos egipcios del año dos mil cuatrocientos a.C. que señalan su cultivo, el que fue altamente desarrollado por las antiguas civilizaciones griegas y romanas. *Vitis vinifera* es una especie originaria de la región del Mar Caspio, en Asia Menor, e introducida posteriormente en Europa y al resto del mundo. De amplio y aceptado uso en la industria vitivinícola, la vid es una enredadera leñosa de la familia de las *Vitáceas*. Sus hojas son ovales con 4 ó 5 lóbulos; sus flores se agrupan en racimos, al igual que sus frutos

pulposos, siendo éstos de color verde, rojo o pardo o negro (Mullins, 1992).

Las proantocianidinas son polímeros de antocianidinas, conocidas como flavanoles (fig. 3). En hidrólisis ácida producen antocianidinas, como las cianidinas mostradas en la figura 3. Las proantocianidinas pueden polimerizar en dos a diez subunidades (flavan-3-ol); las proantocianidinas oligoméricas (PO), contenidas en el extracto seco de *Vitis vinifera*, son polímeros de cadena corta hidrosolubles (Bustamante, 2000; Bustamante y cols., 2003). Éstos se denominan también como taninos condensados o polímeros de catequina o de epicatequina, lo que aumenta la confusión en la literatura internacional de la ya compleja nomenclatura de los flavonoides.

Las PO son responsables de las propiedades astringentes de muchas frutas y verduras, como de la mayoría de las plantas de uso medicinal. El vino tinto contiene gran cantidad de PO complejas, describiéndose en la literatura polímeros de hasta 60 subunidades. La principal fuente natural de PO lo constituye el orujo y el tegumento de las semillas de la uva negra (*Vitis vinifera*), aunque también se les encuentra en gran cantidad en frutos y plantas de colores rojo, azul y púrpura (Mullins, 1992).

Las proantocianidinas poseen una alta capacidad antioxidante, son capturadoras de radicales libres e inhibidores de la peroxidación lipídica; se le han demostrado tanto propiedades vasorelajadoras (Andriambelison y Cols., 1997; Ajay y col., 2003) como hipotensoras (Diebolt y Cols., 2001). Adriambelison y cols., Investigaron los mecanismos por los cuales las PO inducen vasorelajación dependiente del endotelio en anillos de aorta torácica de rata, incubándolos durante 12 horas con toxina del pertussis, toxina del cólera, inhibidores de la síntesis de NO y bloqueadores de Ca⁺, sugiriendo la implicancia de mecanismos relacionados con el Ca⁺ extra celular y demostrando que la activación de las vías de la fosfolipasa C, la fosfolipasa A₂, la proteína kinasa C o la tirosina kinasa, pueden no estar implicadas. Diebolt y cols., Investigaron la hipotensión arterial inducida por las PO, administraron durante 7 días en forma intragástrica PO a ratas normotensas, observando una disminución progresiva en la presión arterial sistólica, las aortas de las ratas incrementaron la relajación endotelio dependiente en respuesta al estímulo de Ach, lo que se relacionó a un incremento en la actividad del NO endotelial y a mecanismos sensibles capturadores de anión superóxido.

Bagchi y cols., en 1997 determinaron en exposición aguda durante 15 minutos, la acción antioxidante de las PO, vitamina C, succinato de vitamina E, superóxido dismutasa, catalasa y manitol, frente a la generación bioquímica de anión superóxido, demostrando mediante análisis de iluminiscencia química y reducción del citocromo c, que las PO presentan un perfil antioxidante superior al exhibido por vitamina C y E, por sí solas o en conjunto.

Otros extractos, ricos en polifenoles, también han mostrado mayor capacidad antioxidante frente a vitamina C (Acuña y Zubiaguirre, 2002).

Varios estudios epidemiológicos revelaron una asociación inversa entre el consumo de flavonoides dietarios y la reducción en la ocurrencia de enfermedades cardiovasculares como infarto al miocardio (Hetog y col., 1993; Knert y col., 1996), en tanto que otros estudios más recientes muestran que el consumo de vino tinto, rico en polifenoles (Scalbert y Willianson 2000), podría tener un efecto protector contra

enfermedades cardiovasculares (Soares de Moura y Cols., 2002). Corder y cols. (2001) demostraron que los polifenoles del vino tinto disminuyen la síntesis de endotelina-1 en células endoteliales de aorta bovina en cultivos. Sin embargo, el uso del vino tinto en la prevención de enfermedades cardiovasculares es un tema controversial en la comunidad científica, por su contenido alcohólico.

Recientemente, se ha demostrado la acción protectora del extracto seco estandarizado de *V. vinifera* en la DE inducida por diabetes (Muñoz, 2002), donde el tratamiento por 15 días *in vivo* es capaz de revertir el deterioro funcional del endotelio vascular causado por la agresión de radicales superóxido, consecuencia de la hiperglicemia sostenida en diabetes tipo II.

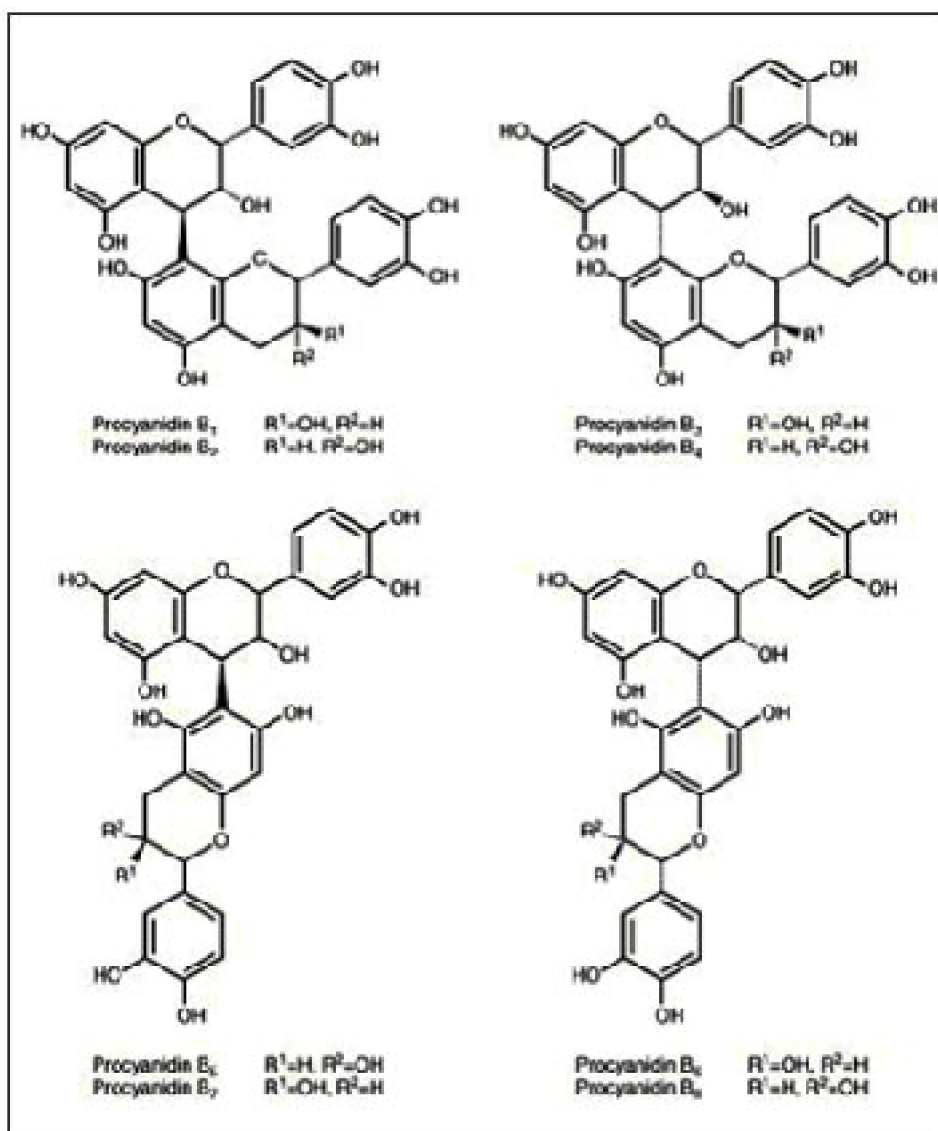


Figura 3. Estructura molecular de las 8 procianidinas contenidas en el extracto estandarizado de *Vitis vinifera*. Denominadas pocianidina B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇ y B₈, se diferencian en la disposición espacial de sus esqueletos carbonados y el grupo funcional en las posiciones R₁ y R₂.

Problema

Las células endoteliales vasculares controlan una variedad de funciones en la homeostasis cardiovascular, entre ellas, la mantención del tono del músculo liso vascular, la capacidad de adhesión y agregación celular, la síntesis y liberación de factores angiogénicos. Cuando una de estas capacidades de control endotelial se ven reducidas o, en otras circunstancias, abolidas, se habla de una disfunción endotelial. Siendo este un concepto que implica la alteración de muchas funciones, operacionalmente se suele definir el tipo de disfunción. Por tanto, en el presente trabajo de investigación, se definirá la disfunción endotelial (DE) como la capacidad anormal de relajación endotelio dependiente del músculo liso vascular inducida por un agonista colinérgico. La DE se considera una enfermedad que constituye la base de patologías cardio y cerebrovasculares de mayor gravedad, con riesgo vital en los casos más severos.

Por otra parte, se sabe que el uso indiscriminado de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), de venta libre, genera una serie de trastornos como efectos secundarios: desarrollo de úlcera gástrica y duodenal, fragilidad capilar vascular, problemas de hemostasia, entre otros, no sólo en Chile, sino que en el mundo occidental. En el Laboratorio de Farmacodinamia y Fitofarmacología se ha investigado la acción de un AINE, el Clonixinato de lisina (Clx) y su acción sobre el sistema cardiovascular, determinándose que, en concentraciones *in vitro*, equivalentes a la concentración plasmática alcanzada con dosis terapéuticas, se observa una notable DE en anillos aórticos de rata. Experimentos preliminares realizados en el Laboratorio de Farmacodinamia y Fitofarmacología, aún no publicados, sugieren que la DE inducida por AINEs sería consecuencia del atrapamiento del neuromodulador óxido nítrico (NO) o de

una menor disponibilidad de la enzima que lo produce, la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), descartándose una acción sobre la ciclooxigenasa e inhibición de la producción de prostaciclina, porque indometacina no induce DE. Sin embargo, el mecanismo de acción en la inducción de disfunción endotelial no ha sido aclarado.

Por otra parte, trabajos realizados en el laboratorio, han mostrado que el tratamiento con extracto seco de *Vitis vinifera*, estandarizado a 85% de proantocianidinas oligoméricas (EVv), es capaz de revertir significativamente la DE inducida por diabetes tipo 1 en ratas aloxanizadas. La DE inducida por diabetes es consecuencia al menos en parte del estrés oxidativo generado por la hiperglicemia, la que produce anión superóxido y radical hidroxilo en cantidades no controlables por el sistema antioxidante endógeno.

Por esta razón, es interesante poder estudiar si el EVv es capaz de evitar la DE inducida por AINEs, puesto que se podrá comparar la acción del extracto en dos situaciones de DE cuyo mecanismo de generación es diferente.

Justificación

Las enfermedades cardiovasculares ocupan un lugar relevante entre las causas de morbilidad y mortalidad a nivel nacional e internacional. En los últimos años se ha demostrado que en la génesis de los trastornos cardiovasculares subyace un fenómeno de estrés oxidativo, el cual es de desarrollo lento, pero muy agresivo a través de la generación patológica de especies reactivas del O₂ y N.

Recientemente se ha reconocido que la disfunción endotelial es un signo inequívoco del comienzo de enfermedades cardiovasculares más graves. El tratamiento farmacológico, abordado desde muchos aspectos, ha mostrado ser poco eficiente y asociado a efectos secundarios importantes. En tal sentido, la utilización de nuevas herramientas terapéuticas, como los fitofármacos, parecen ganar terreno.

La utilización de fitofármacos como por ejemplo *G. Biloba*, *H. Perforatum*, *V. Officinalis*, *A. Hippocastanum*, *R. Aculeatus*, ha ganado credibilidad por el hecho que se trabaja con medicamentos estandarizados, cuyo principio activo es un extracto vegetal, lo que permite la terapéutica. Se ha pasado de la fase II de estudios básicos a la fase III y IV, con estudios clínicos controlados multicéntricos y de doble ciego. Como consecuencia, se ha demostrado que los fitofármacos como el *H. Perforatum* en depresión leve a moderada, a igualdad de eficiencia que un medicamento alopático, posee mucho menos efectos adversos para el paciente. En este sentido, el extracto estandarizado de *V. vinifera*, que ha demostrado ser un poderoso antioxidante *in vitro*, atrapando radicales libres, al inducir enzimas antioxidantes o quelandometales (Bagchi y cols. 1997) y trabajos en el Laboratorio de Farmacodinamia y Fitofarmacología

demostraron recientemente que es capaz de revertir la disfunción endotelial inducida por diabetes, es de interés observar si el extracto puede ser capaz de antagonizar la disfunción endotelial inducida por el antiinflamatorio no esterooidal Clonixinato de Lisina, dado que los mecanismo por el cual se produce la disfunción endotelial en diabetes y por el uso de AINEs son diferentes. Esta investigación por tanto, da luces respecto del mecanismo de protección del extracto de *V. vinifera* en la disfunción endotelial y la prevención de la aparición de otras patologías de mayor gravedad.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la capacidad de prevención de la disfunción endotelial inducida por Clonixinato de Lisina del extracto seco estandarizado de *Vitis vinifera*.

Objetivos específicos

1. Reproducir un modelo experimental *in vitro* de disfunción endotelial en anillos aórticos de ratas incubados con el AINE Clonixinato de Lisina (Clx).
2. Determinar el efecto de la administración *in vitro* de un extracto seco estandarizado de *V. vinifera* en anillos aórticos de ratas incubados con Clx.

HIPÓTESIS

H_0 : El extracto seco estandarizado de *Vitis vinifera* previene el desarrollo de disfunción endotelial inducida *in vitro* por clonixinato de lisina en anillos aórticos.

H_1 : El extracto seco estandarizado de *Vitis vinifera* no previene el desarrollo de disfunción endotelial inducida *in vitro* por clonixinato de lisina en anillos aórticos.

MATERIALES Y METODOS

Tipo de estudio: Correlacional.

Tipo de hipótesis: Correlacional.

Diseño de investigación: Experimental *in vitro*.

Variables.

Variable dependiente :Disfunción endotelial.

Definición conceptual: Alteración en la función del endotelio.

Definición operacional: Cuantificación de la relajación vascular en respuesta a dosis crecientes de acetilcolina.

Variable Independiente: Extracto de *Vitis vinifera*.

Definición conceptual: Extracto liofilizado de *Vitis Vinifera* estandarizado por el Laboratorio Garden House a un 85% de proantocianidinas.

Definición operacional: Dosis necesaria para prevenir la disfunción endotelial. 5,35 ng/mL de extracto de *V. vinifera*.

Variables desconcertantes:

- Variación interpersonal en la preparación y ejecución del trabajo experimental.
- Variación interindividual de los animales de experimentación.

Las variables desconcertantes son controladas con el Grupo Control.

Animales

Se utilizaron 7 ratas Sprague-Dawley machos, con un peso promedio de 272,7 g (244 g–327 g), obtenidas del Bioterio Central de la Facultad de Medicina, mantenidas con alimentación normal y agua *ad libitum*, bajo las normas indicadas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicada por el National Institutes of Health (NIH publication 85-23, revised 1985).

Diseño experimental

Las ratas fueron aleatoriamente asignadas a tres grupos experimentales y sus anillos aórticos tratados *in vitro* como a continuación se detalla:

Grupo Control: Contracción con fenilefrina (FE) 1 μ M y relajación con concentraciones crecientes (1x10⁻⁸ M a 1x10⁻⁴ M) de acetilcolina (ACh). N=25.

Grupo 1: Contracción con FE 1 μ M y relajación con concentraciones crecientes de ACh. Incubación con clonixinato de lisina (Clx) 100 μ M por 10 minutos. Contracción con FE 1 μ M y relajación con concentraciones crecientes (1x10⁻⁸ M a 1x10⁻⁴ M) de ACh. N=9.

Grupo 2: Contracción con FE 1 μ M y relajación con concentraciones crecientes de ACh. Incubación por 10 minutos con 5,35 ng/mL de extracto estandarizado de *V. vinifera* seguido de Clx 100 μ M por 10 minutos. Contracción con FE 1 μ M y relajación con concentraciones crecientes (1x10⁻⁸ M a 1x10⁻⁴ M) de ACh. N=6.

Obtención y preparación de los segmentos de aorta

Las ratas se sacrificaron con una sobredosis de Halotano (Zeneca Laboratories, England), se les realizó una incisión torácica para extraer el segmento de aorta descendente, se limpió el segmento de aorta del tejido graso y conectivo que lo rodea, cuidando de no dañar el endotelio.

Desde el 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, los que a su vez fueron colocados en el interior de baños de vidrio de doble pared llenos con 10 ml de solución Krebs-Hensseleit modificada (KHm), termorregulados a 37,0 °C \pm 0,5 °C mediante un baño de recirculación (Lauda ThermoTemp, Suecia) y constantemente burbujeados con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Los anillos aórticos se fijaron mediante el hilo de sus ganchos al fondo del baño y el otro extremo a un transductor de fuerza-desplazamiento Grass FT-03, conectados a polígrafos Grass (modelos 7D y 5D) para la determinación de la contracción isométrica. 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, dimensionados en unidades de fuerza (mN), fueron expresadas como porcentaje de relajación respecto de la contracción máxima inducida por fenilefrina, estandarizado al peso seco de la aorta ensayada.

Contracción con fenilefrina (FE)

Después del período de estabilización, los anillos aórticos fueron contraídos con 1 μM FE hasta alcanzar su 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 seis 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 inducido por acetilcolina (ACh), como se describe más adelante.

Sólo los anillos aórticos que exhibieron contracciones superiores al mínimo de resolución poligráfica (4,90 mN) se consideraron en el estudio.

Relajación inducida por ACh

A los anillos aórticos precontraídos con FE 1 μM estabilizados en 10 mL de KHm, se les agregaron concentraciones crecientes de ACh (1×10^{-8} M a 1×10^{-4} M), para generar gráficos dosis-respuesta. Las alícuotas fueron calculadas considerando la corrección de volumen necesaria para la obtención de la concentración de ACh deseada en el baño de órgano.

Determinación del grado de disfunción endotelial

Se determinó el porcentaje de relajación inducida por ACh endotelio dependiente de los anillos aórticos de los grupos experimentales 1 y 2, a partir de las curvas de dosis-respuesta. Estos valores se compararon con aquellos determinados para el grupo control y entre ellos.

Se calcularon las concentraciones de ACh que produjeron el 25%, 50% y 75% de la respuesta de relajación (EC25, EC50 y EC75), para describir adecuadamente el comportamiento de la curva. Para ello se realizó un ajuste de curva polinomial (SWP5, Advanced Graphic Softwares, USA), lo que permitió interpolar dichos valores.

La interpolación de los EC25, EC50 y EC75, permitió determinar las concentraciones de ACh respectivas y comparar sus valores como medida de la DE observada.

Determinación de dosis de extracto de *Vitis vinifera*

Anillos aórticos, equivalentes a aquellos provenientes del grupo control, fueron precontraídos con FE 1 μM , a las que se les agregó una concentración única de EVv. Se buscó aquella concentración de EVv que no indujera una relajación *per se* mayor a un 10%.

Soluciones y reactivos

La composición de la solución KHm es la siguiente (en mM): NaCl 122,0; KCl 4,7; CaCl₂ 2,0; MgCl₂ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 15,0; glucosa 11,5; EDTA 0,026. El pH se ajustó a 7,40 con HCl 10% (v/v) o NaOH 0,1 N. L-fenilefrina-HCl, acetilcolina-HCl, y los reactivos necesarios para la solución KHm se obtuvieron del representante local de Sigma (Sigma-Aldrich Co., USA). Clonixinato de L-lisina (Laboratorios Grossman, México). El extracto seco estandarizado de semilla de *Vitis vinifera* (85% proantocianidinas p/p) se obtuvo de Laboratorios Garden House (Santiago, Chile). Los

fármacos y los reactivos se disolvieron en agua destilada o solución KHm.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio de las mediciones \pm el error estándar del promedio. La significancia estadística de las diferencias entre grupos experimentales se determinaron con la prueba *t* de Student. La significancia se estableció en $p < 0,05$.

RESULTADOS

La figura 4 muestra registros poligráficos de las respuestas contráctiles y de relajación de anillos aórticos representativos de los grupos control, 1 y 2 (figura 4A, 4B y 4C, respectivamente). Los registros poligráficos controles se caracterizaron por una contracción con una fase ascendente rápida seguida de una fase de evolución temporal más lenta hasta alcanzar una contracción máxima estable (CME) o de meseta; la CME del grupo control, alcanzó un valor de $10,64 \text{ mN} \pm 3,43 \text{ mN}$ (N=25). Las concentraciones crecientes de ACh indujeron relajaciones proporcionales a la concentración, alcanzando un valor de $97,89\% \pm 0,85\%$, respecto de la contracción máxima inducida por FE $1 \mu\text{M}$.

Los registros de los anillos aórticos incubados con Clx $100 \mu\text{M}$ (grupo 1), mostraron una alteración en la reactividad vascular y en la capacidad de relajación endotelio dependiente. Las contracciones máximas fueron significativamente menores ($7,62 \text{ mN} \pm 2,19 \text{ mN}$, N=9, $p < 0,05$), respecto del grupo control y, las relajaciones máximas inducidas por ACh alcanzaron un máximo de $85,43\% \pm 6,25\%$. Finalmente, los anillos aórticos incubados con Clx $100 \mu\text{M}$ en presencia de $5,35 \text{ ng/mL}$ de EVv (grupo 2), mostraron valores tanto de contracción ($13,96 \text{ mN} \pm 2,96 \text{ mN}$, N=6), como de relajación ($95,48\% \pm 3,79\%$, N=6), que no difirieron significativamente de aquellos del grupo control.

La adición de EVv en el rango de $1,34 \text{ ng/mL}$ a $13,37 \text{ ng/mL}$, indujo relajación dependiente de la concentración en anillos aórticos precontraídos con FE $1 \mu\text{M}$ (figura 5). Escogimos la concentración de $5,35 \text{ ng/mL}$ de EVv por inducir una relajación *per se* de sólo 10%, la que fue utilizada en los experimentos del grupo 2.

La figura 6 muestra las curvas de concentración-respuesta de los tres grupos

experimentales. El grupo control exhibe una relajación relativa dependiente de la concentración de ACh de aspecto sigmoideo, con una relajación máxima cercana al 97% (figura 6, anexo tabla I). La incubación con 100 μ M de Clx, modificó la relajación inducida por ACh de los anillos aórticos del grupo 1, mostrando un desplazamiento hacia la derecha, con una relajación máxima de 87% (figura 6, anexo tabla I), la que difiere significativamente del grupo control ($p < 0,01$). La incubación previa al Clx 100 μ M con 5,35 ng/mL de EVv, modificó la respuesta de relajación inducida por ACh, aumentando la sensibilidad al agonista colinérgico a valores comparables al control con concentraciones de ACh iguales y superiores a $2,5 \times 10^{-7}$ M (figura 6, tabla I anexo).

Para poder determinar el grado de DE, se interpolaron los valores de concentración de ACh que indujeron el 25%, 50% y 75% de la relajación máxima observada, de acuerdo al ajuste de curvas polinomial:

$$Y = a_0 + (a_1 / [1 + (X / a_2)^3])^3; \text{ (ecuación 1)}$$

donde Y representa la relajación relativa observada, X corresponde a $-\log[\text{ACh}]$ y a_0 , a_1 , a_2 y a_3 representan los coeficientes de la ecuación para cada uno de los grupos experimentales. El coeficiente de correlación, r , fue de al menos 0,9970 (anexo tabla II). La evaluación de la ecuación (1) para $Y = 25, 50$ y 75 , dió por interpolación los valores del EC25, EC50 y EC75, respectivamente (ver tabla I).

Los anillos aórticos del grupo 1 muestran una significativa DE, con cambios en la sensibilidad a ACh que se reflejan en los valores de EC25, EC50 y EC75 respecto del grupo control. Sin embargo, estos valores son menos significativos para el grupo 2, donde los valores de sensibilidad a ACh reflejan una menor DE (EC50 y EC75).

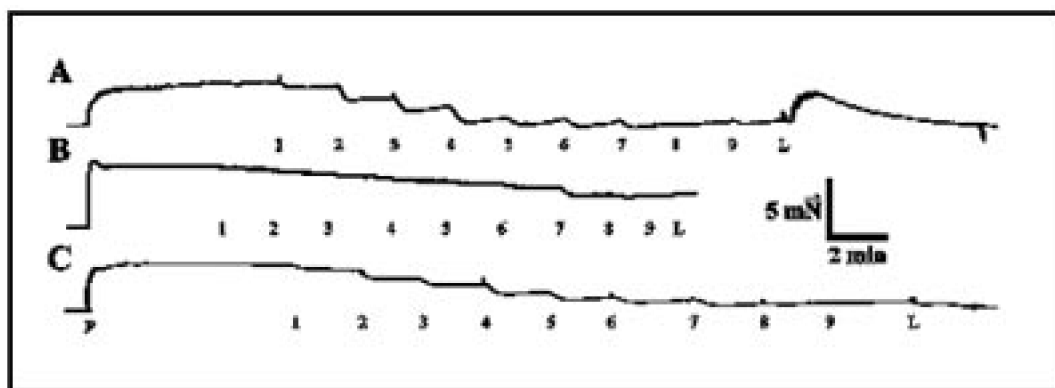


Figura 4. Registro poligráfico de anillos aórticos contraídos con fenilefrina $1 \mu\text{M}$ y relajados con concentraciones crecientes de acetilcolina. Los anillos aórticos se contrajeron con fenilefrina $1 \mu\text{M}$ (F) y se relajaron agregando alícuotas sucesivas de acetilcolina (1×10^{-8} a 1×10^{-4} M). Contracción y relajación de un anillo aórtico representativo del grupo control(A), grupo 1(B) y grupo 2(C). (L= lavado de la preparación con solución KHM 37°C PH =7.40). Calibración horizontal 2 minutos, calibración vertical 5mN.

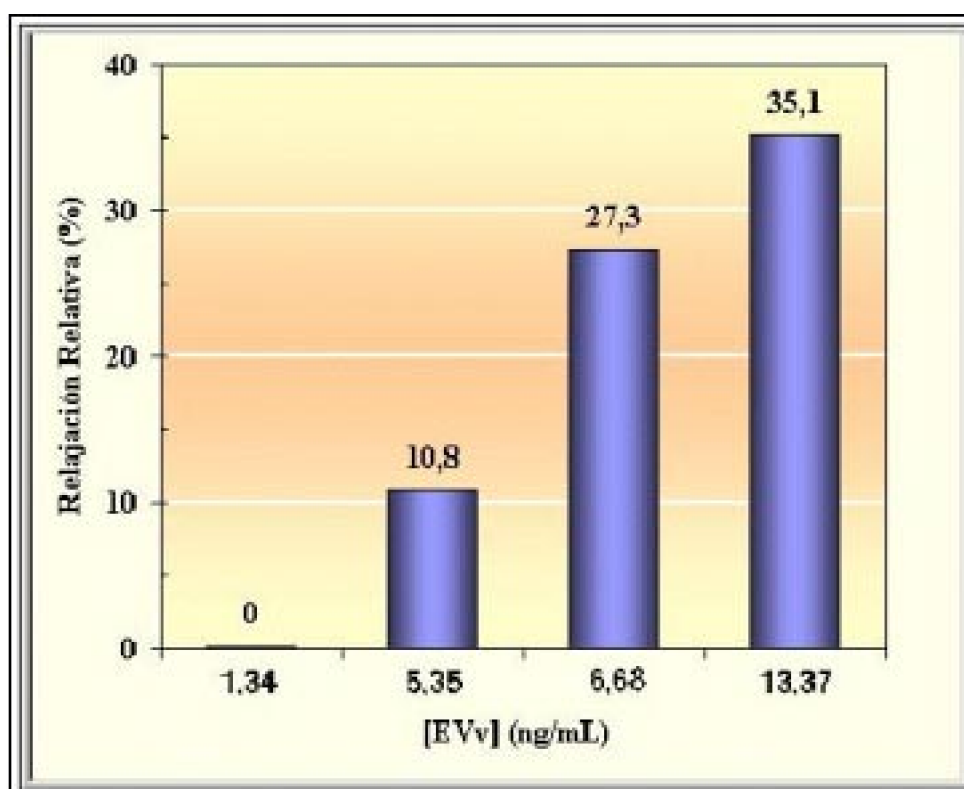


Figura 5. Relajación relativa endotelio dependiente de anillos aórticos de ratas normales en función de la concentración del extracto estandarizado de *V. vinifera*. Los anillos aórticos fueron precontraídos con FE 1 μ M hasta alcanzar la contracción máxima estable; luego se agregó una concentración única de EVv (1.34, 5.35, 6.68 ó 13.37 ng/mL), determinando la relajación máxima observada.

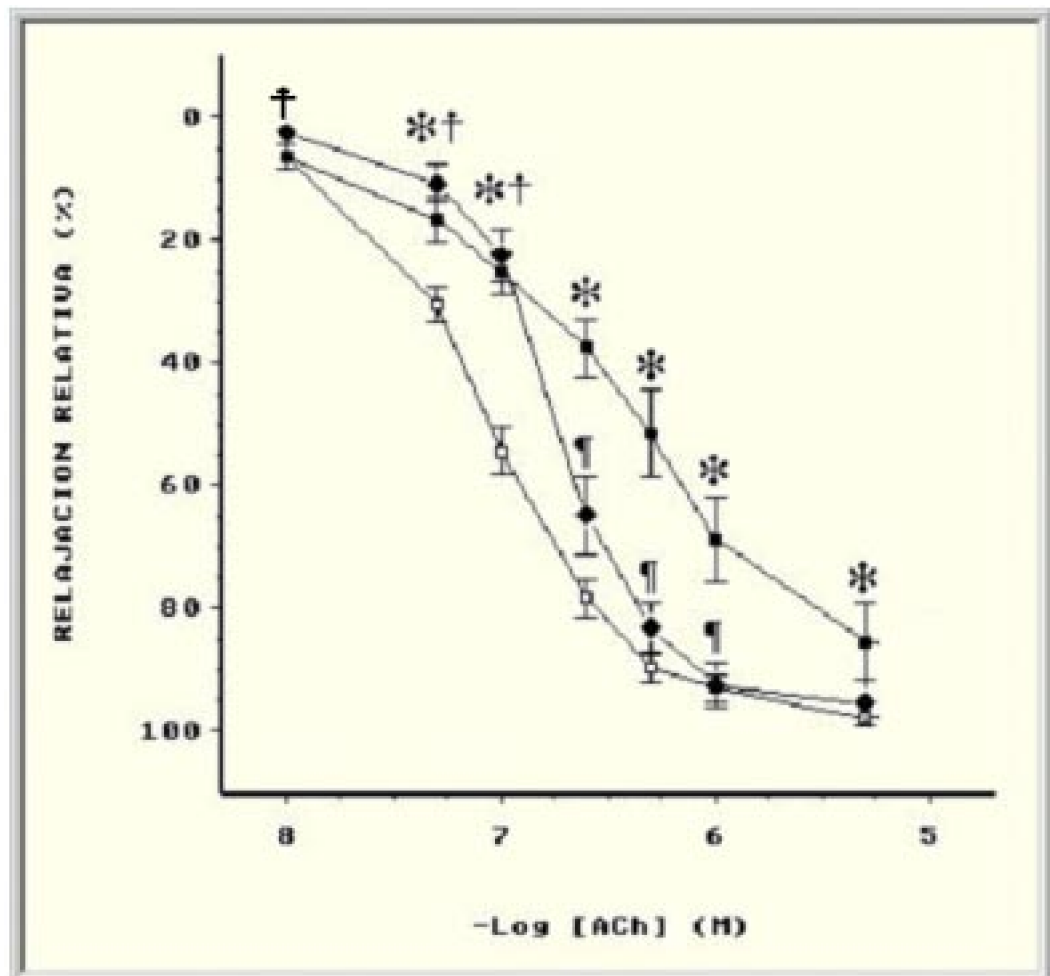


Figura 6.- Curvas de relajación en función de la concentración de acetilcolina. Los anillos aórticos del grupo control (-□-, N=25) relajaron de modo sigmoideo alcanzando una relajación máxima de 97,89% ± 0,85%. El grupo 1 (-■-, N=9) muestra una cinética sigmoidea alcanzando una relajación máxima de 85,43% ± 6,25% (concentración de ACh 5×10^{-6} M). El grupo 2 (-◆-, N=6) muestra una cinética sigmoidea alcanzando una relajación máxima de 95,48% ± 3,79%. (Ver anexo Tabla I). * Control v/s, Grupo 1 ($p \leq 0,01$), † Control v/s, Grupo 2 ($p \leq 0,05$). ‡ Grupo 2 v/s Grupo 1 ($p \leq 0,05$).

Tabla I. Porcentajes de relajación máxima y concentraciones de efecto 25 (EC25), 50 (EC50) y 75 (EC75) de anillos aórticos del grupo control y del grupo 2. El porcentaje de relajación máxima se obtuvo para una concentración de acetilcolina de 5×10^{-6} M. Los EC25, EC50 y EC75 se determinaron por interpolación de los valores de concentración de ACh que indujeron el 25%, 50% y 75% de la relajación máxima, respectivamente, respecto de la contracción máxima inducida por fenilefrina $1 \mu\text{M}$ (ecuación (1), para el mejor ajuste de curvas polinomial). El pD2 equivale a $-\log \text{EC } 50$ de ACh.

	Grupo Control N=25	Grupo 2 N=6
pD2	7,04	6,73
EC50 (M)	$9,10 \times 10^{-8}$	$18,8 \times 10^{-8}$
EC25 (M)	$3,88 \times 10^{-8}$	$10,3 \times 10^{-8}$
EC75 (M)	$2,01 \times 10^{-7}$	$3,42 \times 10^{-7}$
E_{max} (%)	$97,89 \pm 0,85$	$95,48 \pm 3,79$

DISCUSIÓN

Reprodujimos un modelo de inducción de disfunción endotelial, que nos permitió evaluar la capacidad de protección del extracto *Vitis vinifera* sobre el daño endotelial inducido por el AINE Clx.

La relajación de los anillos aórticos del grupo 1, exhibieron una alteración del endotelio vascular en la sensibilidad a ACh (desplazamiento de la curva a la derecha de la curva control), lo mismo que en su eficacia (efecto máximo). La alteración de ambos parámetros en la cinética de relajación de la curva concentración-respuesta, evidencia el desarrollo agudo de DE (12,5%) en nuestro modelo, de acuerdo a lo reportado anteriormente (Cordero, 1996). No es posible establecer comparaciones entre los valores de EC50 del grupo 1 con los demás grupos experimentales, ya que, al poseer diferentes efectos máximos, los valores de EC no son comparables.

El tratamiento previo con EVv previno la DE a concentraciones mayores de $2,5 \times 10^{-7}$ M de ACh. El tratamiento con EVv, modificó el pD2 del grupo 2 a 6,73, es decir un cambio de 1,04 veces, respecto del valor control. A concentraciones superiores de ACh, como aquellas del percentil 75 (EC75), demuestran que el tratamiento con EVv puede restaurar la sensibilidad a ACh a valores estadísticamente iguales respecto del valor control, lo que implica que se ha prevenido el desarrollo de DE por el tratamiento con EVv. Así, a una concentración de ACh de 5×10^{-6} M, indujo una relajación 2,41% menor que la del grupo control y cinco veces menor que la del grupo con Clx.

Determinaciones anteriores del pD2 de ACh (control) y aortas tratadas con Clx muestran valores similares a los reportados en la presente tesis (Cordero, 1996), lo que

permite comparar los resultados obtenidos con EVv con mejor base. Así, los resultados aquí obtenidos, muestran que el tratamiento agudo *in vitro* con Clx puede producir una DE importante, misma que es significativamente prevenida por el tratamiento con EVv. No obstante, el diseño experimental no nos brinda la posibilidad de especular respecto de los mecanismos de acción subyacentes.

Los mecanismos por los cuales el Clx afecta la relajación del músculo liso vascular no son conocidos. Desde un punto de vista farmacológico, la DE observada *in vitro* en presencia de Clx sería consecuencia directa del principio activo del medicamento, el clonixinato, ya que la lisina, parte conjugada del medicamento no ha demostrado reproducir los efectos de alteración de la función endotelial vascular (Cordero, 1996). Estudios preliminares, aún no publicados y realizados en el Laboratorio de Farmacodinamia y Fitofarmacología, han mostrado que la DE inducida por Clx podría deberse a una disminución en la disponibilidad de la eNOS, afectando el tRNA o al mRNA, en células de cordón umbilical humanas incubadas durante 24 horas.

Otro mecanismo por el cual el Clx podría inducir disfunción endotelial sería el bloqueo de la acción de derivados del ácido araquidónico como la prostaciclina, con notable efecto vasorrelajador. Este efecto es reproducido por otros AINEs como ketoprofeno e ibuprofeno (Aguilera y Piñeiro, 1996). Sin embargo, no es posible generalizar esta acción a todos los AINEs, incluido el Clx ya que indometacina, un bloqueador selectivo de la enzima COX-1 no induce disfunción endotelial (Cordero, 1996).

El tratamiento *in vitro* con EVv previo a la incubación con Clx, evitó la manifestación de la DE en los anillos aórticos del grupo 2. Al igual a lo observado anteriormente (Muñoz, 2002), EVv fue capaz de prevenir la disfunción endotelial significativamente. El mecanismo de protección de EVv no se ha dilucidado aún y parece ser más bien múltiple (Bustamante y cols., 2003). Existe un efecto vasorrelajador *per se* de *V. vinifera*, que es dependiente de endotelio (Aldini y cols., 2003); nuestros resultados son consistentes con los descritos en la literatura, aunque el rango de concentraciones no parece concordar. Nosotros observamos relajación con concentraciones tan bajas como 5,35 ng/mL, alcanzando un 35% de relajación con 13,37 ng/mL. Aldini y cols. (2003), muestran curvas de relajación endotelio dependientes con procianidinas en el rango 1 µM a 50 µM. Si bien los rangos son los usuales para otros fármacos con actividad vasorrelajante, no resulta simple poder comparar los rangos nuestros con los descritos, primero porque el extracto que utilizamos está estandarizado en proantocianidinas, que por hidrólisis genera procianidinas. Segundo, el extracto usado por Aldini y cols., es una mezcla de polifenoles (ácido gálico, catequina, epicatequina y polímeros de galatos) y no está especificado la molaridad de las especies individuales.

Sin embargo, se sabe que el extracto de *V. vinifera* puede inducir vasorrelajación a concentraciones muy bajas. Cordero y cols. (2001), mostraron que *V. vinifera* inhibe la transcripción del gen de la endotelina-1, un poderoso agente constrictor, induciendo la relajación del músculo liso vascular, con un tiempo de exposición de 6 horas.

El EVv ha demostrado ser efectivo en la reversión de la DE en aortas de ratas diabéticas tipo I, donde la DE es consecuencia al menos en parte del ataque de especies

radicales derivadas del oxígeno (radical hidroxilo y anión superóxido). EVv parece actuar por la captura de radicales libres y así disminuir el daño al endotelio vascular (Muñoz, 2002). No obstante, nuestro diseño experimental no permite discriminar una acción antioxidante.

Finalmente, dada la condición de venta libre de los AINEs como Clx, ketoprofeno e ibuprofeno, y el hecho cierto de la automedicación en nuestra sociedad, hace altamente probable que los consumidores utilicen AINEs, o combinaciones de ellos, para dolencias tan disímiles como el alivio de los malestares asociados al resfrió, cefaleas, fiebre y, en número no menor, de modo abiertamente crónico (aspirina en la prevención del reinfarto, artritis). El uso crónico de AINEs conlleva a efectos secundarios cardiovasculares que se asocian a la DE y de aquí, a alteraciones de la presión arterial.

Es ampliamente aceptada la acción protectora de las procianidinas sobre la prevención de enfermedades cardiovasculares (Frankel y col., 1993; Diebolt y cols., 2001; Bustamante, 2003), principalmente por su acción antioxidante. A la luz de los resultados, el extracto usado en nuestro estudio, con un 85% de proantocianidinas oligoméricas, se perfila no solo como un importante fitofármaco en la prevención de cardiovascular, sino en la prevención de la DE por el uso crónico de AINEs.

CONCLUSIONES

El extracto seco estandarizado de *Vitis vinifera* protege la disfunción endotelial inducida *in vitro* por clonixinato de lisina en anillos aórticos de rata.

PROYECCIONES

Los resultados obtenidos en este estudio, el cual muestra la capacidad preventiva del extracto seco estandarizado de *Vitis Vinifera* sobre la disfunción endotelial inducida por AINEs, podrían orientar a la ejecución de estudios clínicos, implementando el tratamiento con modelos de enfermedades crónicas que afecten al tejido cardiovascular; esto conduciría a posibles terapias combinadas entre AINEs y fitofármacos, ya que se podría reducir los efectos secundarios de los AINEs sobre el endotelio vascular.

Es importante destacar que cada día los fitofármacos adquieren mayor importancia debido a su menor número de reacciones secundarias, por lo que es muy importante seguir desarrollando investigaciones en esta área para así mejorar, perfeccionar y descubrir nuevos usos terapéuticos de estos fármacos.

Finalmente, consideramos que el conocimiento de estos fitomedicamentos, podría ser una herramienta útil en el quehacer de los kinesiólogos, ya que son medicamentos OTC, de venta directa, y que pueden ser recomendados por cualquier profesional de la salud.

Referencias y BIBLIOGRAFÍA

- 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 en Kinesiología, Escuela de Kinesiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- Adams MR, Foryth C, Rombinson J.** 1994. Oral L-arginine in humans: effects on platelets aggregation hemodynamics and endothelium-dependent dilation. *Circulation*,1:138.
- Aguilera R, Piñeiro S.** 1997. Efecto de ketoprofeno e ibuprofeno sobre la relajación vascular endotelio dependiente en aorta de rata. Tesis de Título Cirujano Dentista. Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
- 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.
- Anderson T, Buchanan M, Verma S.** 2003. Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. *Circulation*, 108: 2054-2059.
- 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 aort. *Br. J. Pharmacol.* 120: 1053-1058.
- 6. Ankel Y.S. y Schroggle J.J.** 1976. Effect of clonixin and aspirin on pletelet

- aggregation in human volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 16: 30-33.
- Arnold WP, Mittal CK, Murad F.** 1977. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74:3203-3207.
- Bagchi D, Krohn R, Garg A, Balmoori J, Bagchi M, Bagchi DJ, Tran M, Stohs S.** 1997. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*. *Res. Commun. Molec. Pathol. Pharmacol.* 95: 170-189.
- Barnes PJ.** 1996. NO or no NO asthma?. *Thorax* 51: 218-220
- Boulanger CM, Vanhoutte PM.** 1994. The endothelium: a pivotal role in health and cardiovascular disease. *Servier*, Francia. Ed. Houston, EEUU. 68: 6-53, Junio.
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH.** 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351: 714-718.
- Bustamante SE.** 2000. Extracto de *Vitis vinifera*. Monografía. Vademecum de Medicamentos de Venta Directa (sin receta) OTC y Fitofármacos. III 12#15. Ediciones y Comunicaciones Ltda.
- Bustamante SE, Figueroa H, Morales MA.** 2003. Bases farmacológicas y clínicas del extracto de *Vitis vinifera* en patologías asociadas al estrés oxidativo. *Rev de Fitoterapia*, 3(2): 135-146.
- Bustamante D, Miranda HF, Pellisier T, Paeile C.** 1989a. Analgesic action of clonixin, nifedipine y morphine using the foermalin test. *Gen. Pharmacol.* 20 :319-322.
- Bustamante D, Morales M, Pellisier T, Saavedra H, Miranda HF, Paeile C.** 1989 b. Experimental cardio-depressant effects of clonixin. *Gen. Pharmacol.* 20: 605-608.
- Calver A, Collier J, Moncada S, Vallance P.** 1992. Effect of local intra-arterial N^G -monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. *J Hypertens* 10: 1025-1031.
- Calles-Escandon J, Cipolla M.** 2001. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocrine Rev.* 22: 36-52.
- Chuman AJ, Krishma MT, Holgate ST.** 1996. A etiology of asthma: how public health and molecular medicine work together. *Molecular Med Today*;2(5):192-7
- Cooke JP.** 1992. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 90:1168.
- Cooke JP, Dzau VJ.** 1997. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation* Jul 15;96(2):379-82.
- Cordero L.** 1996. Efecto del clonixino e indometacina en la relajación dependiente de endotelio en aorta de rata. Tesis de Título Cirujano Dentista. Facultad de Odontología, Universidad de Chile
- Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Santos ACV, Wood EG, Carrier MJ.** 2001. Endothelin-1 synthesis reduce by red wine. *Nature* 414:863-864
- Culotta E, Koshland DE Jr.** 1993. NO news is good news *Science* 258: 1862-1863.
- Dawson VL, Dawson TM.** 1996. Nitric oxide in neural degeneration. *Proc Soc Exp Biol*

Med 211(1):33-7

- Diebolt M, Bucher B, Adriantsitohaina R.** 2001. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension* 38: 159-165.
- Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH.** 1994. Endothelial nitric oxide synthase localized in hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 4214-4218.
- Ferreira SG, Lorenzitti BB, Correa F.** 1978. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur. J. Pharmac.* 53:39-48.
- Ferreira S.H.** 1972. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature* 240:1139-1142.
- Finch JS, De Kornfeld TJ.** 1971. Clonixin: a clinical evaluation of a new oral analgesic. *J. Clin. Pharmacol.* 11: 371-377.
- Flores J, Armijo J, Mediavilla A.** 1992. *Farmacología Humana*, segunda edición. Ediciones científicas y técnicas S.A. Barcelona, España. Pag. 315-341. Capítulo 24.
- Forstermann U, Kleinert H.** 1995. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 352: 351-364.
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE.** 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet* 341: 454-457
- Furchgott RF, Zawadzki JV.** 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 286:373-76
- Furchgott RF.** 1993. Introduction to EDRF research. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 (Suppl 7) :S1-2
- Gokce N, Holbrook M, Biegelsen ES, Duffy SJ, Hunter LM, Swerdloff PL, Vita JA.** 1999. Conduit artery endothelial function is impaired equally in white and African-American hypertensives (Abstract). *Circulation* 100: I-834.
- Gross SS, Jones CL, Hattori Y, Raman CS.** 2000. Tetrahydrobiopterin: an essential cofactor of nitric oxide synthase with an elusive role. In: *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*. San Diego, CA: Academic, p. 167-187.
- Hertog M, Feskens E, Hollman P, Katan M, Kromhout D.** 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342:1007-1011.
- Horton EW.** 1963. Action of PGE1 on tissues which respond to bradykinin. *Nature* 200,982-987.
- Houston DS, Buchhaamn MR.** 1994. Insuficiencia de endotelio derivado relajante en la función de plaquetas y hemostasia in vivo. *Trom Res* 74:25
- 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.
- Ignarro LJ.** 1989. Endothelium-derived nitric oxide: action and properties *FASEB*,3: 31.

- Iiyama K, Nagano M, Yo Y, Nagano N, Kamide K, Higaki J, Mikami H, Ogihara T. 1996. Impaired endothelial function with essential hypertension assessed by ultrasonography. *Am Heart J* 132: 779-782.
- Johnstone, MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, and Creager MA. 2003. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 88: 2510-2516
- Jurna I, Brune K. 1990. Central effect of the non-steroid anti-inflammatory agents, indomethacin, ibuprofen, and diclofenac, determined in C fibre-evoked activity in single neurones of the rat thalamus. *Pain* Apr;41(1):71-80.
- 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.
- Kato K, Zorunski CF. 1993. Nitric oxide inhibitors facilitate the induction of hippocampal long-term potentiation by modulating MNDA receptors. *J Neu-rophysiology* 70:1269-73.
- Katchen B, Buxbaum S, Ning J. 1973. Disposition of clonixin 2-(3- chloro – 0 – toloudin) Nicotic acid in human. *J. Pharmacol. Exp. And Therap.* 187: 152-153.
- Katzung B. 2001. 8° edición. *Farmacología Básica y Clínica*. México El Manual Moderno.
- Knert P, Järvinen A, Reunanen J, Maatela R. (1996). Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: A cohort study. *Br. Med. J.*, 312: 478-481.
- Knowles RG, Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298: 249-258.
- Kobzik L, Brecht DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugar-baker B, Stamler JS. 1993. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 9: 371-377.
- Kobzik L, Reid MB, Brecht DS, Stamler JS. 1994. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372: 546-548.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN. 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4651-4655.
- Kuriyama H, Kitamura K, Nabata H. 1995. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol. Rev.* 47: 387–573.
- Kwon NS, Nathan CF, Stuehr DJ. 1989. Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J Biol Chem* 264: 20496-20501.
- Liu S, Adcock I, Old R, Barnes P, Evans T. 1993. Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 1208-1213.
- Liu X, Miller MJS, Joshi M, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, Lancaster JR. 1998. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem*, 273: 18709-18713.
- Llew. 1995. Sleep as a model behavior for the study of central nervous system- immune

- interactions (Part 2). *Advances in neuroimmunology* 5(2):134-6.
- Long D, Smith JA, Lewis MJ.** 1993. Induction of calcium independent NO synthase by hypercholesterolaemia in the rabbit. *Br J Pharmacol* 108:290
- Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW.** 1986. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315: 1046-1051.
- Mayer B, Hemmens B.** 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 22: 477-481.
- McCann SM, Rettori V.** 1996. The role of nitric oxide in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 211(1):7-14
- McDaniel ML.** 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exper Biol Med* 211(1):24-32
- Michel T, Xie OW, Nathan C.** 1996. Molecular biological analysis of nitric oxide synthases. In: Feelisch M, Stamler J (eds) *Methods in Nitric Oxide Research*. John Wiley and Sons. NY, 161- 175
- Minor RLJ.** 1990. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxide from rabbit aorta. *J Clin Invest* 86:2109-2116
- Moncada S, Higgs A.** 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329:2002-12
- Mondaca S, López Jaramillo P.** 1992. Función de la pared vascular. Prostaciclina y óxido nítrico. *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*, Vol III, Salamanca.
- Mugge A, Elwell JH, Peterson TE.** 1991. Chronic treatment with polyethylene glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxation in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 69: 1293-1300
- Mullins MG.** 1992. Biology of the grapevine (biology of horticultural crops). Ed. Cambridge University Press. pp 37-80.
- 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.
- Ortega A, De Artiñano MA.** 1997. Caracterización y patofisiología de las endotelinas. *Clin Cardiol* 15: 29-42
- Paeile y Saavedra.** 1989. *El Dolor: aspectos basicos y clinicos*. Editorial mediterraneo, Santiago de Chile.
- Palmer RM, Ferridge A, Moncada S.** 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S.** 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature (Long)* 333:664-6.
- Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, 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
- Polamowska G.** 1994. Role of cyclic nucleotides in rapid platelets adhesion to collagen. *Bloos* 83:2508. 40.

- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S.** 1987. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 2: 1057-1058
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S.** 1990. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5193-5197.
- Radomski NW, Sales E.** 1995. Nitric oxide. Biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 118:69-80
- Remezal M.** 1994. Etiopatogenia endotelial de la hipertensión. *Rev Sistole* 152:24-5
- Scalbert A, Williamson G.** 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073s-2085s.
- Schulz R, Nava S, Moncada S.** 1992. Induction and potential relevance of a Ca^{2+} -independent nitric oxide synthase in the myocardium. *J Pharmacol* 105: 575-580.
- Smith JB, AL Willis.** 1971. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat. New. Biol.* 231: 235-237.
- Soares De Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmao Correia ML.** 2002. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a *vinifera* grape skin extract. *J Pharm Pharmacol* Nov;54(11):1515-20
- Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE.** 1994. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. *J Clin Invest.* Jan;93(1):50-5
- Tayeh MA, Marletta MA.** 1989. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate: tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem* 264: 19654-19658
- Treasure CB, Klein JL, Vita JA, Manoukian SV, Renwick GH, Selwyn AP, Ganz P, Alexander RW.** 1993. Hypertension and left ventricular hypertrophy are associated with impaired endothelium-mediated relaxation in human coronary resistance vessels. *Circulation* 87: 86-93.
- Tsao PS, Thelimeier G, Singer AH, Leung LLK, Coke JP.** 1994. L-arginine attenuates platelets reactivity in hyper-cholesterolemic rabbits. *Arterioscler Trom* 14:1529.
- Vane JR.** 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* 231,232-235.
- Vaughn MW, Kuo L, Liao JL.** 1998. Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation. *Heart Circ Physiol* , 43: H1705-H1714.
- Velasco A, Lorenzo P, Serrano JS, Andres-Telles F.** 1993. *Farmacología.* 16° edición. Editorial interamericana Mc Graw Hill, España, Pag.471-496. Capítulo 29.
- 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
- Weston AH, Edwards G.** 1992. Recent progress in potassium channel opener

pharmacology. *Biochem. Pharmacol.* 43: 47–54.

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 Ca²⁺ channels. *J Hypertens* 6: (Supl):188-191

ANEXOS

Tabla I. Porcentaje de relajación relativa dependiente de endotelio en función de concentraciones crecientes de acetilcolina sobre anillos aórticos *in vitro* de los diferentes grupos tratados (Ver figura 6).

[ACh] en el baño de órgano		Relajación Relativa (%)		
Molar	-Log [ACh]	Control N=25	Grupo 1 N=9	Grupo 2 N=6
$1,0 \times 10^{-8}$	8,0	6,51 ± 0,93	6,24 ± 2,03	2,44 ± 0,67 ¶
$5,0 \times 10^{-8}$	7,3	30,45 ± 2,91	16,40 ± 3,67 *	10,72 ± 3,10 ¶ (p<0,01)
$1,0 \times 10^{-7}$	7,0	54,45 ± 3,87	25,29 ± 3,46 *	22,46 ± 4,28 ¶ (p<0,001)
$2,5 \times 10^{-7}$	6,6	78,37 ± 3,18	37,51 ± 4,69 *	64,86 ± 6,24 † (p<0,01)
$5,0 \times 10^{-7}$	6,3	89,83 ± 2,37	51,46 ± 7,18 *	83,22 ± 4,16 † (p<0,01)
$1,0 \times 10^{-6}$	6,0	93,06 ± 2,14	68,75 ± 6,97 *	92,59 ± 3,82 †
$5,0 \times 10^{-6}$	5,3	97,89 ± 0,85	85,43 ± 6,25 *	95,48 ± 3,79

* Control v/s, Grupo 1 (p<0,01), ¶ Control v/s, Grupo 2, † Grupo 2 v/s Grupo 1.

Tabla II. Valores de los coeficientes de la ecuación obtenida por el ajuste de curvas polinomial $Y = a_0 + (a_1 / [1+(X/a_2)^3])$ a partir de los datos de los tres grupos experimentales y sus respectivos coeficientes de correlación r.

Determinación del efecto del extracto seco estandarizado de *Vitis vinifera* en la disfunción endotelial inducida por Clonixinato de lisina.

Grupo	a_0	a_1	a_2	a_3	Coefficiente Correlación r
Control	0,541317	96,260316	7,058559	22,103801	0,999203
Grupo 1	3,346993	87,142060	6,429757	14,121271	0,997890
Grupo 2	2,337892	92,757809	6,738671	31,148178	0,999085