



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
ESPECIALIDAD EN BIOQUÍMICA CLÍNICA
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO



**EFFECTO DEL RESVERATROL SOBRE NIVELES SÉRICOS DEL FACTOR
DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA Y LA ATEROGÉNESIS EN
CONEJOS MACHOS NUEVA ZELANDA SOMETIDOS A UNA DIETA
HIPERCOLESTEROLÉMICA.**

Trabajo presentado ante la Ilustre Universidad de Carabobo para optar al título de
Especialista en Bioquímica Clínica

Autor:

Lcda. Jessika Jiménez

Tutor:

Dra. Leticia Figueira

Valencia, diciembre del 2017.



ACTA DE DISCUSIÓN DE TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

En atención a lo dispuesto en los Artículos 127, 128, 137, 138 y 139 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 135 del citado Reglamento, para estudiar el Trabajo Especial de Grado titulado:

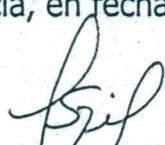
EFFECTO DEL RESVERATROL SOBRE NIVELES SÉRICOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA Y LA ATEROGÉNESIS EN CONEJOS MACHOS NUEVA ZELANDA SOMETIDOS A UNA DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA

Presentado para optar al grado de **Especialista en Bioquímica Clínica** por el (la) aspirante:

JIMENEZ Z., JESSIKA Y.
C.I. V – 18343962

Habiendo examinado el Trabajo presentado, bajo la tutoría del profesor(a): Leticia Figueira C.I. 17065615, decidimos que el mismo está **APROBADO CON MENCIÓN HONORÍFICA.**

Acta que se expide en valencia, en fecha: **14/12/2017**


Prof. Yris Gil (Pdte)
C.I. 10.215.391
Fecha 14-12-2017




Prof. Tania Younes
C.I. 11.685.850
Fecha 14-12-2017


Prof. Maria Paez
C.I. 2766230
Fecha 14-12-2017

TG: 115-17

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Quien suscribe, Dra. Leticia Figueira, portadora de la cédula de identidad No. V-17.065.615, por medio de la presente hago constar que he tenido conocimiento del Trabajo de Grado titulado: **“EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE NIVELES SÉRICOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA Y LA ATEROGÉNESIS EN CONEJOS MACHOS NUEVA ZELANDA SOMETIDOS A UNA DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA”**, desde su inicio hasta su culminación. Dicho trabajo fue realizado por la Lcda. Jessika Jiménez, titular de la cédula de identidad No. V-18.343.962. Considero que este estudio reúne todos los requisitos necesarios para ser sometido a evaluación. En Valencia a los 14 días del mes de diciembre del 2017.

Dra. Leticia Figueira

C.I. V-17.065.615

DEDICATORIA

A Dios, porque gracias a Él todo es posible.

A mis padres Jesús Jiménez y Yaque Zea, por haberme apoyado en todo momento, por ayudarme y creer en mí, por sus valores, por ser mi ejemplo de perseverancia y constancia y por su amor infinito. De igual manera a mis hermanos, Genesis y Leonardo, por estar conmigo y apoyarme siempre, los amo inmensamente.

A mi prometido Rewil Mieres, quien además de haber sido un ejemplo a seguir, también fue mi gran apoyo emocional durante todo el curso del postgrado y el tiempo en que escribía este Trabajo de Grado. Gracias por alentarme y darme ánimo para continuar cuando parecía que me iba a rendir.

Por último y no menos importante, a mi amado país Venezuela, para ti este logro porque durante todo este tiempo has estado presente en mi mente y en mi corazón; porque pensar en ti me hace querer luchar y ser mejor; porque a pesar de las adversidades y de los tiempos difíciles sigues siendo una Tierra de Gracia, la cuna que me vio nacer y convertirme en lo que hasta ahora soy. No hay palabras que puedan describir lo que siento por ti.

Jessika Jiménez

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme vida, salud, fuerza y fe para alcanzar una de las mayores metas de mi vida y por estar conmigo en cada paso que doy; por ayudarme a crecer como persona y profesional; y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía en cada etapa de mi vida.

A mi tutora, Dra. Leticia Figueira y al Dr. Julio C. González, por ser mis guías y ayudarme a dar lo mejor de mí como persona, estudiante y profesional. Agradezco su esfuerzo y dedicación, el compartir sus conocimientos y experiencias y el motivarme a culminar mis estudios de postgrado con éxito.

A mis profesores durante toda mi carrera de postgrado, porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación, y en especial a las profesoras María Victoria Moroño, María José Tarrife y Sioly de Orta.

A las diferentes instituciones sin las cuales no se hubiera podido realizar esta investigación; especialmente al Laboratorio Clínico Julio César González, por la ayuda financiera brindada y por prestar sus instalaciones para la realización de este trabajo y al Laboratorio de Investigación y Postgrado de la Escuela de Bioanálisis (LIPEB), por ser una Institución fundamental durante todo el período del postgrado y por brindar siempre su apoyo incondicional.

Y por último a mis colegas y compañeros de trabajo del Laboratorio General del Hospital “Dr. José Francisco Molina Sierra” en Puerto Cabello, quienes me apoyaron y brindaron su ayuda, gracias.

Jessika Jiménez

ÍNDICE

	Página
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	viii
Resumen	ix
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Muestra y diseño experimental	14
Dieta estándar	14
Dieta hipercolesterolémica	15
Procedimiento experimental	15
Determinaciones bioquímicas	15
Preparación de tejidos	16
Tipificación histológica de las lesiones ateroscleróticas	16
Análisis de los datos	17
RESULTADOS	18
Pesos de los conejos	18
Perfil lipídico de los conejos	18
Concentraciones séricas de los marcadores de inflamación y oxidación.	20

Análisis histológico de la aorta	22
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Descripción	Página
1	Valores promedio y desviación estándar del peso corporal (g) de los conejos a lo largo del estudio.	18
2	Efecto del resveratrol sobre las concentraciones sérica de TGF-beta en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 6ta y 12ma.	20
3	Efecto del resveratrol sobre las concentraciones plasmáticas de TBARS en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 6ta y 12ma.	21
4	Cortes histológicos de las aortas de los conejos al final del estudio.	24

ÍNDICE DE TABLAS

Número	Descripción	Página
1	Perfil lipídico de los conejos sujetos a estudio	19
2	Análisis de la correlación de Spearman entre las concentraciones de TGF-beta, TBARS y el perfil lipídico	22
3	Distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta.	23



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
 FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
 DIRECCIÓN DE POSTGRADO
 ESPECIALIDAD EN BIOQUÍMICA CLÍNICA
 TRABAJO ESPECIAL DE GRADO



**EFFECTO DEL RESVERATROL SOBRE NIVELES SÉRICOS DEL FACTOR DE
 CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA Y LA ATEROGÉNESIS EN CONEJOS
 MACHOS NUEVA ZELANDA SOMETIDOS A UNA DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA.**

Autor: Lcda. Jessika Jiménez

Tutores: Dra. Leticia Figueira

RESUMEN

El factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) está involucrado en la fisiopatología de la aterosclerosis, en la cual el estrés oxidativo juega un papel fundamental. El resveratrol es un polifenol que ha mostrado tener propiedades antiaterogénicas gracias a sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del resveratrol sobre los niveles séricos del TGF-beta, la formación y evolución de la placa de ateroma en conejos machos de la raza Nueva Zelanda sometidos a una dieta hipercolesterolémica. Se estudiaron 48 conejos: Grupo 1 (control): Conejarina. Grupo 2: Conejarina suplementada con 0,5% colesterol. Grupo 3 (control resveratrol): Conejarina y resveratrol (2mg/Kg/día). Grupo 4: Conejarina suplementada con 0,5% colesterol y resveratrol (2mg/Kg/día), durante 12 semanas. Se realizaron determinaciones de CT, TG, c-HDL, c-LDL, productos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y TGF-beta en la 0, 6ta y 12ma semana de experimentación. La mitad de los conejos fueron sacrificados a la 6ta y el resto a la 12ma semana y se realizó estudio histológico de su aorta. Se encontró un aumento significativo de la concentración de TGF-beta, perfil lipídico y TBARS en los grupos 2 y 4 con respecto a los grupos 1 y 3 desde la 6ta semana de experimentación ($p < 0,005$). En la 6ta y 12ma semana se evidenció una disminución de los niveles de TGF-beta en el grupo 4 con respecto al grupo 2 ($p < 0,005$). Por otra parte, en la 12ma semana se observó una disminución de los niveles de TBARS en el grupo 4 con respecto al grupo 2 ($p = 0,0047$). El tratamiento con resveratrol disminuyó la formación de ateromas. En conclusión, el TGF-beta constituye un marcador temprano no invasivo de aterosclerosis; por su parte los TBARS son un marcador tardío de oxidación. Asimismo, la suplementación oral con resveratrol ejerció efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiateroscleróticos.

Palabras claves: Factor de crecimiento transformante beta, resveratrol, aterosclerosis, inflamación, oxidación.

INTRODUCCIÓN

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica, sistémica, de etiología multifactorial y progresiva; que se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima con pérdida de la elasticidad de las arterias de mediano y gran calibre, y en cuya génesis están involucrados factores genéticos y hábitos de vida^{1,2,3}.

El proceso fisiopatológico de la aterosclerosis inicia con la infiltración de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) al espacio subendotelial donde son oxidadas, mediante las especies reactivas de oxígeno (ERO), para formar las LDL oxidada (LDLox)⁴; las cuales pueden lesionar a las células endoteliales e inducir la expresión de moléculas de adhesión y factores quimiotácticos^{5,6} que generan la migración de monocitos al espacio subendotelial donde se diferencian a macrófagos⁴ que fagocitan a las LDLox, formando las células espumosas⁷. Paralelamente, los macrófagos inducen la migración y proliferación de las células musculares lisas (CML) desde la media a la íntima, a través de la producción de citoquinas inmunomoduladoras como el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta)⁸.

El TGF-beta es una proteína con un peso molecular de 25 KDa, formada por dos cadenas idénticas de 112 aminoácidos unidas por puentes disulfuro e interacciones hidrófobas^{9,10}. Su señalización se lleva a cabo a través de la familia de proteínas Smad y dos receptores quinasa de serina/treonina denominados tipo I (también conocido como quinasa de tipo activina [ALK]) y tipo II¹¹⁻¹³. Esta citoquina regula una gran cantidad de actividades biológicas como proliferación, migración y apoptosis en diferentes tipos celulares¹⁴; entre sus funciones destaca su papel en el mantenimiento de la estructura normal de la pared de los vasos sanguíneos, por lo que se ha relacionado con síndromes cardiovasculares. Sin embargo, el papel del TGF-beta en el desarrollo de la aterosclerosis es complejo y no está completamente

esclarecido¹⁵. Por un lado, existen evidencias que apoyan la hipótesis de su acción protectora, considerando que es un factor antiaterogénico y estabilizador de la placa de ateroma; pero por otro lado, se ha señalado que el TGF-beta ejerce efectos proinflamatorios y proaterogénicos¹¹.

Por otra parte, hallazgos experimentales han permitido conocer que, en la patogénesis de la aterosclerosis, el estrés oxidativo juega un papel muy importante¹⁶⁻²⁰; sin embargo no se conoce si el estrés oxidativo es un evento primario que ocurre temprano en la enfermedad o si representa un fenómeno secundario que refleja daño en el tejido²¹. En este sentido, actualmente las terapias inmunomoduladoras y antioxidantes están emergiendo como una alternativa atractiva y con resultados alentadores para el tratamiento de la aterosclerosis²⁰. En relación a lo anterior, el resveratrol es un compuesto que ha llamado la atención de los investigadores²².

El resveratrol es un polifenol natural con un peso molecular de 228,25 g/mol, cuya estructura química consta de dos anillos aromáticos que están unidos por un doble enlace. Este polifenol es una fitoalexina que se produce de forma natural en una variedad de plantas, en respuesta a estrés biótico y abiótico, con el propósito de protegerlas. Es un potente antioxidante presente en varios frutos que forman parte de la dieta humana; principalmente en la piel de las uvas y en el vino tinto²²⁻²⁴. Diferentes evidencias indican que el resveratrol podría ser beneficioso para prevenir el inicio y progresión de la aterosclerosis, pues disminuye el estrés oxidativo inhibiendo la producción de ERO y disminuyendo la peroxidación lipídica²³. Asimismo, protege al sistema cardiovascular inhibiendo varios procesos fisiológicos como la oxidación de las LDL, la agregación plaquetaria y la proliferación celular²⁵. Sin embargo, se desconoce su efecto sobre el TGF-beta y la relación de esta citoquina con el estrés oxidativo, incluyendo su evolución a lo largo del proceso aterogénico. Por otro lado, se ha planteado que el resveratrol podría modular la producción y expresión del TGF-beta¹³.

En base a lo reseñado y tomando en cuenta que la aterosclerosis constituye un creciente problema de Salud Pública, representando una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial y en Venezuela, en el presente estudio se evaluó el efecto del resveratrol sobre los niveles séricos del TGF-beta, la formación y evolución de la placa de ateroma en conejos machos de la raza Nueva Zelanda sometidos a una dieta hipercolesterolémica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del resveratrol sobre niveles séricos del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), la formación y evolución de la placa de ateroma en conejos machos de la raza Nueva Zelanda sometidos a una dieta hipercolesterolémica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar el efecto del resveratrol sobre niveles séricos del TGF-beta, perfil lipídico y productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los grupos de conejos sujetos a estudio en la 0, 6ta y 12ma semana de experimentación.
- ✓ Determinar el efecto del resveratrol sobre el grado de ateroma en cortes de arteria aorta en los grupos de conejos después de haber sido sometidos a experimentación a la 6ta y 12ma semanas de experimentación.
- ✓ Comparar los valores de las variables sujetas a estudio a las 0, 6ta y 12ma semanas de experimentación en cada grupo de conejos.
- ✓ Comparar los valores de las variables sujetas a estudio a las 0, 6ta y 12ma semanas de experimentación entre cada grupo de conejos.
- ✓ Relacionar los niveles séricos del TGF-beta con los niveles de TBARS y el perfil lipídico en los grupos de conejos a las 0, 6ta y 12ma semanas de experimentación.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

La presente investigación es de tipo experimental, descriptiva, correlacional y longitudinal. La muestra estuvo conformada por 48 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 12 semanas de edad con un peso entre 1.200 a 1.300 gramos, provenientes del Bioterio del Instituto de Higiene “Rafael Rangel” (Caracas, Venezuela). Los animales fueron mantenidos en jaulas a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) con ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Después de una semana de ambientación en el Bioterio Experimental de la Universidad de Carabobo (Valencia, Venezuela), los conejos fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos de 12 conejos cada uno, organizados de la siguiente manera: Grupo 1 (Control): Los cuales fueron alimentados diariamente con conejarina comercial (Protinal, Venezuela). Grupo 2 (Colesterol): Alimentados diariamente con conejarina comercial suplementada con 0,5% p/p de colesterol. Grupo 3 (Control-resveratrol): Alimentados diariamente con conejarina comercial y suplementados con resveratrol (2mg/Kg de peso corporal, vía oral). Grupo 4 (Colesterol-resveratrol): Alimentados diariamente con conejarina comercial suplementada con 0,5% p/p de colesterol y resveratrol (2mg/Kg de peso corporal, vía oral).

Todos los conejos consumieron agua a libre demanda. El periodo experimental tuvo una duración de doce semanas. Los conejos fueron pesados antes, durante y después de la experimentación. Los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio²⁶ y el Código de ética para la vida²⁷.

Dieta estándar: Los animales del grupo control y resveratrol fueron alimentados con Conejarina comercial (Protinal, Venezuela), cuya composición es la siguiente: Maíz, sorgo, afrechillo de trigo, harinas de maíz, ajonjolí, algodón, girasol y soya, concha de arroz, bagacillo de caña, pasto deshidratado, melaza, grasa estabilizada, carbonato y fosfato de calcio, sal, minerales “trazas” (Cobalto, cobre, hierro, manganeso, yodo y zinc) suplementos de las vitaminas A, B2, B12, C, D3, E, ácido pantoténico y niacina, antioxidante, suplemento antibiótico y anticoccidial. Proteína cruda 12%, grasa cruda 1%, fibra cruda 20%, extracto libre de nitrógeno 42%.

Dieta hipercolesterolémica: La administración de colesterol se realizó mediante el enriquecimiento de la dieta estándar con colesterol disuelto en etil éter y etanol absoluto²⁸. Los granos de la conejarina fueron cubiertos con la solución de colesterol en una relación de 0,5 g de colesterol por cada 100 g de alimento y se eliminó el solvente por evaporación durante 24 horas.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Las muestras de sangre fueron extraídas por punción intracardiaca a todos los conejos previo ayuno de 14 horas, al inicio, 6ta y 12ma semana, utilizando tubos de ensayo sin y con anticoagulante (citrato de sodio). Las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 minutos para obtener el suero y el plasma, los cuales fueron conservados en congelación a -70°C hasta el momento del procesamiento.

DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Se realizaron determinaciones séricas de colesterol total (CT), triglicéridos (TG) y colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) por métodos enzimáticos colorimétricos (Wiener Lab). La determinación del colesterol asociado a

las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) se realizó por precipitación y posterior determinación enzimática colorimétrica (Wiener Lab). Los TBARS en el plasma fueron evaluados por un método colorimétrico descrito por Ohkawa y col., el cual consistió en evaluar el efecto de las ERO sobre los lípidos, que resulta en la producción de varias sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico y que pueden ser medidas por espectrofotometría a 490nm²⁹. Las concentraciones séricas del TGF-beta fueron determinadas por un ensayo inmunoenzimático competitivo comercial (NeoBiolab, Cambridge, Massachusetts, USA), en el cual el TGF-beta presente en las muestras o estándares competía con el conjugado por los sitios de unión a los anticuerpos fijados en los pozos de la placa. La reacción fue medida por espectrofotometría a 450nm.

PREPARACIÓN DE TEJIDOS

A la 6ta semana de experimentación y al final del estudio la mitad de los animales de cada grupo fueron sacrificados por dislocación cervical; consecutivamente se procedió a realizar la autopsia de dichos animales, extrayendo la arteria aorta para ser examinadas. Las muestras de tejido extraídas, fueron fijadas en formaldehído al 10% en PBS durante 24 horas y procesadas según técnica de rutina, para posteriormente ser teñidas con hematoxilina y eosina³⁰.

TIPIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LAS LESIONES ATEROSCLERÓTICAS

Las lesiones fueron tipificadas de acuerdo a la clasificación de la American Heart Association, la cual considera como lesiones tipo I, aquellas iniciales constituidas por células espumosas sub-endotelial aisladas. Las lesiones tipo II constituidas principalmente por un cúmulo de lípidos intracelulares. Las lesiones tipo III son intermedias o pre-ateromas, caracterizadas por cúmulos de lípidos

intracelulares y dispersos lípidos extracelulares. Las lesiones tipo IV son los ateromas, representan lesiones avanzadas, y están constituidas por lípidos intracelulares y por una gran cantidad de lípidos extracelulares. Las lesiones tipo V contienen tejido conectivo fibroso y en ocasiones se encuentran calcificaciones. Las lesiones tipo VI son las placas complicadas (fisura, trombos, hematomas)³¹.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se calculó la media y desviación estándar para las variables estudiadas. Se realizó las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Jarque-Bera. Se empleó el análisis de Kruskal-Wallis con análisis *post hoc* mediante la prueba de U- de Mann-Whitney sobre cada par de grupos. Se empleó la correlación de Spearman para relacionar el TGF-beta con las variables del estudio. Se empleó una tabla de asociación para clasificar el grado de ateroma. Se consideró significativo $p < 0,05$. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.

RESULTADOS

Peso de los conejos.

En la figura 1 se resume el peso de los conejos a lo largo del estudio. No se observaron diferencias significativas en los pesos basales entre los grupos de conejos sujetos a experimentación. A partir de la 4ta hasta la 12ma semana del estudio hubo un incremento significativo en el peso de los conejos con respecto a sus pesos basales ($p < 0,001$).

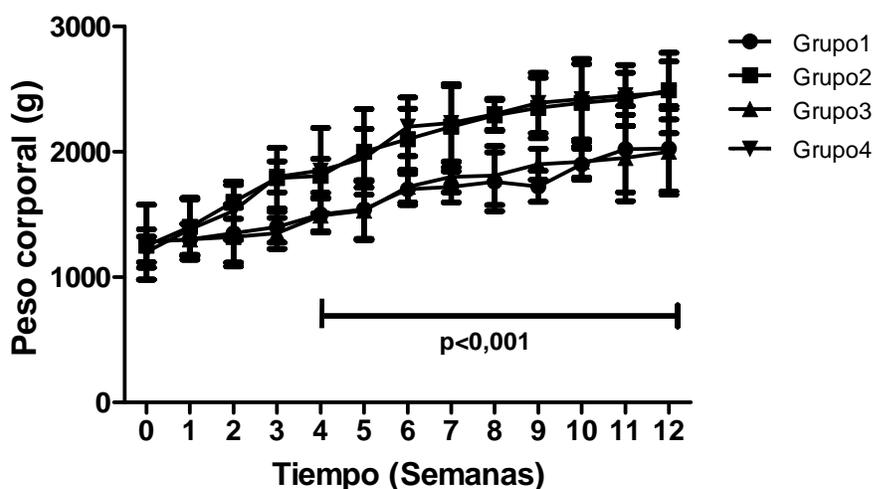


Figura. 1. Valores promedio y desviación estándar del peso corporal (g) de los conejos a lo largo del estudio. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media.

Perfil lipídico de los conejos.

En la tabla 1 se resume las concentraciones de los lípidos séricos de los conejos. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de CT, c-

HDL, c-LDL y TG basales entre los grupos de conejos en estudio. El CT, c-HDL, c-LDL y TG en los grupos 1 y 3 permanecieron sin cambios significativos a lo largo del estudio. Se apreció un aumento significativo en la concentración de CT, c-HDL, c-LDL y TG en el grupo 2 y en el grupo 4 con respecto a sus respectivos controles (grupo 1 y 3, respectivamente) ($p < 0,0001$). Para los grupos 2 y 4 las concentraciones de los lípidos séricos variaron desde el inicio hasta el final del experimento ($p < 0,0001$).

Tabla 1. Perfil lipídico de los conejos sujetos a estudio.

Grupos	CT (mg/dL)	c-LDL (mg/dL)	c-HDL (mg/dL)	TG (mg/dL)
Basal				
Grupo 1	73 ± 12	39 ± 10	30 ± 6	79 ± 11
Grupo 2	70 ± 10	38 ± 8	29 ± 8	80 ± 9
Grupo 3	68 ± 10	37 ± 9	30 ± 7	82 ± 10
Grupo 4	72 ± 11	38 ± 11	31 ± 9	78 ± 9
6ta semana				
Grupo 1	68 ± 13	36 ± 9	28 ± 7	84 ± 12
Grupo 2	748 ± 102*	603 ± 72*	82 ± 14*	724 ± 92*
Grupo 3	74 ± 15	40 ± 10	29 ± 6	78 ± 11
Grupo 4	725 ± 122#	610 ± 58#	83 ± 15#	736 ± 83#
12ma semana				
Grupo 1	73 ± 12	38 ± 11	30 ± 7	82 ± 10
Grupo 2	1243 ± 181*	890 ± 82*	92 ± 16*	1147 ± 162*
Grupo 3	69 ± 14	38 ± 11	28 ± 6	84 ± 9
Grupo 4	1145 ± 171#	882 ± 81#	96 ± 12#	1125 ± 152#
Valores p				
Grupo 1	0,9646	0,9491	0,9791	0,8638
Grupo 2	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Grupo 3	0,3632	0,6945	0,4678	0,3374
Grupo 4	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar de la media. Significativo $p < 0,05$

*= Comparación con respecto al grupo 1.

#= Comparación con respecto al grupo 3.
 p= Comparación con respecto al basal.

Concentraciones séricas de los marcadores de inflamación y oxidación.

Como se puede apreciar en la figura 2, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas basales de TGF-beta entre los grupos de conejos sujetos a estudio. La TGF-beta en los grupos 1 y 3 permanecieron sin cambios a lo largo del experimento; por su parte, en los grupos 2 y 4 variaron a lo largo del estudio ($p < 0,0001$). Por otra parte, en la sexta semana y al final del experimento las concentraciones séricas de TGF-beta aumentaron en los grupos 2 y 4 con respecto a los grupos 1 y 3, respectivamente ($p < 0,0050$). Sin embargo, en la 6ta y 12ma semana se evidenció una disminución significativa de la concentración de TGF-beta en el grupo 4 con respecto al grupo 2 ($p < 0,0050$).

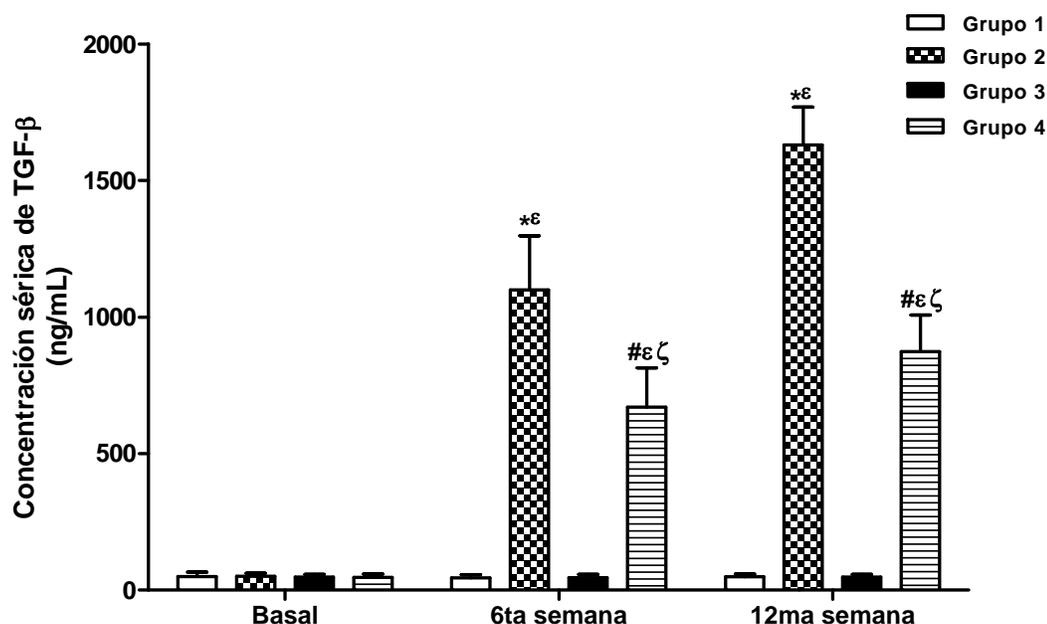


Figura 2. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones séricas de TGF-beta en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 6ta y 12ma. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media. (n=12 basal y 6ta semana; n=6 en la 12ma semana). * $p < 0,0050$ vs. grupo control (Grupo 1). # $p < 0,0050$

vs. control resveratrol (Grupo 3). ^ζp<0,005 vs. Grupo 2. ^εp<0,0001 vs. su respectivo valor basal.

Con respecto al marcador de oxidación TBARS plasmático, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos sujetos a estudio en condiciones basales. Dicho marcador en los grupos 1 y 3 permanecieron sin cambios a lo largo del experimento. Por su parte, el TBARS en los grupos 2 y 4 varió a lo largo del estudio (p<0,0001). En la sexta semana y al final del experimento las concentraciones plasmáticas de TBARS aumentaron en el grupo 2 con respecto al grupo 1 (p<0,0050), y en el grupo 4 con respecto al grupo 3 (p<0,0050). Sin embargo, en la duodécima semana se observó una disminución significativa de los niveles de TBARS en el grupo 4 con respecto al grupo 2 (p=0,0047) (Figura 3).

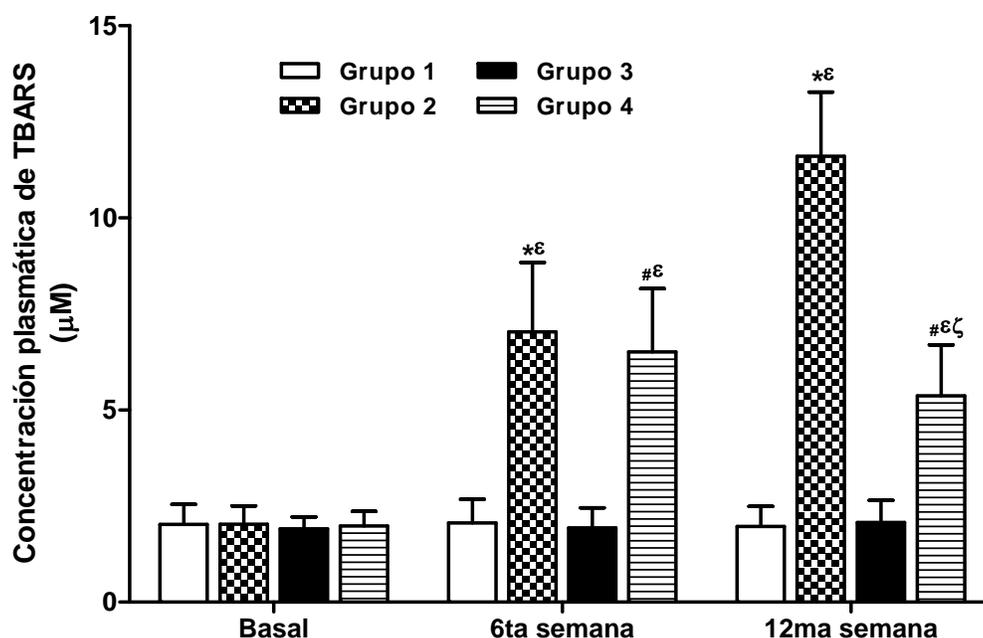


Figura 3. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones plasmática de TBARS en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 6ta y 12ma. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media. (n=12 basal y

6ta semana; n=6 en la 12ma semana). *p<0,0050 vs. grupo control (Grupo 1). #p<0,0050 vs. control resveratrol (Grupo 3). ζp=0,0047 vs. Grupo 2 εp<0,0001 vs. su respectivo valor basal.

En la Tabla 2 se muestra el análisis de Spearman de las correlaciones entre la concentración de TGF-beta, el perfil lipídico y TBARS en el grupo 2, evidenciando correlación positiva significativa entre la TGF-beta con el perfil lipídico y TBARS (p<0,0001).

Tabla 2. Análisis de la correlación de Spearman entre las concentraciones de TGF-beta, TBARS y el perfil lipídico

	r	p
TGF-β & CT	0,6343	0,0001
TGF-β & c-LDL	0,5738	0,0001
TGF-β & c-HDL	0,6482	0,0001
TGF-β & TG	0,6380	0,0001
TGF-β & TBARS	0,6400	0,0001

Análisis histológico de la aorta.

En la tabla 3 se presenta la distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta. Ningún conejo de los grupos 1 y 3 presentaron lesiones ateroscleróticas a lo largo del estudio. Por su parte, los conejos del grupo 2 presentaron lesiones de grado variable a lo largo del estudio. En el grupo 4, algunos conejos no presentaron lesiones y otros evidenciaron lesiones de grado variable (Figura 4).

Tabla 3. Distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta. Datos presentados como n (%).

Grupo	Sin ateroma	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
Sexta semana						
1	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	3 (50%)	3 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	4 (67%)	2 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Duodécima semana						
1	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	5 (83%)	0 (0%)
3	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	2 (33%)	2 (33%)	1 (17%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)

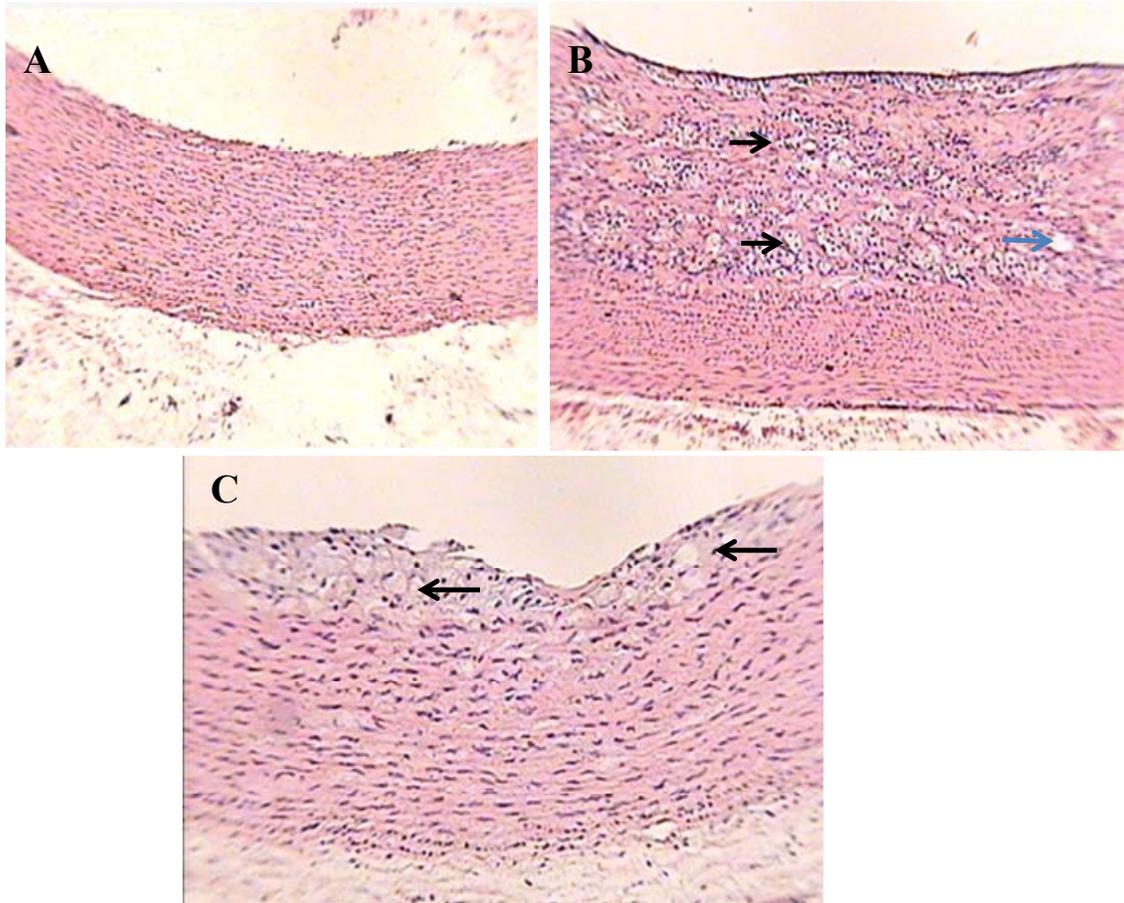


Figura. 4. Cortes histológicos de las aortas de los conejos al final del estudio. Íntima arterial sin lesión de un conejo perteneciente al grupo control (Panel A). Lesión Tipo IV (Panel B). Se observa en la íntima arterial cúmulos de lípidos intracelulares (flechas negras) y extracelulares (flecha azul) en mayor extensión de un conejo perteneciente al grupo 2 (10X). Lesión Tipo II (Panel C). Se observa en la íntima arterial cúmulos de lípidos intracelulares (flechas negras) de un conejo perteneciente al grupo 4 (50X). Tinción hematoxilina – eosina.

DISCUSIÓN

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que involucra al sistema inmune y al estrés oxidativo, y cuya etiopatogenia es multifactorial ya que se ha asociado a diversos factores de riesgo. Se caracteriza por la acumulación de lípidos oxidados en las paredes arteriales y la infiltración de células inmunes y CML^{8,32}; dichas células son moduladas por citoquinas y factores de crecimiento. En este sentido, el TGF-beta ha demostrado estar involucrado en la patogénesis de esta enfermedad; ya que es una citoquina pleiotrópica cuyo efecto sobre el sistema cardiovascular es ambiguo; por un lado, existen evidencias que apoyan la hipótesis de su acción protectora, considerando que es un factor antiaterogénico y estabilizador de la placa de ateroma; pero por otro lado, se ha señalado que el TGF-beta ejerce efectos proinflamatorios y proaterogénicos¹¹.

Diferentes estudios asocian las variaciones en la expresión o señalización del TGF-beta con la aterosclerosis; sin embargo, las relaciones precisas entre el TGF-beta y la aterosclerosis no están completamente comprendidas³³. En este sentido, el TGF-beta se ha considerado como una citoquina antiaterogénica y protectora, debido a que inhibe la proliferación y migración de las CML, leucocitos y la expresión de moléculas de adhesión endotelial vascular³⁴. En relación a esto, varios estudios en ratones hiperlipidémicos describen al TGF-beta como una citoquina antiaterogénica que limita la aterosclerosis, principalmente a través de efectos inmunosupresores^{33,35-38}. En concordancia con esto, algunos estudios en humanos apoyan el papel antiaterogénico del TGF-beta, evidenciando una correlación negativa entre la concentración plasmática de dicha citoquina y la presencia o extensión de la aterosclerosis^{33,39,40}. También, el TGF-beta ha exhibido propiedades antiinflamatorias, inhibiendo la migración y la diferenciación de las células inflamatorias y tiene efectos inmunomoduladores en células claves en la aterosclerosis^{12,15,38,41}.

Por otra parte, estudios en animales sugieren que el TGF-beta podría acelerar la aterosclerosis, aumentando la acumulación de la matriz extracelular vascular y estimulando la producción de proteoglicanos, con el consecuente incremento en la retención de lipoproteínas en la pared vascular^{34,42-45}. Asimismo, se ha descrito que el TGF-beta tiene efectos profibróticos indirectos, estimulando la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y la síntesis del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), provocando la liberación del factor de crecimiento fibroblástico (FGF). De hecho, el incremento de los niveles de PAI-1 se ha asociado con el aumento de ocurrencia de trombosis; mientras que, el PDGF y el FGF influyen en la proliferación y migración de las células vecinas. Juntos, estos mediadores controlan la angiogénesis y la reparación vascular; por lo tanto, estas acciones juegan un papel importante tanto en la fase inicial de la lesión como en la posterior fase de remodelación de la aterosclerosis⁴¹.

En el presente estudio se evidenció que la administración de una dieta hipercolesterolémica ocasionó lesiones ateroscleróticas de grado intermedio y avanzado y un incremento progresivo y significativo en las concentraciones séricas de TGF-beta a partir de la sexta semana de estudio, sugiriendo el papel de esta molécula desde las primeras fases de la aterosclerosis, pudiendo éste constituir un marcador temprano no invasivo de la enfermedad. Diferentes estudios apoyan el papel proaterogénico del TGF-beta; en efecto, la evidencia ha descrito que el TGF-beta se asocia con un mayor riesgo de incidencia de enfermedad arterial periférica⁴⁶. Asimismo, experimentos *in vivo* en conejos han mostrado que el TGF-beta 1 estimula el engrosamiento de la íntima de las arterias después de la denudación vascular con catéter de balón, lo cual sugiere la importancia del TGF-beta 1 en las primeras fases de la aterogénesis, pues esta citoquina es capaz de aumentar la producción de la matriz extracelular por parte de las CML en la íntima arterial⁴⁷; e inducir la formación de una cicatriz fibrosa, participando en el desarrollo de la lesión aterosclerótica¹⁴.

Es relevante señalar que la elevación de las concentraciones séricas de este marcador de aterosclerosis se observaron desde la sexta semana de experimentación, lo cual sugiere que el TGF-beta es un marcador temprano de aterosclerosis, pues interviene en la iniciación y progresión de esta enfermedad, ya que esta citoquina posee propiedades proinflamatorias y proaterogénicas bien descritas, actuando desde las etapas iniciales de la aterogénesis; pues desempeña un importante papel en la retención de lípidos y en el consecuente desarrollo de las lesiones ateroscleróticas⁴⁵; ya que el TGF-beta es capaz de aumentar la síntesis de proteoglicanos por las CML que se acumulan en las regiones ricas en lípidos de las placas ateroscleróticas, promoviendo la retención de lipoproteínas. Consecuentemente, la agregación de proteoglicanos puede conducir a reducciones en el movimiento transmural de las lipoproteínas, su acumulación en la pared del vaso y su posterior modificación química⁴⁸.

Por otra parte, durante las últimas décadas diversos estudios han examinado el papel del estrés oxidativo sobre la aterogénesis; y en relación a ello, se ha descrito que la aterosclerosis es el resultado de las modificaciones oxidativas de las LDL en la pared arterial por las ERO producidas por los monocitos/macrófagos infiltrados, células endoteliales disfuncionales y CML que migran desde la túnica media a la capa íntima de la pared arterial⁴⁹. De hecho, ha sido ampliamente demostrado que la función endotelial se encuentra alterada desde los estadios más tempranos de la aterosclerosis y se cree que la producción de ERO induce la disfunción endotelial, paso inicial de la aterogénesis, puesto que el estrés oxidativo conlleva la oxidación de las LDL y la expresión de genes inflamatorios redox sensibles⁵⁰. Todos estos cambios inducen la alteración en la estructura y función de las células endoteliales y contribuyen en la iniciación de la aterosclerosis^{17,50-52}. Por lo tanto, el estrés oxidativo participa en todas las fases del proceso aterotrombótico (adhesión y agregación plaquetaria, proliferación celular, peroxidación lipídica y proteica, daño al ADN y a

la membrana mitocondrial e inestabilización de la placa)⁵³, y su determinación ha adquirido gran importancia como herramienta en el seguimiento de varias enfermedades, incluyendo la aterosclerosis, siendo la evaluación de los TBARS, una de las técnicas más utilizada para la cuantificación del daño oxidativo en lípidos⁵².

En este sentido, en el presente estudio se encontró un aumento en la producción de los TBARS plasmático en los grupos 2 y 4 a partir de la sexta semana con respecto a los grupos 1 y 3, y con respecto a sus valores basales; esto sugiere que la administración de una dieta hipercolesterolémica podría inducir un aumento en la producción de ERO, tal y como se ha encontrado en otros estudios^{54,55}; de hecho, Figueira y González, (2008)⁵⁴ demostraron que la administración de una dieta hipercolesterolémica durante 12 semanas en conejos machos Nueva Zelanda ocasionó un aumento en la glutatión peroxidasa con respecto al grupo control desde la sexta semana de experimentación ($p < 0,05$), lo cual se acompañó de lesiones ateroscleróticas en la aorta de los conejos; asimismo, evidenciaron que la administración de una dieta hipercolesterolémica suplementada con antioxidantes inhibió la formación de las lesiones; sugiriendo que en condiciones de hipercolesterolemia con o sin suplementación de antioxidantes existe un incremento en la actividad de la glutatión peroxidasa debido al estado de estrés oxidativo; en este sentido, los investigadores sugirieron que la elevación de la actividad de la enzima antioxidante representa un mecanismo compensatorio al incremento del estrés oxidativo inducido por la dieta hipercolesterolémica, aludiendo la importancia del estrés oxidativo en la fisiopatología de la aterosclerosis; tal y como se evidenció en el presente estudio, donde se observó un incremento en la peroxidación lipídica tras la administración de una dieta hipercolesterolémica.

Asimismo, estudios en modelos experimentales de aterosclerosis inducidos por la dieta, han encontrado una mayor formación de superóxido vascular, el cual podría contribuir a la disfunción endotelial¹⁷. De igual manera, estudios basados en

modelos genéticos de aterosclerosis en ratones, han descrito que la deficiencia de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) protege contra la aterosclerosis en ratones deficientes de iNOS y apolipoproteína E (apoE); pues los mismos presentan niveles plasmáticos significativamente más bajos de peróxidos lipídicos en comparación con los ratones deficientes únicamente de apoE, lo cual sugiere que la reducción en la formación de la lesión observada en el grupo de animales doblemente deficientes puede deberse a la disminución en la peroxidación de los lípidos, reiterando la participación e importancia del estrés oxidativo en la fisiopatología de la aterosclerosis⁵⁶.

Por su parte, estudios clínicos han evidenciado la participación del estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular; de hecho, en pacientes con hipercolesterolemia, la reducción en la relajación dependiente del endotelio se ha asociado con el aumento de la formación de superóxido dependiente de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa)¹⁷, evidenciando además un incremento en la expresión de diversas subunidades de dicha enzima y un aumento en la expresión de enzimas antioxidantes durante la aterosclerosis⁵⁷. Asimismo, El Kossi y Zakhary (2000)⁵⁸, demostraron una disminución en los niveles de ácido ascórbico y aumento de las concentraciones de peróxido lipídico y óxido nítrico (NO) en pacientes con accidente cerebrovascular trombótico en comparación con sujetos aparentemente sanos. Dichas observaciones ofrecen evidencia acumulativa de que el estrés oxidativo juega un papel claro en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular⁵.

De igual manera, los hallazgos encontrados en esta investigación muestran una asociación positiva del TGF-beta con el perfil lipídico y los TBARS en el grupo que consumió una dieta hipercolesterolémica (Grupo 2), tal y como ha sido reportado en otros estudios^{41,59}. De hecho, Buday y col., (2010)⁴¹ demostraron que el TGF-beta causa disfunción endotelial a través del estrés oxidativo inducido por la activación de

la NADPH oxidasa y la consecuente sobreproducción de superóxido vascular en un modelo murino de aterosclerosis; dicho hallazgo se asoció con el engrosamiento de la pared aórtica y con la formación de placa aterosclerótica agravada. Estos resultados pueden proporcionar un mecanismo que explica la aterosclerosis acelerada en pacientes con TGF-beta 1 elevado en suero. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que el incremento del TGF-beta, acompañado del aumento de la concentración de los lípidos séricos y la producción de TBARS, favorecen el proceso aterosclerótico y apuntan a que el TGF-beta sérico puede constituir un marcador de riesgo y de aterosclerosis. Asimismo, se sugiere que el incremento de la concentración de los lípidos séricos puede contribuir a la instauración del proceso inflamatorio y oxidativo sistémico, lo cual se ve acompañado del aumento del TGF-beta y los TBARS, favoreciendo el proceso aterosclerótico.

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol natural con propiedades antioxidantes potentes, el cual está presente en frutos como las moras y los arándanos pero principalmente, en la uva y en el vino tinto. Sus propiedades *in vitro* han sido ampliamente estudiadas, entre ellas cabe destacar su actividad como anticancerígeno, antiagregante plaquetario, antiinflamatorio, entre otros^{60,61}. En cuanto a sus propiedades *in vivo*, su actividad no está del todo esclarecida; sin embargo existen evidencias que encuentran beneficios sobre el sistema cardiovascular^{24,62-64}.

Cabe destacar que en un principio se planteó que los efectos beneficiosos del resveratrol se debían a su capacidad antioxidante química; sin embargo, las investigaciones más recientes se han centrado en su capacidad para regular la expresión de enzimas antioxidantes como la catalasa, la glutatión reductasa, entre otras, inhibir la actividad inflamatoria de las ciclooxigenasas y activar la sintasa del NO endotelial (eNOS)²². Por su parte, los efectos cardioprotectores atribuidos al resveratrol incluyen sus efectos antiaterogénicos; esencialmente mejorando el perfil

lipídico e inhibiendo la migración y proliferación de las CML a la capa íntima²⁵, y sus efectos antiinflamatorios, pues es capaz de inhibir la activación de factores de transcripción relacionados a la inflamación como el factor nuclear kappa B (NF- κ B)⁶⁵; por lo que su administración se asocia con reducidos niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias como el ligando 3 de la quimioquina, la interleucina 1 beta (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)⁶⁶.

En el presente estudio se demostró, por primera vez, que la suplementación con resveratrol disminuyó las concentraciones séricas del TGF-beta durante la aterosclerosis, sugiriendo que, bajo nuestras condiciones experimentales y de acuerdo a la dosis empleada, el resveratrol tiene efectos antiinflamatorios durante la aterosclerosis, observándose la disminución de las concentraciones de TGF-beta en el grupo 4 con respecto al grupo 2, a partir de la sexta semana de experimentación. En relación a ello, diferentes estudios han demostrado que el resveratrol puede modular las concentraciones y expresión del TGF-beta. En este sentido, Suenaga y col., (2008)¹³, en su investigación, refieren que algunos de los efectos beneficiosos del resveratrol podrían estar mediados en parte por sus efectos sobre la expresión y señalización del TGF-beta; ya que el resveratrol fue capaz de incrementar la transcripción del gen TGF-beta 2, incrementar su producción y activar la señalización TGF-beta/Smad en la línea de células epiteliales de pulmón humano, A549. Sin embargo, diversos estudios señalan que el resveratrol es capaz de disminuir la expresión del TGF-beta tanto *in vivo* como *in vitro*⁶⁷⁻⁶⁹, inhibiendo la diferenciación y activación de los miofibroblastos a través de la supresión de la vía ERO/ERK/TGF-beta/periostina⁷⁰, e inhibiendo la fibrosis y la expresión de TGF-beta inducida por la angiotensina II y alta glucosa⁷¹.

En este sentido, se ha descrito que la administración oral de resveratrol (10 mg/Kg/día) fue capaz de disminuir la expresión del TGF-beta y la fibrosis en ratas a las que se indujo cirrosis con tetracloruro de carbono; sugiriendo que el resveratrol

posee efectos antifibróticos⁶⁷. De igual manera, He y col., (2017)⁶⁸, indicaron que el resveratrol fue capaz de disminuir la expresión de TGF-beta en un modelo de prostatitis crónica en ratas, mejorando la fibrosis y suprimiendo la vía de señalización TGF-beta/Wnt/b-catenina. Asimismo, Qiao y col., (2017)⁶⁹, demostraron una disminución en la expresión de TGF-beta 1, p38, fibronectina y mejoría sobre los cambios histológicos renales en ratas diabéticas tratadas con resveratrol (20 mg/Kg/día durante 4 semanas), y una disminución en la expresión de esta proteína y de la fibronectina en una línea de células mesangiales tratadas con resveratrol, sugiriendo que este polifenol tiene propiedades renoprotectoras durante la diabetes, pues fue capaz de disminuir el daño al tejido posiblemente mediante una inhibición de la vía de señalización p38/MAPK/TGF-beta 1.

Por lo tanto, considerando que el resveratrol fue capaz de disminuir las concentraciones séricas del TGF-beta, el cual ha demostrado estimular la síntesis de proteoglicanos por las CML, promoviendo la retención de lipoproteínas y su acumulación en la pared del vaso y su posterior modificación química⁴⁸, eventos claves en la aterosclerosis; se puede inferir que uno de los efectos antiaterogénicos del resveratrol se deba a la disminución en la secreción de esta citoquina *in vivo* durante la aterosclerosis; lo cual podría contribuir a disminuir la acumulación de lipoproteínas en la íntima arterial, pues dicho efecto vino acompañado en una disminución en la formación y severidad de las lesiones ateroscleróticas. Es relevante señalar que el efecto del resveratrol sobre los niveles del TGF-beta se observó en los conejos a los que se le indujo la aterosclerosis con una dieta hipercolesterolémica, lo cual indica la necesidad de un ambiente “estimulado” o inflamado, tal y como se ha apreciado *in vitro*⁷².

Por otra parte, en el presente estudio se evidenció que el resveratrol ejerció efectos antioxidante y antiaterogénico, pues se observó una disminución en las concentraciones plasmáticas de TBARS en la duodécima semana de experimentación

y una disminución en la formación de lesiones ateroscleróticas desde la sexta semana de experimentación en los conejos suplementados con este polifenol a los que se les administró una dieta hipercolesterolémica; demostrando el efecto del resveratrol sobre el estrés oxidativo en la aterosclerosis *in vivo*. En este sentido, los hallazgos obtenidos en esta investigación coinciden con los reportados en otros estudios, donde la administración del resveratrol en ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica ocasionó una reducción en la producción de ERO⁷³ y una disminución en la formación de lesiones ateroscleróticas²⁵.

Asimismo, estudios epidemiológicos indican que la dieta mediterránea, rica en resveratrol, se asocia con un riesgo reducido de sufrir aterosclerosis, debido a que el mismo reduce el estrés oxidativo⁷⁴. De hecho, una de las propiedades más importantes del resveratrol es su poder antioxidante, siendo su principal blanco la peroxidación lipídica y las enzimas antioxidantes; ya que es capaz de reducir los niveles de LDLox circulante en dietas ricas en grasas y elimina los radicales libres como los hidroxilos, peróxido de hidrógeno y los radicales anión superóxido producidos por macrófagos estimulados en la íntima arterial. De forma paralela, aumenta la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa; además inhibe la NADPH oxidasa, principal fuente de radicales libres en CML y células endoteliales⁷⁴, lo cual indica que el tratamiento con resveratrol puede tener efectos beneficiosos sobre la hipertensión, aterosclerosis, enfermedad isquémica del corazón y la insuficiencia cardíaca, además de enfermedades metabólicas como la diabetes que por lo general, conllevan problemas relacionados con el sistema cardiovascular⁷⁵.

Es relevante señalar que el efecto antioxidante tardío que ejerció el resveratrol en la presente investigación (a partir de la duodécima semana de experimentación) podría sugerir que a la dosis administrada y bajo nuestras condiciones experimentales, dicho efecto no fue a través de su acción directa como antioxidante;

sino posiblemente a través de la transcripción génica, induciendo y/o inhibiendo la expresión de enzimas y proteínas antioxidantes y/o oxidantes, respectivamente, el cual es un proceso que amerita más tiempo. En este sentido, se ha descrito que el resveratrol es capaz de disminuir la inactivación del NO; ya que disminuye la formación y producción de radical anión superóxido, que provoca la rápida inactivación del NO⁷⁶. Esta disminución del radical anión superóxido inducida por el resveratrol es mediada por un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa^{76,77} y heme oxigenasa - 1 (HO-1)⁷⁸, y a través de la disminución de la expresión y actividad de la NADPH oxidasa^{77,79}.

Hasta ahora, algunos estudios han indicado que el resveratrol mejora el perfil lipídico y el metabolismo de las lipoproteínas en ratones sometidos a dieta hipercolesterolémica⁸⁰⁻⁸². Sin embargo, otros estudios experimentales y clínicos no han demostrado un efecto favorecedor del resveratrol sobre el perfil lipídico^{25,83}; dichos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio. Por lo tanto, la ausencia del efecto hipolipemiante encontrado en la presente investigación, podría obedecer a la acumulación de lípidos exógenos provenientes de la dieta, ya que los conejos no pueden incrementar la excreción de esteroides⁸⁴. Sin embargo, a pesar de que la suplementación del resveratrol no tuvo efecto sobre los lípidos séricos, fue capaz de reducir la formación y progresión de la aterosclerosis, inducida por la dieta hipercolesterolémica desde la sexta semana de estudio; dicho efecto del resveratrol ha sido señalado previamente, pues Matos y col., (2012)²⁵ demostraron que la suplementación con resveratrol (2 mg/Kg/día) en conejos expuestos a una dieta hipercolesterolémica durante 56 días, inhibió la progresión de la lesión aterosclerótica hacia un fenotipo más grave y disminuyó el área de la íntima y la relación íntima/media. Igualmente, otros estudios como el de Meng y col., (2014)⁸⁵ han evidenciado que la suplementación con resveratrol en ratas que recibieron dieta aterogénica, inhibió el avance de la lesión aterosclerótica. Por otra parte, estudios *in*

vitro han descrito que el resveratrol podría contrarrestar la formación de células espumosas mediante la inhibición de la expresión de la NADPH oxidasa en macrófagos tratados con lipopolisacárido⁸⁶. Por lo tanto, el efecto antiaterogénico encontrado en el presente estudio, pudo ser debido a las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes del resveratrol; pues su suplementación fue capaz de disminuir las concentraciones de TGF-beta y TBARS.

En resumen, de acuerdo a los resultados obtenidos y bajo dichas condiciones experimentales, se sugiere que el TGF-beta es un marcador sérico, temprano, no invasivo de aterosclerosis; por su parte, los TBARS constituyen un marcador de oxidación que se elevó de manera tardía, reafirmando su importante papel en la fisiopatología de la aterosclerosis, por lo que su cuantificación en sangre podría proporcionar información útil dentro del protocolo diagnóstico de la aterosclerosis. Por otra parte, se observó que la suplementación oral con resveratrol ejerció efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiateroscleróticos, pues disminuyó las concentraciones plasmáticas de TBARS, los niveles séricos de TGF-beta, y redujo la formación y evolución de las lesiones ateroscleróticas, sugiriendo que la administración de este polifenol podría ser beneficioso para prevenir la aterosclerosis.

CONCLUSIONES

En el presente estudio y bajo nuestras condiciones experimentales, se observó que la administración de una dieta hipercolesterolémica durante 12 semanas a conejos machos Nueva Zelanda fue capaz de ocasionar un incremento en el perfil lipídico desde la 6ta semana de experimentación, e indujo lesiones de grado leve en las aortas de los conejos; por su parte, la administración de la dieta hipercolesterolémica durante las doce semanas, indujo la evolución de las lesiones a un grado intermedio y avanzado.

Asimismo, se apreció que la administración de la dieta hipercolesterolémica ocasionó un incremento en los niveles séricos de TGF-beta a partir de la 6^{ta} semana de estudio, sugiriendo que el mismo es un marcador temprano no invasivo de inflamación y aterosclerosis. Además, se observó un aumento en la peroxidación lipídica, lo cual sugiere que tanto la inflamación como la oxidación juegan un papel importante en la fisiopatología de esta enfermedad.

De igual manera, en el presente estudio se apreció una correlación positiva significativa del TGF-beta con el perfil lipídico y TBARS en el grupo 2, apuntando que esta citoquina podría constituir un marcador de riesgo y de aterosclerosis, ya que el aumento del colesterol sérico y sus fracciones se acompaña de un aumento del estado inflamatorio y oxidativo.

Por otra parte, la suplementación oral con resveratrol (2mg/Kg) ejerció efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiaterogénicos, pues disminuyó las concentraciones de TBARS y TGF-beta y redujo la formación y evolución de las lesiones ateroscleróticas, sugiriendo que la administración de este polifenol podría ser beneficioso para prevenir la aterosclerosis, y que dicho efecto antiaterogénico se debe en parte a su acción antioxidante y antiinflamatoria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lahoz C & Mostaza J. La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60(2): 184-195.
2. Benozzi S & Coniglio R. Aterosclerosis: biomarcadores plasmáticos emergentes. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2010; 44(3): 317-328.
3. García Sánchez N, & León Álvarez J. Sobre el comportamiento de biomarcadores de la arteriosclerosis en la hipertensión arterial. *Rev Cuba Aliment Nutr*. 2016; 26(2): 252-274.
4. Fernández-Britto JE. La lesión aterosclerótica: Estado del arte a las puertas del siglo XXI. *Rev Cubana Invest Biomed*. 1998; 17(2): 112-127.
5. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(1): 29–38.
6. Díaz A. Fisiopatología de la aterosclerosis. *Acta Neurol Colomb*. 2010; 26(2): 4-15.
7. Jialal I & Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem*. 1996; 42(4): 498-506.
8. Belcastro E. Inflammation and oxidative stress in atherosclerosis: role of S-nitrosothiols in the vascular responses. Doctoral dissertation. Université de Lorraine; 2017.
9. Chen C, Liu I, Fliesler S, Han X, Huang S, San Huang J. Cholesterol suppresses cellular TGF- β responsiveness: implications in atherogenesis. *J. Cell Sci*. 2007; 120(20): 3509-3521.
10. Kim K, Back J, Zhu Y, Arbesman J, Athar M, Kopelovich L, Bickers, D. Resveratrol targets transforming growth factor- β 2 signaling to block UV-induced tumor progression. *J. Investig. Dermatol*. 2011; 131(1): 195-202.

11. Dabek J, Kulach A, Monastyrska-Cup B, Gasior Z. Transforming growth factor b and cardiovascular diseases: The other facet of the 'protective cytokine'. *Pharmacol Rep.* 2006; 58(6): 799.
12. Rodríguez-Vita J, Sánchez-Galán E, Santamaría B, Sánchez-López E, Rodrigues-Díez R, Blanco-Colio L, Ruiz-Ortega M. Essential role of TGF- β /Smad pathway on statin dependent vascular smooth muscle cell regulation. *PLoS One.* 2008; 3(12): e3959.
13. Suenaga F, Hatsushika K, Takano S, Ando T, Ohnuma Y, Ogawa H, & Nakao A. A possible link between resveratrol and TGF- β : Resveratrol induction of TGF- β expression and signaling. *FEBS Letters.* 2008; 582(5): 586-590.
14. Gálvez-Gastélum F, Sandoval-Rodríguez A, Armendáriz-Borunda J. El factor de crecimiento transformante beta como blanco terapéutico. *Salud Publica Mex.* 2004; 46(4): 341-350.
15. Grainger D. TGF- β and atherosclerosis in man. *Cardiovasc Res.* 2007; 74(2): 213-222.
16. Rubbo H & O'Donnell V. Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights. *Toxicology.* 2005; 208(2): 305-317.
17. Singh U & Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology.* 2006; 13(3): 129-142.
18. Tavori H, Aviram M, Khatib S, Musa R, Nitecki S, Hoffman A, Vaya J. Human carotid atherosclerotic plaque increases oxidative state of macrophages and low-density lipoproteins, whereas paraoxonase 1 (PON1) decreases such atherogenic effects. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46(5): 607-615.
19. Habets K, Van Puijvelde G, Van Duivenvoorde L, Van Wanrooij E, De Vos P, Tervaert J, Kuiper J. Vaccination using oxidized low-density lipoprotein-pulsed dendritic cells reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Cardiovasc Res.* 2009; 85(3): 622-630.

20. Delgado Roche L, Vázquez López A, Martínez-Sánchez G. Procesos moleculares patogénicos de la aterosclerosis y alternativas terapéuticas para su control. *Rev Cubana Farm.* 2012; 46(2): 267-280.
21. Mathew A & Pennathur S. Macrophages, Oxidative Stress, and Atherosclerosis. *Encyclopedia Med Immunol.* 2014; 693-703.
22. Vinet R, Álvarez R, Knox M, Guzman L. Bioactividad y potencial terapéutico de resveratrol y derivados sobre el sistema cardiovascular. *Rev. Farmacol.* 2015; 8: 52-61.
23. de Miguel Moreno N. Efectos beneficiosos del consumo moderado de vino: Resveratrol. *Pharmacology.* 2012; 3: 1-18.
24. Gambini J, López-Grueso R, Olaso-González G, Inglés M, Abdelazid K, El Alami M, Viña J. Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2013; 48(2): 79-88.
25. Matos R, Baroncini L, Précoma L, Winter G, Lambach P, Caron E, et al. Resveratrol causes antiatherogenic effects in an animal model of atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol.* 2012; 98(2): 136-142.
26. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. *National Academies Press*, 2010.
27. Código de ética para la vida. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. República Bolivariana de Venezuela, 2011.
28. Rasmusen C, Moinard C, Martin C, Tricottet V, Cynober L, Couderc R. L arginine plus atorvastatin for prevention of atheroma formation in genetically hypercholesterolaemic rabbits. *Br J Nutr.* 2007; 97(6):1083-1089.
29. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95(2): 351-358.
30. Washington Institute of Pathology. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 1968.

31. Sary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 92(5): 1512-31.
32. Nava A. (2002). Aterosclerosis e inflamación. *Arch Cardiol México.* 2002; 72(2): 153-155.
33. Frutkin A, Otsuka, G, Stempien-Otero A, Sesti C, Du L, Jaffe M, Minter D. TGF- β 1 limits plaque growth, stabilizes plaque structure, and prevents aortic dilation in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(9): 1251-1257.
34. Uluçay S, Çam F, Batır M, Sütçü R, Bayturan Ö, Demircan K. A novel association between TGF β 1 and ADAMTS4 in coronary artery disease: A new potential mechanism in the progression of atherosclerosis and diabetes. *Anatol. J. Cardiol/Anadolu Kardiyol Derg.* 2015; 15(10).
35. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamaté C, Merval R, Tedgui A. Inhibition of transforming growth factor- β signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res.* 2001; 89(10): 930-934.
36. Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Koteliansky V, Daemen M. Transforming growth factor- β mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(6): 975-982.
37. Gojova A, Brun V, Esposito B, Cottrez F, Gourdy P, Ardouin P, Groux H. Specific abrogation of transforming growth factor- β signaling in T cells alters atherosclerotic lesion size and composition in mice. *Blood.* 2003; 102(12): 4052-4058.
38. Robertson A, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell R, Hansson G. Disruption of TGF- β signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *Journal of J Clin Invest.* 2003; 112(9): 1342.

39. Erren M, Reinecke H, Junker R, Fobker M, Schulte H, Schurek J, Cullen P. Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19(10): 2355-2363
40. Stefoni S, Cianciolo G, Donati G, Dormi A, Silvestri M, Coli L, Iannelli S. Low TGF- β 1 serum levels are a risk factor for atherosclerosis disease in ESRD patients. *Kidney Int.* 2002; 61(1): 324-335.
41. Buday A, Órsy P, Godó M, Mózes M, Kökény G, Lacza Z, Hamar P. Elevated systemic TGF- β impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodeling, and increased plaque formation in apoE^{-/-} mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 299(2): H386-H395.
42. Majesky MW, Lindner V, Twardzik D, Schwartz S, Reidy M. Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury. *J Clin Invest.* 1991; 88(3): 904.
43. O'Brien K, Olin K, Alpers C, Chiu W, Ferguson M, Hudkins K, Chait A. Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques. *Circulation.* 1998; 98(6): 519-527.
44. Schulick A, Taylor A, Zuo W, Qiu C, Dong G, Woodward R, Dichek D. Overexpression of transforming growth factor β 1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95(12): 6983-6988.
45. Little P, Tannock L, Olin K, Chait A, Wight T. Proteoglycans synthesized by arterial smooth muscle cells in the presence of transforming growth factor- β 1 exhibit increased binding to LDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(1): 55-60.
46. Agarwal I, Arnold A, Glazer N, Barasch E, Djousse L, Fitzpatrick A, Rimm E. Fibrosis-related biomarkers and large and small vessel disease: the Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis.* 2015; 239(2): 539-546.

47. Kanzaki T, Tamura K, Takahashi K, Saito Y, Akikusa B, Oohashi H, Morisaki N. *In vivo* effect of TGF- β 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15(11): 1951-1957.
48. Bobik A, Agrotis A, Kanellakis P, Dilley R, Krushinsky A, Smirnov V, Kostolias G. Distinct patterns of transforming growth factor- β isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. *Circulation.* 1999; 99(22): 2883-2891.
49. Panth N, Paudel K, Parajuli K. Reactive oxygen species: a key hallmark of cardiovascular disease. *Adv Med*, 2016.
50. Kondo T, Hirose M, Kageyama K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2009; 16(5): 532-538.
51. Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol.* 2009; 50(5): 402-9.
52. Ceballos G, Sánchez I, Calzada-Mendoza C & Olivares-Corichi I. Disfunción endotelial y estrés oxidativo. *Rev Endocrinol Nutr.* 2006; 14(4): 233-6.
53. Lara J. Estrés oxidativo, disfunción endotelial y aterosclerosis. *An. Fac. Med.* 2014; 75(4): 351-352.
54. Figueira, L, & González, J. Efecto de la vitamina C, sobre la actividad de glutatión peroxidasa y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica. *Acta Cient. Soc. Venez. Bioanalistas Esp.* 2008; 11(1), 30-36.
55. Figueira L, González J, Di Basílico L. La fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína como marcador sérico de aterosclerosis. *Rev Fac Farm* 2017; 80(1,2): 50-64.
56. Kuhlencordt P, Chen J, Han F, Astern J, Huang PL. Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 2001; 103(25): 3099-3104.

- 57.** Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. *Hypertension*. 2004; 44(4): 381-386.
- 58.** El Kossi M, Zakhary M. Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke*. 2000; 31(8): 1889-1892.
- 59.** Zhou X, Johnston T, Johansson D, Parini P, Funa K, Svensson J, Hansson G. Hypercholesterolemia leads to elevated TGF- β 1 activity and T helper 3-dependent autoimmune responses in atherosclerotic mice. *Atherosclerosis*. 2009; 204(2): 381-387.
- 60.** Dobryднева Y, Williams R, Blackmore P. trans-Resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. *Br J Pharmacol*. 1999; 128(1): 149-157.
- 61.** Tseng P, Hou S, Chen R, Peng H, Hsieh C, Kuo M, Yen M. Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis. *J Bone Miner Res*. 2011; 26(10): 2552-2563.
- 62.** Baur J & Sinclair D. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. Nature reviews. *Drug Discov*. 2006; 5(6): 493.
- 63.** Agarwal B & Baur J. Resveratrol and life extension. *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1215(1): 138-143.
- 64.** Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper R, van de Weijer T, Goossens G, Moonen-Kornips E. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metabolism*. 2011; 14(5): 612-622.
- 65.** Tomé-Carneiro^A J, González M, Larrosa M, Yáñez-Gascón M, García-Almagro F, Ruiz-Ros J, et al. Grape resveratrol increases serum adiponectin and downregulates inflammatory genes in peripheral blood mononuclear cells: A triple-blind, placebo-controlled, one-year clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2013; 27(1): 37-48.

66. Tomé-Carneiro^B J, González M, Larrosa M, Yáñez-Gascón M, García-Almagro F, Ruiz-Ros J, et al. Resveratrol in primary and secondary prevention of cardiovascular disease: A dietary and clinical perspective. *Ann N Y Acad Sci.* 2013; 1290(1): 37-51.
67. Chávez E, Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Vergara P, Moreno M, Muriel P. Resveratrol prevents fibrosis, NF-kappaB activation and TGF-beta increases induced by chronic CCl4 treatment in rats. *J Appl Toxicol.* 2008; 28(1): 35-43.
68. He Y, Zeng H, Yu Y, Zhang J, Duan X, Zeng X, Gong F, Liu Q, Yang B. Resveratrol improves prostate fibrosis during progression of urinary dysfunction in chronic prostatitis. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2017; 54:120-124.
69. Qiao Y, Gao K, Wang Y, Wang X, Cui B. Resveratrol ameliorates diabetic nephropathy in rats through negative regulation of the p38 MAPK/TGF-β1 pathway. *Exp Ther Med.* 2017; 13(6): 3223-3230.
70. Wu H, Li G, Xie J, Li R, Chen Q, Chen J, Wei Z, Kang L, Xu B. Resveratrol ameliorates myocardial fibrosis by inhibiting ROS/ERK/TGF-β/periostin pathway in STZ-induced diabetic mice. *BMC Cardiovasc Disord.* 2016; 16(1): 5.
71. Liu J, Zhuo X, Liu W, Wan Z, Liang X, Gao S, Yuan Z, Wu Y. Resveratrol inhibits high glucose induced collagen upregulation in cardiac fibroblasts through regulating TGF-β1-Smad3 signaling pathway. *Chem Biol Interact.* 2015; 227: 45-52.
72. Buttari B, Profumo E, Segoni L, D'Arcangelo D, Rossi S, Facchiano F, et al. Resveratrol counteracts inflammation in human M1 and M2 macrophages upon challenge with 7-oxo-cholesterol: potential therapeutic implications in atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 257543.
73. Fremont L. Biological Effects of Resveratrol. *Life Sci.* 2000; 66(8): 663-673.
74. Riccioni G, Gammone M, Tettamanti G, Bergante S, Pluchinotta F, D'Orazio N. Resveratrol and anti-atherogenic effects. *Int J Food Sci Nutr* 2015; 66(6): 603-610.

- 75.** Guo S , Yao Q, Ke Z, Chen H, Wu J, Liu C. Resveratrol attenuates high glucose-induced oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis through AMPK. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 412: 85–94.
- 76.** Li H, Förstermann U. Resveratrol: A multifunctional compound improving endothelial function. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009; 23: 425 – 429.
- 77.** Gresele P, Pignatelli P, Guglielmini G, Carnevale R, Mezzasoma A, Ghiselli A, Momi S, Violi F. Resveratrol, at Concentrations Attainable with Moderate Wine Consumption, Stimulates Human Platelet Nitric Oxide Production. *J. Nutr.* 2008, 138(9): 1602–1608.
- 78.** Zghonda N, Yoshida S, Araki M, Kusunoki M, Mliki A, Ghorbel A, Miyazaki H. Greater effectiveness of e-viniferin in red wine than its monomer Resveratrol for inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011; 75(7): 1259 – 1267.
- 79.** Chow S, Hshu Y, Wang J, Chen J. Resveratrol attenuates oxldl-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidative functional damages. *J Appl Physiol.* 2007; 102(4): 1520–1527.
- 80.** Ramprasath V & Jones P. Anti-atherogenic effects of resveratrol. *Eur J Clin Nutr.* 2010; 64(7): 660–66.
- 81.** Göçmen A, Burgucu D, Gümüşlü S. Effect of resveratrol on platelet activation in hypercholesterolemic rats: CD40–CD40L system as a potential target. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2011; 36(3): 323-330.
- 82.** Xie H, Han H, Chen Z, & He J. A study on the effect of resveratrol on lipid metabolism in hyperlipidemic mice. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2014; 11(1): 209-212.
- 83.** Faghihzadeh F, Adibi P, Hekmatdoost A. The effects of resveratrol supplementation on cardiovascular risk factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr.* 2015; 114(5): 796-803.

- 84.** Kolodgie F, Katocs A, Largis E, Wrenn J, Herderick E, Lee S, et al. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low level cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16(12): 1454-1464.
- 85.** Meng C, Liu J, Du A. Cardioprotective effect of resveratrol on atherogenic diet-fed rats. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7(11): 7899–7906.
- 86.** Park D, Baek K, Kim J, Lee J, Ryu S, Chin B, Baek S. Resveratrol inhibits foam cell formation via NADPH oxidase 1 – mediated reactive oxygen species and monocyte chemotactic protein -1. *Exp Mol Med* 2009; 41(3): 171 – 179.