

Protección antioxidante de un extracto enzimático de orujo de la uva y sus polifenoles mayoritarios sobre la activación de NADPH oxidasa y la inhibición de superóxido dismutasa

Perez-Ternero C.¹, Rodríguez-Rodríguez R.¹, Parrado J.², Herrera M.D.¹, Álvarez de Sotomayor M.¹

El orujo de la uva (grape pomace, GP) es un subproducto de la producción del vino, rico en polifenoles tales como (+)-catequina (CAT) y (-)-epicatequina (EPI) con propiedades vasodilatadoras, antioxidantes y antiagregantes ⁽¹⁾ que aportan protección frente a patologías cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer entre otras ⁽²⁾. Por ello han sido importante objeto de estudio, no sólo en la profundización de los mecanismos moleculares que están detrás de su actividad, sino en el desarrollo de nuevos métodos para su extracción de partir de subproductos de la industria vinífera ⁽³⁾.

El objetivo de este estudio fue la caracterización de la vía implicada en la actividad vasoprotectora de un extracto enzimático del orujo de la uva (GP-EE), centrándonos en los dos principales sistemas enzimáticos relacionados con la regulación vascular de O₂⁻: NADPH oxidasa (NADPHox) y superóxido dismutasa (SOD).

GP-EE se obtuvo mediante extracción enzimática con endoproteasas a temperatura (60°C) y pH (pH 8) controlados. Posteriormente, su composición se evaluó por HPLC-ESI-MS/MS ⁽⁴⁾. Se realizaron ensayos de reactividad vascular en aorta de rata, medida de la producción de O₂⁻ mediante luminiscencia con lucigenina y de expresión proteica mediante WB ⁽⁵⁾.

Dosis acumulativas de GP-EE, CAT y EPI indujeron vasodilatación en anillos de aorta intactos (E_{max}: 91.26±6.69 %, 65.45±5.94 % y 46.01±9.05 % respectivamente) . En anillos desprovistos de endotelio la

vasodilatación fue mucho menor con todos los compuestos .

ET-1 es un factor derivado de endotelio capaz de producir vasoconstricción y disfunción endotelial a causa del incremento en O₂⁻ derivado de la activación de NADPHox ⁽⁶⁾. La vasoconstricción inducida por ET-1 fue revertida por GP-EE (p<0.001) pero no por los polifenoles aislados , mientras que la disfunción endotelial fue restaurada parcialmente por GP-EE y CAT (resultados no mostrados). Tanto GP-EE como sus polifenoles aislados redujeron la producción de O₂⁻ y la expresión de la subunidad p47^{phox} (p<0.001) inducidas por ET-1, sin embargo, sólo GP-EE tuvo efectos sobre la expresión de Nox-1 (p<0.01) , lo que explicaría en parte la inhibición de la vasoconstricción inducida por ET-1 observada con GP-EE.

La principal enzima antioxidante a nivel cardiovascular es SOD. Su inhibición mediante DETCA aumentó el estrés

*Perez-Ternero C.¹,
Rodríguez-Rodríguez R.¹,
Parrado J.², Herrera M.D.¹,
Álvarez de Sotomayor M.¹*

*¹ Departamento de
Farmacología, Facultad de
Farmacia, Universidad de
Sevilla, Sevilla, España.*

*² Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular, Facultad de
Farmacia, Universidad de
Sevilla, Sevilla, España.*

*Coordinado por
Manuela García López
Instituto Teófilo Hernando
(ITH), Universidad Autónoma
de Madrid (UAM)*

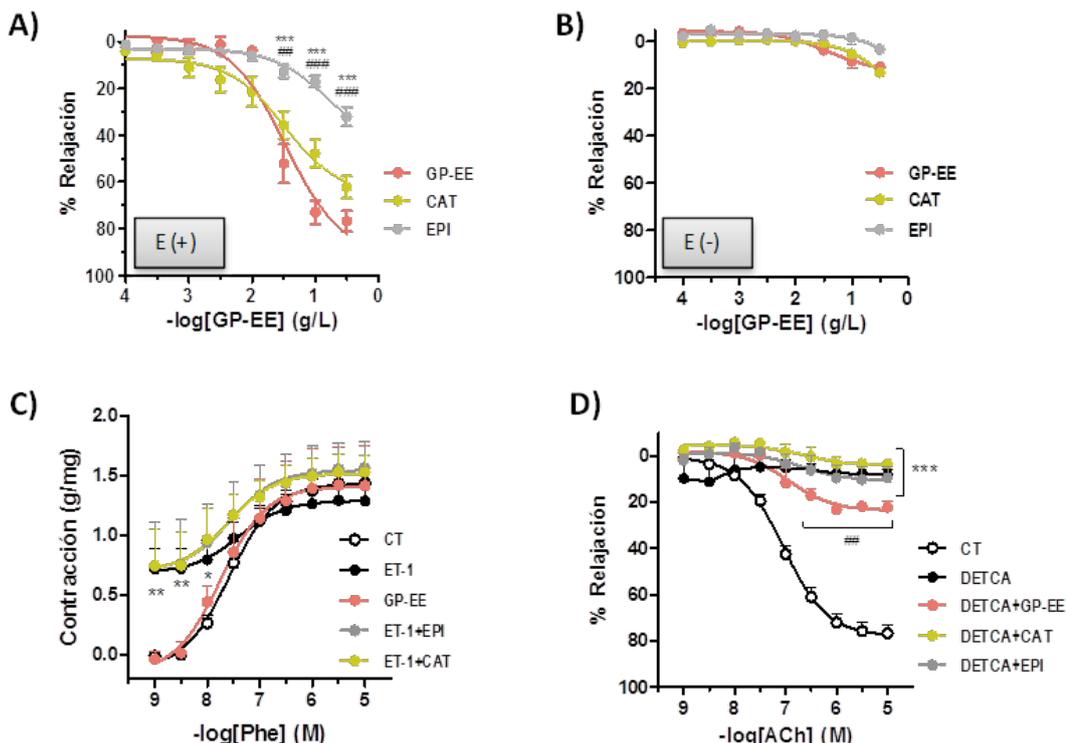


Figura 1: Curvas dosis-respuesta de GP-EE (10^{-4} - 3×10^{-1} g/L), CAT (9.01×10^{-6} - 2.70×10^{-2} g/L) y EPI (4.46×10^{-6} - 1.35×10^{-2} g/L) en anillos de aorta de rata con (A) y sin endotelio (B) contraídos con Phe 1 mM. *** $p < 0.001$ vs GP-EE, #### $p < 0.001$ vs CAT. Respuesta a Phe (1 nM - 100 μ M) (C) en presencia de ET-1 (10 nM) y GP-EE (3×10^{-2} g/L), CAT (2.7×10^{-3} g/L) o EPI (1.35×10^{-3} g/L). *** $p < 0.001$ vs CT. Respuesta a ACh (1 nM - 100 μ M) (D) en presencia de DETCA (1 mM) y GP-EE (3×10^{-2} g/L), CAT (2.7×10^{-3} g/L) o EPI (1.35×10^{-3} g/L). *** $p < 0.001$ vs CT y #### $p < 0.001$ vs CAT.

oxidativo y redujo la relajación endotelio-dependiente ($p < 0.001$). Aunque sólo GP-EE preservó parcialmente la disfunción endotelial ($p < 0.01$), tanto GP-EE como sus polifenoles aislados revertieron el

incremento en la detección de O_2^- . Sin embargo, únicamente GP-EE previno la regulación a la baja de Mn-SODy EC-SOD inducida por DETCA. GP-EE no modificó la contracción

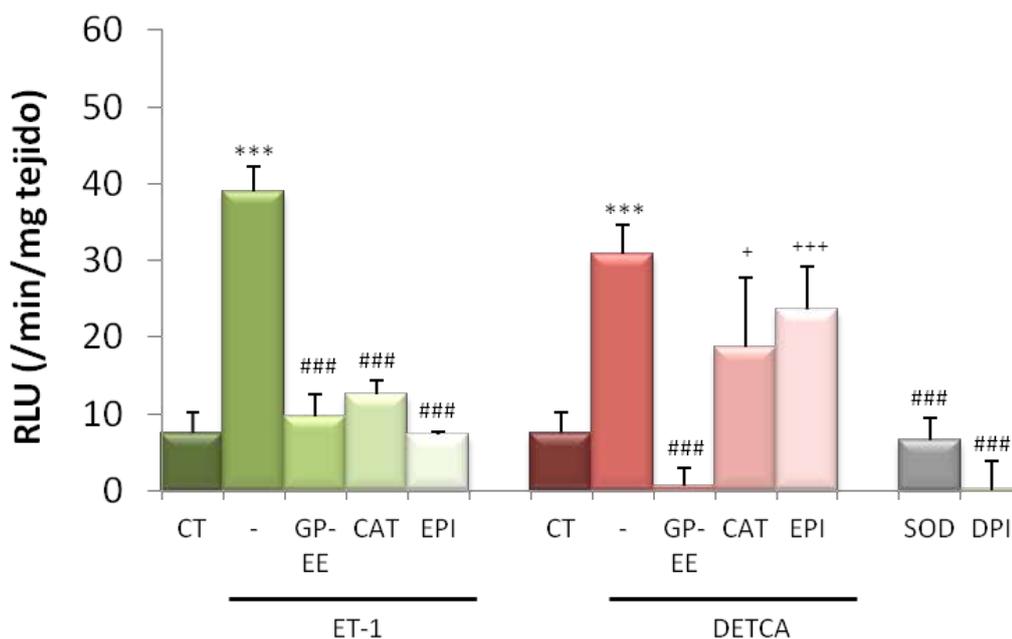


Figura 2: Efecto de GP-EE (3×10^{-2} g/L), CAT (2.70×10^{-3} g/L) y EPI (1.35×10^{-3} g/L) en presencia de DETCA (1mM) o ET-1 (10 nM) en la producción de anión superóxido determinada por luminiscencia con lucigenina en *** $p < 0.001$ vs CT, #### $p < 0.001$ vs ET-1 o DETCA y + $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ vs DETCA+GP-EE.

transitoria inducida por Phe en un medio libre de Ca^{2+} ni la contracción asociada al influjo a través de canales de Ca^{2+} voltaje dependiente. Sin embargo, a diferencia de CAT y EPI, GP-EE revirtió la contracción inducida por ET-1, tanto por liberación de Ca^{2+} intracelular como por el paso a través de canales de Ca^{2+}

voltaje dependiente, indicando que la contracción inducida por ET-1 no está relacionada con la señalización interna de Ca^{2+} , sino con la reducción de la expresión de p47^{phox} (7).

GP-EE muestra una vasoprotección más potente además de acciones adicionales

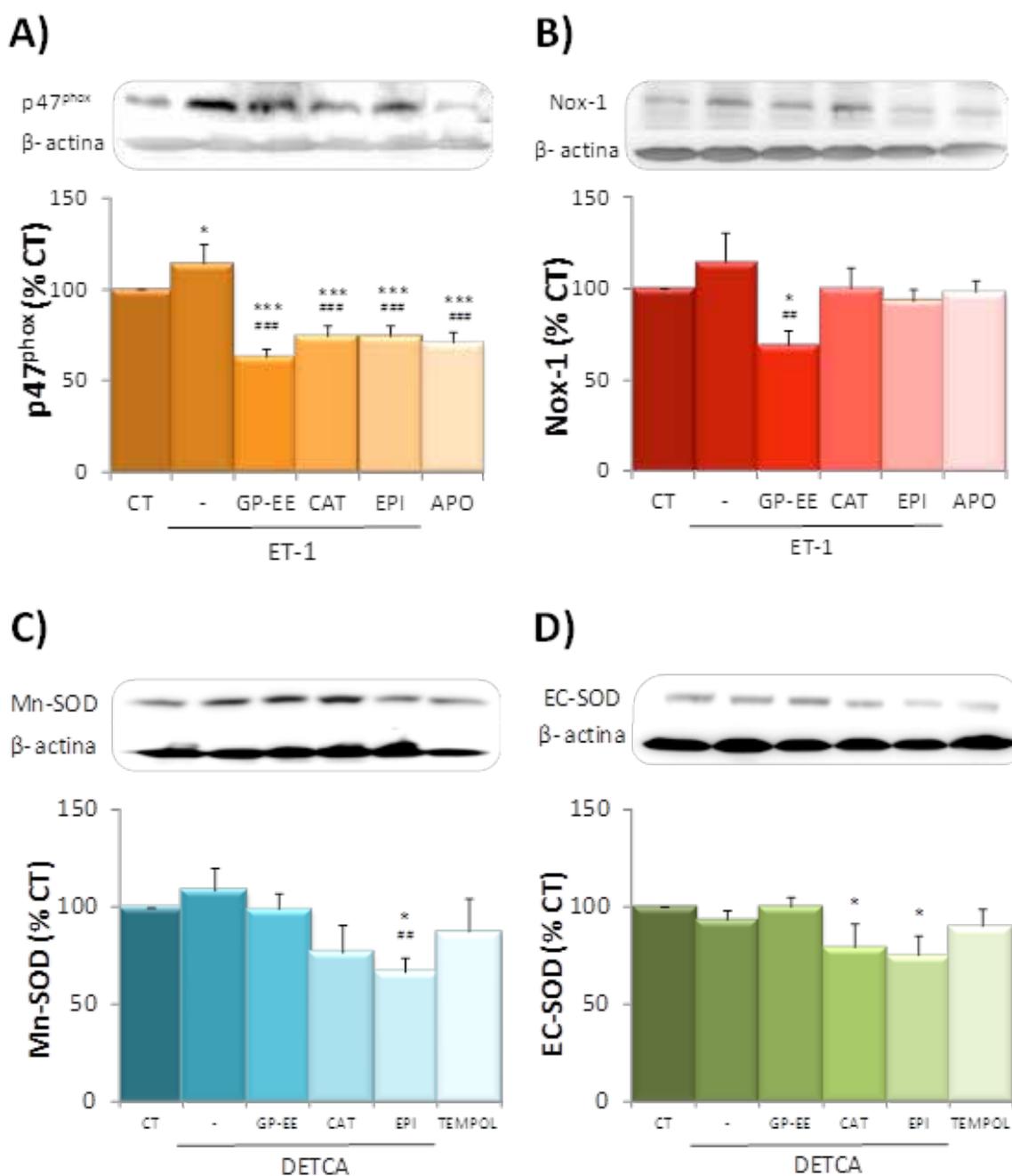
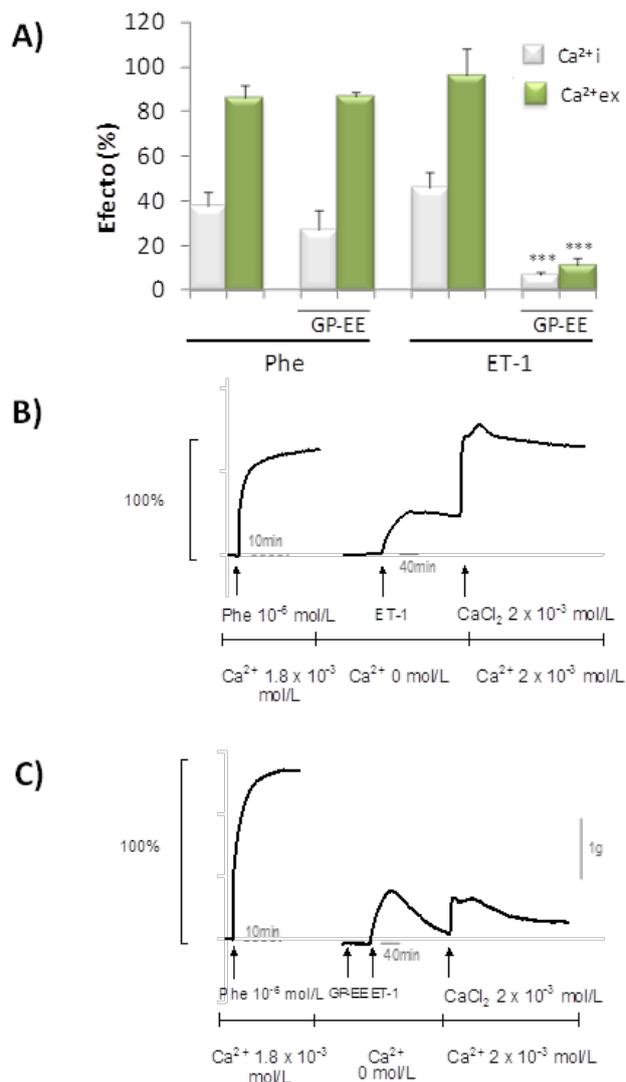


Figura 3: Expresión de las subunidades de NADPHox p47^{phox} (A), Nox-1 (B) y de las isoformas de SOD Mn-SOD (C) y EC-SOD (D) en VSMC tras 2h de incubación con ET-1 (10 nM) o 30 minutos con DETCA (1 mM) en presencia o ausencia de GP-EE (3×10^{-2} g/L), CAT (2.70×10^{-3} g/L) o EPI (1.35×10^{-3} g/L). * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ vs CT, ### $p < 0.001$ vs ET-1, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs CT y ## $p < 0.01$ vs DETCA.

no observadas con los polifenoles aislados, especialmente llamativos en la vasoconstricción inducida por ET-1, que podría estar relacionada con una mayor reducción de la expresión p47^{phox} y Nox-1, y en la prevención de la disfunción endotelial inducida por DETCA así como en el bloqueo de la regulación a la baja de EC-SOD y Mn-SOD. Los resultados muestran además que CAT es el principal responsable de la actividad

de GP-EE cuando está implicado el endotelio, posiblemente debido a su mayor presencia en el extracto. Por todo esto GP-EE se muestra como un posible suplemento nutricional útil en estados de estrés oxidativo.

Figura 4: Contracción inducida por Phe o ET-1 en un medio libre de calcio o 2 mM CaCl₂ en anillos sin endotelio incubados o no con GP-EE (3x10⁻² g/L) (A). Trazados de la contracción inducida por ET-1 en un medio libre de calcio y tras adición del mismo en ausencia (B) o presencia de GP-EE (C). Respuesta contráctil expresada como porcentaje de la contracción inducida por Phe en presencia de calcio. ***p<0.001 vs CT en ausencia de GP-EE.



BIBLIOGRAFÍA

- Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., & Li, H. B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 622–646.
- Vislocky, L.M., Fernandez, M.L. (2010). Bio-medical effects of grape products. *Nutrition reviews*, 68, 656-670
- Lorrain, B., Ky, I., Pechamat, L., & Teissedre, P. L. (2013). Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules*, 18, 1076–1100.
- Rodríguez-Rodríguez, R., Justo, M. L., Claro, C. M., Vila, E., Parrado, J., Herrera, M. D., & de Sotomayor, M. A. (2012). Endotheliumdependent vasodilator and antioxidant properties of a novel enzymatic extract of grape pomace from wine industrial waste. *Food Chemistry*, 135, 1044–1051.
- Perez-Ternero, C., Rodríguez-Rodríguez, R., Parrado, J., Alvarez de Sotomayor, M. (2013). Grape pomace enzymatic extract restores vascular dysfunction evoked by endothelin-1 and DETCA via NADPH oxidase downregulation and SOD activation. *Journal of functional foods*, 5 (4), 1673-1683.
- Loomis, E. D., Sullivan, J. C., Osmond, D. A., Pollock, D. M., & Pollock, J. S. (2005). Endothelin mediates superoxide production and vasoconstriction through activation of NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide synthase in the rat aorta. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315, 1058–1064.
- Dai, D. Z., & Dai, Y. (2010). Role of endothelin receptor A and NADPH oxidase in vascular abnormalities. *Journal of Vascular Health and Risk Management*, 6, 787–794.