

Efecto del resveratrol sobre la pentraxina 3 sérica en la aterosclerosis. Pentraxina 3 como marcador de aterosclerosis

Effect of resveratrol on seric pentraxin 3 on atherosclerosis.
Pentraxin 3 as an atherosclerosis marker

LETICIA FIGUEIRA^{A,*}, JULIO CÉSAR GONZÁLEZ^{A,B}

Resumen

El resveratrol es una fitoalexina con efectos antiinflamatorios y antiaterogénicos. La pentraxina 3 (PTX3) y la proteína C reactiva (PCR) están involucradas en la fisiopatología de la aterosclerosis. Se evaluó el efecto del resveratrol sobre los niveles séricos de PTX3 y PCR y su evolución en el tiempo en conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol. 40 conejos machos Nueva Zelanda fueron divididos en cuatro grupos durante 12 semanas: **Grupo 1 (control):** conejarina. **Grupo 2:** conejarina suplementada con 0,5% p/p de colesterol. **Grupo 3 (control resveratrol):** conejarina y resveratrol (2mg/Kg). **Grupo 4:** conejarina suplementada con 0,5% colesterol y resveratrol. Se realizaron determinaciones séricas de triglicéridos, colesterol y sus fracciones, PCR y PTX3 al inicio, 6ta, y 12ma semana de experimentación. La mitad de los conejos fueron sacrificados a la 6ta y 12ma semana y se realizó estudio histológico de su aorta. Se encontró un aumento de los niveles séricos de PTX3 y PCR en los grupos 2 y 4 desde la 6ta semana de experimentación con respecto a los grupos 1 y 3, respectivamente ($p < 0,0051$). En la duodécima semana se observó que el resveratrol revirtió el aumento de los niveles de PTX3 y PCR inducido por la dieta enriquecida con colesterol ($p < 0,0050$). El tratamiento con resveratrol disminuyó la formación de ateromas. En conclusión, la PTX3 y la PCR séricas constituyen marcadores tempranos no invasivos de inflamación y aterosclerosis. La suplementación oral de resveratrol ejerce efectos antiinflamatorios y anti-ateroscleróticos, disminuyendo las concentraciones séricas de PTX3 y la formación y evolución de las lesiones ateroscleróticas.

Palabras clave: Pentraxina-3, proteína C reactiva, resveratrol, inflamación, aterosclerosis.

Abstract

Resveratrol is a phytoalexin and has anti-inflammatory and antiatherogenic actions. Pentraxin 3 (PTX3) and C reactive protein (CRP) are involved in atherosclerosis. We evaluated the effect of resveratrol on serum concentrations of PTX3 and CRP during the progression and evolution of atherosclerosis and its evolution over time in rabbits fed with a cholesterol diet. 40 New Zealand white male rabbits were randomly divided into four groups that received for 12 weeks: **Group 1 (control):** standard diet (commercial rabbit food). **Group 2:** cholesterol diet (0.5% cholesterol). **Group 3 (control resveratrol):** standard diet (commercial rabbit food) and resveratrol (2mg/Kg). **Group 4:** cholesterol diet (0.5% cholesterol) and resveratrol (2mg/Kg). Blood samples of overnight-fasted rabbits were collected on basal, sixth and twelfth weeks, and concentration of lipid profile, CRP and PTX3 were determined. Half of the animals were sacrificed on sixth or on twelfth week, and the aorta was dissected for histological studies. Our findings demonstrated that the PTX3 and CRP levels were significantly higher in Groups 2 and 4 than groups 1 and 3, respectively since on 6th week ($p < 0.0051$). Resveratrol treatment reversed the increased levels of PTX3 and CRP induced by cholesterol diet on 12th week ($p < 0.0050$). Supplementation of resveratrol diminished the formation of atherosclerotic lesions. These results support that serum PTX3 and CRP levels are early markers of atherosclerosis. Oral supplementation of resveratrol exerts anti-inflammatory and anti-atherosclerotic effects, decreasing serum concentrations of PTX3 and formation and evolution of atherosclerotic lesions.

Key words: Pentraxin 3, C reactive protein, resveratrol, inflammation, atherosclerosis.

A Escuela de Bioanálisis, Laboratorio de Investigación y Postgrado de la Escuela de Bioanálisis (LIPEB), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Carabobo, Venezuela.

B Laboratorio Clínico Julio César González. Carabobo, Venezuela.

* Correspondencia: figueiraleticia@gmail.com.

Introducción

Las pentraxinas son un grupo de proteínas multifuncionales caracterizadas por una estructura cíclica multimérica, que incluyen a la proteína C reactiva (PCR), el componente amiloide P sérico (SAP) y la pentraxina 3 (PTX3) (Manfredi y col., 2008), las cuales juegan un papel importante en la inmunidad innata y son consideradas como proteínas de fase aguda (Mantovani y col., 2008); sin embargo, sus efectos en la modulación del sistema cardiovascular influyen en diversos fenómenos tales como la inflamación, angiogénesis y adhesión celular (Fornai y col., 2016).

La PTX3 es un miembro de la familia de las pentraxinas largas, cuya síntesis es inducida rápidamente bajo estimulación de citoquinas pro-inflamatorias en varios grupos celulares, incluyendo células dendríticas, musculares lisas, macrófagos y leucocitos (Rolph y col., 2002). Asimismo, esta glicoproteína inflamatoria es sintetizada localmente en el sistema vascular (Deban y col., 2010); de hecho, se ha reportado un aumento en la expresión de PTX3 en lesiones ateroscleróticas humanas y animales (Rolph y col., 2002; Norata y col., 2009), colocalizándose con macrófagos, neutrófilos y células endoteliales (Savchenko y col., 2008; Daida, 2011). El papel de la PTX3 en la aterosclerosis no está del todo esclarecido (Fornai y col., 2016); pues se le ha descrito propiedades anti-inflamatorias y pro-inflamatorias (Shindo y col., 2014; Shiraki y col., 2016); sin embargo, su liberación parece ser una respuesta específica al daño vascular, lo cual indica que esta proteína puede proveer de mejor información sobre el desarrollo y progresión de la aterosclerosis que otros marcadores no específicos, como la PCR (Jenny y col., 2009).

En este sentido, estudios clínicos han descrito la utilidad de la PTX3 como biomarcador en diversas enfermedades como la angina inestable, el síndrome coronario agudo y la insuficiencia cardiaca crónica (Latini y col., 2004; Inoue y col., 2007; Kotooka y col., 2008). Asimismo, se ha reportado elevados niveles séricos de PTX3 durante la aterosclerosis e inflamación (Norata y col., 2010), evidenciando que dichos niveles se asocian de manera independiente con las enfermedades cardiovasculares (Jenny y col., 2009; Soeki, 2011); y con la severidad de la aterosclerosis carotídea y femoral; siendo un marcador de aterosclerosis avanzada en humanos; y mejor predictor de enfermedades cardiovasculares que la PCR, pues tiene menor asociación con otras condiciones de riesgo vascular y puede ser más específico para inflamación de la pared vascular (Knoflach, 2012; Ali y col., 2017).

Estudios epidemiológicos y experimentales han sugerido que la ingesta de antioxidantes está asociado con un reducido riesgo de enfermedades cardiovasculares y puede evitar y/o revertir la progresión de la aterosclerosis (Pashkow, 2011; Figueira y col., 2008A,B; Figueira y col., 2010; Figueira y González, 2018; González y col., 2018). El resveratrol (3',5,4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol presente en la piel de la uva y en el vino tinto, al cual se le ha descrito propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y antiproliferativas; siendo un agente beneficioso para prevenir y/o revertir el inicio y evolución de la aterosclerosis (Figueira, 2010; Zghonda y col., 2011). En este sentido, se ha descrito que este polifenol mejora la función vascular mediante el incremento en la síntesis del óxido nítrico (NO) y la disminución de su inactivación (Li y Förstermann, 2009), ejerce efectos antioxidantes, induciendo

la expresión de enzimas antioxidantes como la heme oxigenasa-1 a través del factor relacionado al factor nuclear tipo 2 (Zghonda y col., 2011), inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno en plaquetas estimuladas con colágeno (Zghonda y col., 2011); además, ejerce efectos anti-inflamatorios, pues inhibe la producción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleucina -6 (IL-6) inducida por lipopolisacárido (LPS) *in vitro* en macrófagos (Kang y col., 2010) y disminuye la expresión de moléculas de adhesión celular, atenuando la adhesividad de los monocitos al endotelio (Ferrero y col., 1998, Carluccio y col., 2003). Sin embargo, hasta los momentos no está claro el efecto del resveratrol sobre las concentraciones séricas de la PTX3 durante la progresión y evolución de la aterosclerosis; aún más, se conoce todavía menos su evolución a lo largo del proceso aterogénico. Es por ello que en el presente estudio se evaluó el efecto del resveratrol sobre los niveles séricos de PTX3 y su evolución en el tiempo en conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol.

Materiales y métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se emplearon 40 conejos macho 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 \pm 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 10

conejos cada uno: **Grupo 1 (control):** alimentados diariamente con dieta estándar (Protinal, Venezuela). **Grupo 2:** alimentados diariamente con dieta estándar enriquecida con 0,5% p/p de colesterol. **Grupo 3 (control resveratrol):** alimentados diariamente con dieta estándar y suplementados con resveratrol en el alimento (2 mg/Kg de peso corporal, vía oral). **Grupo 4:** alimentados diariamente con dieta estándar, enriquecida con 0,5% p/p de colesterol y resveratrol mezclado en el alimento (2 mg/Kg de peso corporal, vía oral).

La dosis de resveratrol se seleccionó con base en estudios *in vivo* en conejos (Matos y col., 2012; Figueira y González, 2018), en las cuales el resveratrol posee efectos biológicos a dosis de 2 mg/Kg por vía oral. El resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno) administrado a los conejos fue de origen natural (Sigma-Aldrich, USA).

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 aprobados por el comité de Bioética, y siguieron las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio del National Institute of Health (NIH Guide).

ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS ALIMENTOS

Conejarina comercial (Protinal, Venezuela): 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 mediante el enriquecimiento de una dieta estándar se realizó de acuerdo con el método descrito en los modelos animales de aterosclerosis inducida por la dieta (Rasmusen y col., 2007); la cual se preparó disolviendo el colesterol en etil éter y etanol absoluto, y cubriendo con esta mezcla los granos de la conejarina en una relación de 0,5 g de colesterol por cada 100 g de alimento y se dejó secar hasta la evaporación completa de los solventes por 24 horas.

Procedimiento experimental. Determinaciones bioquímicas: Las muestras de sangre fueron extraídas por punción intracardiaca a todos los conejos previo ayuno de 14 horas en las semanas 0, 6ta y 12ma, utilizando tubos sin anticoagulante. Posteriormente, las muestras previamente mantenidas en frío, se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 minutos y el suero obtenido fue conservado en congelación a -70 °C hasta el momento del procesamiento. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) por métodos enzimáticos (Linear Chemicals, España). La determinación del colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y asociado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) se realizaron por precipitación y posterior determinación enzimática (Linear Chemicals, España). La determinación cuantitativa de la PCR se realizó por método inmuno-turbidimétrico (Alpco, USA) Las concentraciones séricas de PTX3 fueron determinadas por ensayo inmunoenzimático (NeoBiolab, Cambridge, Massachusetts, USA).

Sacrificio de los animales. Preparación de tejidos y tipificación histológica de las lesiones ateroscleróticas: A la 6ta semana y al final del estudio la mitad de los animales de cada grupo fueron sacrificados por dislocación cervical; posteriormente se procedió a realizar la autopsia de dichos animales, extrayendo la arteria aorta para ser examinada. Las muestras de tejido extraídas, fueron fijadas en formaldehído al 10 % en PBS durante 24 horas y procesadas según la técnica de rutina y posteriormente teñidas con hematoxilina – eosina, para luego ser observados por microscopía de luz. Las lesiones fueron tipificadas de acuerdo a la clasificación de la American Heart Association (Stary y col., 1995).

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se calculó promedio y desviación estándar para las variables estudiadas. Se realizaron las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov y 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 la PTX3 y PCR con las variables del estudio. Se consideró significativo $p < 0,05$. Se utilizó el programa *GraphPad Prism* versión 5.

Resultados

PERFIL LIPÍDICO DE LOS CONEJOS

Las concentraciones séricas del perfil lipídico de los conejos sujetos a estudio se resume en la **tabla I**. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones séricas basales de CT, c-HDL, c-LDL y TG entre los grupos de conejos. El CT, c-HDL, c-LDL y TG en los grupos 1 y 3 permanecieron sin cambios

Tabla I
Perfil lipídico de los conejos sujetos a estudio

Grupos	CT (mg/dL)	c-LDL (mg/dL)	c-HDL (mg/dL)	TG (mg/dL)
Basal				
1	71 ± 7	37 ± 7	29 ± 5	69 ± 12
2	68 ± 14	37 ± 6	27 ± 6	71 ± 9
3	67 ± 11	36 ± 7	26 ± 7	72 ± 12
4	69 ± 12	35 ± 7	28 ± 5	69 ± 11
6ta semana				
1	68 ± 8	38 ± 6	31 ± 6	69 ± 11
2	709 ± 134*	557 ± 76*	77 ± 12*	706 ± 111*
3	74 ± 11	40 ± 8	27 ± 6	75 ± 10
4	697 ± 122#	604 ± 82#	76 ± 11#	735 ± 87#
12ma semana				
1	71 ± 10	36 ± 6	31 ± 5	70 ± 13
2	1289 ± 266*	882 ± 75*	80 ± 11*	1088 ± 320*
3	71 ± 15	40 ± 10	25 ± 6	74 ± 12
4	1349 ± 210#	851 ± 70#	82 ± 11#	1112 ± 229#
Valores p				
1	0,8239	0,7756	0,6434	0,9723
2	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
3	0,5007	0,3982	0,5332	0,8158
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.
 c-HDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, c-LDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad, CT: Colesterol total, TG: Triglicéridos.

significativos a lo largo del estudio. Por su parte, en la 6ta y 12ma semana de experimentación se observó 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 al grupo 1 y grupo 3, respectivamente ($p < 0,0001$). Para los grupos 2 y 4 las concentraciones del perfil lipídico variaron desde el inicio hasta el final del experimento ($p < 0,0001$); sin embargo, no se observaron diferencias

estadísticamente significativas en las concentraciones séricas de CT, c-HDL, c-LDL y TG en el grupo 4 con respecto al grupo 2 a lo largo del estudio (Tabla I).

CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LOS MARCADORES DE INFLAMACIÓN.

Como se puede apreciar en las figuras 1 y 2, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas basales de la PTX3 y PCR entre los grupos de conejos sujetos a estudio. Asimismo, la PTX3 y la PCR en los grupos 1 y 3 permanecieron sin cambios a lo largo del experimento; por su parte, los niveles de dichas proteínas en los grupos 2 y 4 variaron a lo largo del estudio ($p < 0,0001$). En la sexta semana y al final del experimento las concentraciones séricas de la PTX3 y PCR aumentaron en el grupo 2 con respecto al grupo 1 ($p < 0,0049$; $p < 0,0049$, respectivamente), y en el grupo 4 con respecto al grupo 3 ($p < 0,0049$; $p < 0,0051$, respectivamente). Sin embargo, en la duodécima semana se observó una disminución significativa

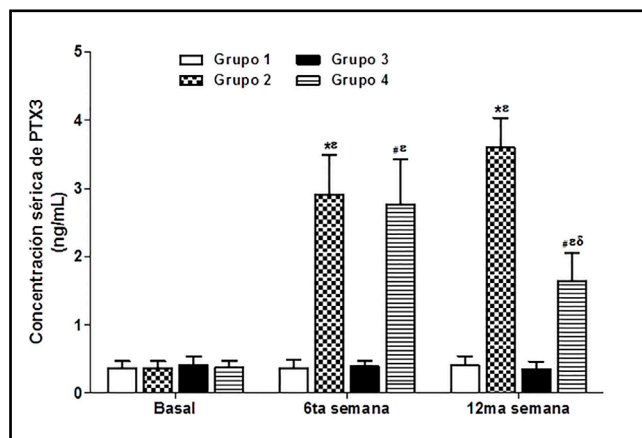


Figura 1. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones séricas de PTX3 en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 6ta y 12ma. Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar de la media (N=10 basal y 6ta semana; N=5 en la 12ma semana). * $p < 0,0049$ vs. grupo control (Grupo 1). # $p < 0,0049$ vs. control resveratrol (Grupo 3). $^{\circ}p = 0,0049$ vs. Grupo 2. $^{\circ}p < 0,0014$ vs. su respectivo valor basal.

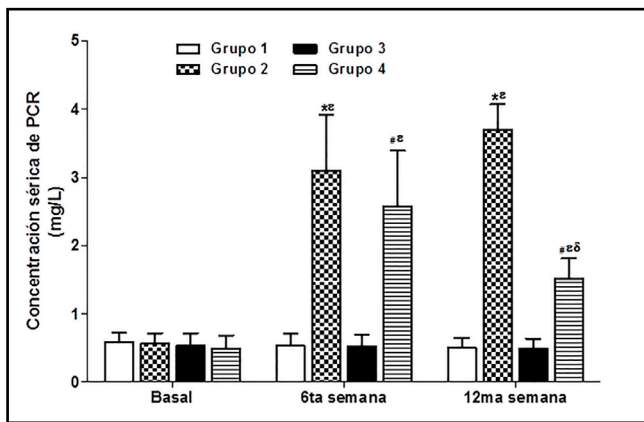


Figura 2. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones sérica de PCR en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 6ta y 12ma. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media (N=10 basal y 6ta semana; N=5 en la 12ma semana). * $p < 0,0049$ vs. grupo control (Grupo 1). # $p < 0,0051$ vs. control resveratrol (Grupo 3). ° $p = 0,0050$ vs. Grupo 2. ° $p < 0,0013$ vs. su respectivo valor basal.

de los niveles de PTX3 y PCR en el grupo 4 con respecto al grupo 2 ($p = 0,0049$; $p < 0,0050$, respectivamente).

En la **tabla II** se muestra el análisis de Spearman de las correlaciones entre la concentración de PTX3, PCR y el perfil lipídico, evidenciando correlación positiva significativa entre la PTX3 con la PCR y de estas pentraxinas con el perfil lipídico ($p < 0,0001$).

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA AORTA

En la **tabla III** se presenta la distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta, evidenciando que 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 3**).

Tabla II

Análisis de la correlación de Spearman entre las concentraciones de la PTX-3, PCR y el perfil lipídico

	r	p
PTX3 & CT	0,5713	0,0001
PTX3 & c-LDL	0,5707	0,0001
PTX3 & c-HDL	0,6172	0,0001
PTX3 & TG	0,6934	0,0001
PTX3 & PCR	0,6632	0,0001
PCR & CT	0,6261	0,0001
PCR & c-LDL	0,6082	0,0001
PCR & c-HDL	0,7164	0,0001
PCR & TG	0,6429	0,0001

c-HDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, c-LDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad, CT: Colesterol total, PCR: Proteína C reactiva, PTX3: Pentraxina 3, TG: Triglicéridos.

Tabla III

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	5	0	0	0	0	0
	100%	0%	0%	0%	0%	0%
2	0	2	3	0	0	0
	0%	40%	60%	0%	0%	0%
3	5	0	0	0	0	0
	100%	0%	0%	0%	0%	0%
4	3	2	0	0	0	0
	60%	40%	0%	0%	0%	0%
Duodécima semana						
1	5	0	0	0	0	0
	100%	0%	0%	0%	0%	0%
2	0	0	0	0	5	0
	0%	0%	0%	0%	100%	0%
3	5	0	0	0	0	0
	100%	0%	0%	0%	0%	0%
4	2	1	1	1	0	0
	40%	20%	20%	20%	0%	0%

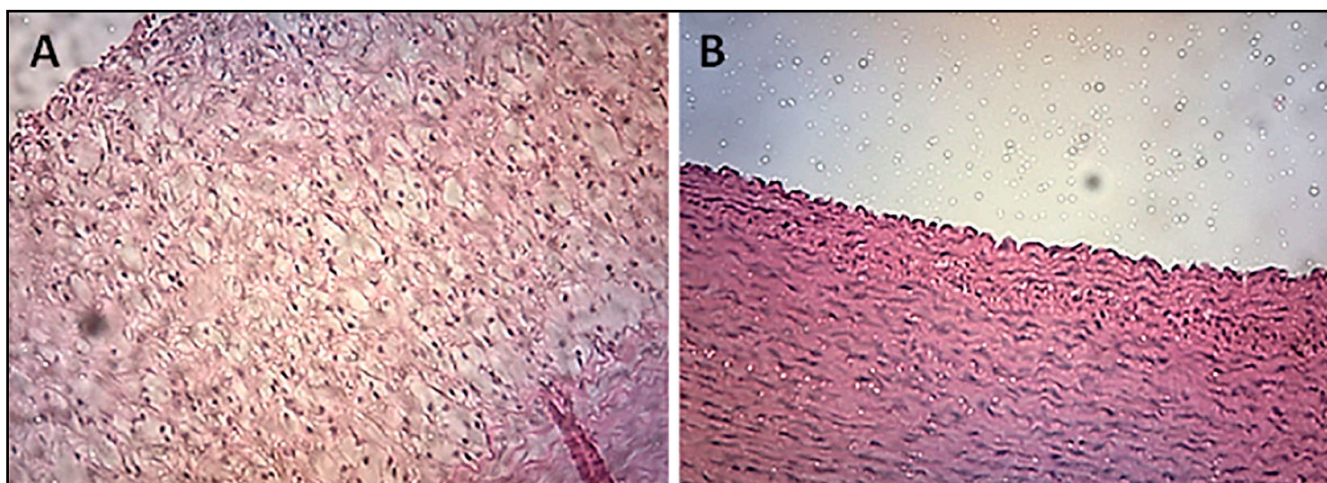


Figura 3. Cortes histológicos de las aortas de los conejos al final del estudio. Lesión tipo IV (Panel A). Se observa en la íntima arterial cúmulos de lípidos intracelulares y extracelulares en mayor extensión de un conejo perteneciente al grupo 2. Aorta normal (Panel B) de un conejo perteneciente al grupo 4. Tinción hematoxilina - eosina. 50X

Discusión

La inflamación es reconocida como un factor crítico involucrado en el desarrollo, progresión y ruptura de la placa aterosclerótica y en la formación de trombos, lo cual ha llevado a evaluar a diversos marcadores de inflamación como potenciales herramientas para la predicción del riesgo de enfermedad cardiovascular (Figueira y col., 2017). Entre éstos, el más empleado es la PCR; de hecho, se ha descrito asociación positiva entre niveles moderadamente elevados de la PCR ultrasensible (hsPCR) con el riesgo para el desarrollo de eventos cardiovasculares (Ridker y col., 2002). De igual manera, la PTX3 juega un papel importante como factor pronóstico para las enfermedades cardiovasculares (Inoue y col., 2007; Alipour-Parsa y col., 2017), siendo un marcador útil para el diagnóstico cardiovascular e indicador del estado de la enfermedad (Kimihiro y col., 2016); de hecho, se ha descrito que la PTX3 parece ser un poderoso predictor para determinar la vulnerabilidad de la placa (Liu y col., 2015). Sus niveles elevados podrían ayudar a predecir la severidad de la enfermedad coronaria (Nerkiz y col., 2015);

y además tiene valor en la predicción de la severidad y pronóstico en pacientes con infarto de miocardio (Peri y col., 2000). Por otra parte, la evidencia ha descrito que la PTX3 tiene valor superior al de la hsPCR; ya que en contraste con la PCR, que es principalmente producida en el hígado, la PTX3 es producida en el sitio de infección o inflamación por macrófagos, monocitos y células dendríticas, por lo que sus niveles reflejan inflamación local en la lesión aterosclerótica con mayor precisión que la PCR (Casula y col., 2017), actuando como un factor más específico de aterosclerosis e inflamación vascular coronaria y ha sido independientemente asociado con el progreso de la aterosclerosis y la enfermedad de las arterias coronarias (Jenny y col., 2009; Knoflach, 2012).

En el presente estudio se evidenció que tanto la PTX3 como la PCR podrían constituir marcadores tempranos no invasivos de aterosclerosis, pues la administración de una dieta enriquecida con colesterol ocasionó lesiones ateroscleróticas de grado intermedio y avanzado y un incremento en las concentraciones séricas de PTX3 y PCR a partir de la sexta semana de estudio, sugiriendo

el papel de estas moléculas desde las primeras fases de la aterosclerosis. En este sentido, diferentes estudios han encontrado que la PTX3 está fuertemente expresada en placas ateroscleróticas en comparación a arterias no afectadas (Rolph y col., 2002; Savchenko y col., 2008), demostrando mayor expresión en las placas vulnerables en comparación a las placas estables de arterias coronarias de pacientes con angina de pecho; siendo la inmunoreactividad para la PTX3 más intensa en áreas con hemorragia intraplaca (Matsuura y col., 2012). Por otra parte, la evidencia ha descrito un aumento en las concentraciones séricas de PTX3 en pacientes con estenosis carotídea, así como en pacientes con síndrome coronario agudo (Fornai y col., 2016), evidenciando que los niveles elevados de PTX3 en suero se correlacionan con la severidad de la aterosclerosis coronaria (Ohbayashi y col., 2009; Nerkiz y col., 2015), sugiriendo que la PTX3 es un biomarcador para aterosclerosis y sus niveles séricos reflejan inflamación local (Savchenko y col., 2008).

Las pentraxinas han demostrado jugar un papel relevante en la aterosclerosis; de hecho; la PCR es el marcador de inflamación más estudiado relacionado con pronóstico cardiovascular. Diferentes autores han señalado que esta proteína se encuentra presente en las lesiones ateroscleróticas de humanos y animales, y sus niveles se han encontrado elevados en la aterosclerosis desde sus fases temprana, tal y como se ha reportado previamente y en el presente estudio (Figueira y González, 2018), pudiendo contribuir con el proceso aterogénico, mediante la inducción de factores pro-inflamatorios como moléculas de adhesión celular, citoquinas y quimioquinas (Zwaka y col., 2001). Asimismo, se ha descrito que la PCR es capaz de incrementar de

manera directa la transcitosis de las LDL en las células endoteliales mediante la activación del inflammasoma NLRP3 (Bian y col., 2019), participando en la instauración de las lesiones ateroscleróticas.

Por otra parte, la PTX3 posee un papel dual en la aterosclerosis; modulando la respuesta inflamatoria, mostrando un complejo y poco conocido mecanismo de acción (Casula y col., 2017); pues por un lado promueve una respuesta anti-inflamatoria en macrófagos *in vitro* (Shiraki y col., 2016) y puede interactuar con la selectina-P atenuando el reclutamiento de leucocito al sitio de inflamación (Deban y col., 2010), lo cual sugiere un papel protector de la PTX3 en la aterosclerosis. Por el contrario, también se ha descrito que la PTX3 induce efectos deletéreos en la aterosclerosis, ya que promueve la formación de placas de ateroma, amplificando la respuesta inflamatoria vascular (Shindo y col., 2014), pues la PTX3 es un activador de los macrófagos y un determinante de la disfunción endotelial; pues la sobreexpresión de PTX3 reduce la producción de NO a través del incremento de la producción de metaloproteinasa de matriz tipo 1 y selectina P (Zhao y col., 2014; Carrizzo y col., 2015); incrementa la expresión del factor tisular en células endoteliales y mononucleares; además interfiere con la estabilidad de la placa mediante su unión con el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (Bassi y col., 2009); sugiriendo que la PTX3 podría promover la progresión de la lesión mediante una fuerte respuesta inmune. Por lo tanto, el aumento en las concentraciones de PTX3 y PCR observado en el presente estudio sugiere la existencia de un estado inflamatorio inducido por la dieta enriquecida con colesterol, la cual ocasionó lesiones ateroscleróticas de grado intermedio y avanzado.

Asimismo, nuestros hallazgos muestran una asociación positiva entre la PTX3 con la PCR y el perfil lipídico, tal y como ha sido reportado en otros estudios (Yang y col., 2014; Sabry y col., 2018), sugiriendo que el incremento de la concentración de los lípidos séricos podría contribuir a la instauración del proceso inflamatorio sistémico, el cual se ve acompañado del aumento de la PTX3 y la PCR, favoreciendo el proceso aterosclerótico. En este sentido, se ha descrito que estímulos inflamatorios como las LDL oxidadas y citoquinas inflamatorias incrementan la expresión y producción de PTX3 (Klouché y col., 2004). Por lo tanto, nuestros datos podrían sugerir que la PTX3 sérica puede constituir un marcador de riesgo y de aterosclerosis, pues el aumento de los lípidos séricos viene acompañado de un aumento del estado inflamatorio.

El resveratrol es un polifenol al que se le han atribuido propiedades cardioprotectoras, gracias a sus efectos anti-inflamatorios, antioxidantes y antiproliferativos; activa a la sirtuína -1, la sintasa de NO endotelial (eNOS), disminuye la formación de células espumosas, la producción de moléculas de adhesión celular, de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α (Figueira, 2010; Deng y col., 2011), inhibe la migración y proliferación de células de músculo liso vascular, ocasionando una disminución en la inflamación y activación vascular, mejorando la función endotelial (Bonfont, 2016).

Asimismo, algunos estudios clínicos han descrito que el resveratrol mejora el perfil lipídico (Tanko y col., 2016); sin embargo; en la presente investigación no se evidenció dicho efecto, tal y como ha sido reportado en otros estudios (Matos y col., 2012; Imamura y col., 2017; Figueira y González, 2018; González y col., 2018),

que sugieren que esto pudo ser debido al corto periodo experimental (Matos y col., 2012); sin embargo, nuestros datos y la evidencia sugieren que la ausencia del efecto hipolipemiante observado en este modelo experimental pudo ser debido a la acumulación de lípidos exógenos provenientes de su dieta, ya que los mismos no pueden incrementar la excreción de esteroides (González y col., 2008).

A pesar de que la suplementación del resveratrol no tuvo efecto sobre los lípidos séricos, fue capaz de ejercer efectos anti-inflamatorios y antiaterogénicos, pues se observó una disminución en las concentraciones séricas de PTX3 y PCR en la duodécima semana de experimentación que se acompañó con una disminución en la formación de lesiones ateroscleróticas en los conejos suplementados con este polifenol a los que se les administró una dieta enriquecida con colesterol, demostrando por primera vez el efecto del resveratrol sobre las concentraciones séricas de PTX3 en la aterosclerosis *in vivo*; tal y como ha sido reportado en estudios *in vitro* (Domínguez y col., 2013) e *in vivo* en otras patologías (Erbas y col., 2014). En este sentido, se ha descrito que la suplementación oral de resveratrol a ratas diabéticas disminuyó las concentraciones séricas de PTX3 con respecto a las ratas diabéticas no suplementadas (Erbas y col., 2014); asimismo, estudios *in vitro*, han descrito que el pretratamiento con resveratrol fue capaz de disminuir la expresión de PTX3, citoquinas y quimioquinas inflamatorias en leucocitos (Domínguez y col., 2013), lo cual sugiere que la PTX3 es un blanco farmacológico de este polifenol. De igual manera es relevante señalar que el resveratrol fue capaz de disminuir las concentraciones séricas de la PCR, tal y como lo hemos encontrado previamente (Figueira y González, 2018), lo cual

reafirma las propiedades antiinflamatorias de esta fitoalexina.

Por lo tanto, considerando que el resveratrol fue capaz de disminuir las concentraciones séricas de la PTX3 y la PCR, los cuales inducen la expresión y producción de factores pro-inflamatorios como moléculas de adhesión celular, citoquinas y quimioquinas, se podría inferir que uno de los efectos antiaterogénicos del resveratrol se deba a la disminución en la secreción de estas moléculas *in vivo* durante la aterosclerosis, lo cual podría contribuir a disminuir la inflamación vascular y la formación de ateromas, tal y como se ha reportado previamente (Matos y col., 2012; Figueira y González, 2018). Por otra parte, la acción anti-inflamatoria tardía 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 pudo ser ejercido posiblemente a través de la transcripción génica, inhibiendo y/o induciendo la expresión de factores de transcripción pro-inflamatorios y/o anti-inflamatorios respectivamente, el cual es un proceso que amerita más tiempo. En este sentido, el resveratrol ha demostrado disminuir la expresión y producción de moléculas de adhesión celular y citoquinas como el TNF- α y la IL-6, *in vitro* y atenuar la adhesividad de los monocitos al endotelio (Ferrero y col., 1998); mucho de estos efectos anti-inflamatorios son el resultado de la inhibición del factor nuclear - κ B y la proteína activadora -1 (Labinsky y col., 2006).

En conclusión, de acuerdo a nuestras condiciones experimentales, se sugiere que tanto la PTX3 como la PCR séricos constituyen marcadores tempranos, no invasivos de inflamación y aterosclerosis,

pues los mismos se elevaron desde la sexta semana de estudio, reafirmando su papel en la fisiopatología de la aterosclerosis. Por otra parte, se encontró que la suplementación oral de resveratrol ejerció efectos anti-inflamatorios y anti-aterogénicos, pues disminuyó las concentraciones séricas de PTX3 y PCR, la formación y evolución de las lesiones ateroscleróticas; por lo que éste podría ser considerado como un agente beneficioso para la prevención y tratamiento de la aterosclerosis.

Referencias bibliográficas

- Ali K, Oğuzhan Y, Ahmet B. 2017. Clinical use of pentraxin 3: a review. *Direct Res J Health Pharm* 5(2): 7–13.
- Alipour-Parsa S, Haybar H, Namazi MH, Safi M, Khaheshi I, Memaryan M, Eghbalnejad-Mofrad E. 2017. Evaluation of pentraxin-3 level and its related factors in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention. *ARYA Atheroscler* 13(2): 73–78.
- Bassi N, Zampieri S, Ghirardello A, Tonon M, Zen M, Cozzi F. 2009. Pentraxins, anti-pentraxin antibodies, and atherosclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 37: 36–43.
- Bian F, Yang XY, Xu G, Zheng T, Jin S. 2019. CRP-Induced NLRP3 Inflammasome activation increases LDL transcytosis across endothelial cells. *Front Pharmacol* 10: 40. doi: 10.3389/fphar.2019.00040.
- Bonnefont D. 2016. Resveratrol and cardiovascular diseases. *Nutrients* 8: 250. doi:10.3390/nu8050250.
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distanti A, De Caterina R. 2003. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 622–629.
- Carrizzo A, Lenzi P, Procaccini C, Damato A, Biagioni F, Ambrosio M, Amodio G, Remondelli P, Del Giudice C, Izzo R, Malovini A, Formisano L, Gigantino V, Madonna M, Puca A, Trimarco B, Matarese G, Fornai F,

- Vecchione C. 2015. Pentraxin 3 induces vascular endothelial dysfunction through a Pselectin/matrix metalloproteinase-1 pathway. *Circulation* 131(17): 1495–1505.
- Casula M, Montecucco F, Bonaventura A, Liberale L, Vecchié A, Dallegri F, Carbone F. 2017. Update on the role of pentraxin 3 in atherosclerosis and cardiovascular diseases. *Vasc Pharmacol* 99: 1–12. doi.org/10.1016/j.vph.2017.10.003.
- Daida H. 2011. Pentraxin 3 released from neutrophils increases plasma levels in patients with acute coronary syndrome. *ISRN Vascular Medicine*, Vol. 2011, 6 pages. doi:10.5402/2011/358426.
- Deban L, Russo RC, Sironi M, Moalli F, Scanziani M, Zambelli V. 2010. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat Immunol* 11: 328–334.
- Deng Y, Alex D, Huang H, Wang N, Yu N, Wang Y, Leung G, Lee S. 2011. Inhibition of TNF - mediated endothelial cell-monocyte cell adhesion and adhesion molecules expression by the resveratrol derivative, trans-3,5,41-trimethoxystilbene. *Phytother Res* 25: 451–457.
- Domínguez B, Pardo BG, Noia M, Millán A, Gómez-Tato A, Martínez P, Leiro J, Lamas J. 2013. Microarray analysis of the inflammatory and immune responses in head kidney turbot leucocytes treated with resveratrol. *Int Immunopharmacol* 15(3): 588–596.
- Erbas O, Pala HG, Pala EE, Oltulu F, Aktug H, Yavasoglu A, Taskiran D. 2014. Ovarian failure in diabetic rat model: nuclear factor-kappaB, oxidative stress, and pentraxin-3. *Taiwan J Obstet Gynecol* 53(4): 498–503.
- Ferrero ME, Bertelli AE, Fulgenzi A, Pellegatta F, Corsi MM, Bonfrate M, Ferrara F, De Caterina R, Giovannini L, Bertelli A. 1998. Activity *in vitro* of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *Am J Clin Nutr* 68: 1208–1214.
- Figueira L. 2010. El Resveratrol. Papel en enfermedades cardiovasculares y cáncer. *INFORMED* 12(2): 73–84.
- Figueira L, González J. 2008A. Efecto del extracto de *Pinus maritima*, vitamina C y E, sobre la concentración sérica de LDLox, PCR, Selectina-E, IL-6 y formación de ateromas en conejos con dieta hiperlipidémica. *INFORMED* 10(10): 593–607.
- Figueira L, González J. 2008B. Efecto de la vitamina C, sobre la actividad de la GPx y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica. *Act Cient Soc Venez Bioanal Espec* 11(1): 30–36.
- Figueira L, González J. 2018. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones séricas del factor de crecimiento endotelial vascular durante la aterosclerosis. *Clin Investig Arterioscler* 30(5): 209–216.
- Figueira L, González J, Arias M, Reigosa A. 2010. Efectos del pycnogenol y vitamina E, sobre la actividad de la glutatión peroxidasa y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica. *Salus* 14(3): 33–42.
- Figueira L, González J, Di Basílico L. 2017. La fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína como marcador sérico de aterosclerosis. *Rev Fac Farm UCV* 80(1 y 2): 45–59.
- Fornai F, Carrizzo A, Forte M, Ambrosio M, Damato A, Ferrucci M, Biagioni F, Busceti C, Puca A, Vecchione C. 2016. The inflammatory protein pentraxin 3 in cardiovascular disease. *Immunity & Ageing* 13: 25.
- González J, El Basset A, Pascuas R, Severino S, Perdomo M, Bayone J, Navarro M, Figueira L. 2018. Efecto del resveratrol sobre marcadores séricos de inflamación durante la aterosclerosis. Papel de la interleucina-17 e interleucina-33. *Rev Fac Farm UCV* 81 (1 y 2): 25–40.
- González J, Figueira L, Reigosa A. 2008. Selectina-E, VCAM-1, FNT, IL-6, PCR y fibrinógeno plasmático como marcadores de inflamación en la aterosclerosis, en conejos machos Nueva Zelanda, expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Salus* 12: 50–57.
- Imamura H, Yamaguchi T, Nagayama D, Saiki A, Shirai K, Tatsuno I. 2017. Resveratrol ameliorates arterial stiffness assessed by cardio-ankle vascular index in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int Heart J* 58(4): 577–583. doi: 10.1536/ihj.16-373.

- Inoue K, Sugiyama A, Reid P, Ito Y, Miyauchi K, Mukai S, Sagara M, Miyamoto K, Satoh H, Kohno I, Kurata T, Ota H, Mantovani A, Hamakubo T, Daida H, Kodama T. 2007. Establishment of a high sensitivity plasma assay for human pentraxin 3 as a marker for unstable angina pectoris. *Arter Thromb Vasc Biol* 27: 161–167.
- Jenny NS, Arnold AM, Kuller LH. 2009. Associations of pentraxin 3 with cardiovascular disease and all-cause death: the cardiovascular health study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 594–599.
- Kang L, Heng W, Yuan A, Baolin L, Fang H. 2010. Resveratrol modulates adipokine expression and improves insulin sensitivity in adipocytes: relative to inhibition of inflammatory responses. *Biochimie* 92: 789–796.
- Kimihiro I, Toshifumi K, Takahiro T, Yoshinori I. 2016. Relationship of inflammatory biomarkers with severity of peripheral arterial disease. *Internat J Vascular Medicine*. doi.org/10.1155/2016/6015701.
- Klouche M, Peri G, Knabbe C, Eckstein HH, Schmid FX, Schmitz G. 2004. Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 175: 221–228.
- Knoflach M. 2012. Pentraxin-3 as a marker of advanced atherosclerosis results from the Bruneck, ARMY and ARFY Studies. *PLoS One* 7(2). doi.org/10.1371/journal.pone.0031474
- Kotooka N, Inoue T, Aoki S, Anan M, Komoda H, Node K. 2008. Prognostic value of pentraxin 3 in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 130: 19–22.
- Labinsky N, Csiszar A, Veress G, Stef G, Pacher P, Oroszi G, Wu J, Ungvari Z. 2006. Vascular dysfunction in aging: potential effects of resveratrol, an anti-inflammatory phytoestrogen. *Curr Med Chem* 13(9): 989–996.
- Latini R, Maggioni A, Peri G, Gonzini L, Lucci D, Mocarelli P, Vago L, Pasqualini F, Signorini S, Soldateschi S, Tarli L, Schweiger C, Fresco C, Cecere R, Tognoni G, Mantovani A. 2004. Lipid Assessment Trial Italian Network (LATIN): Investigators. Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation* 110: 2349–2354.
- Li H, Förstermann U. 2009. Resveratrol: a multifunctional compound improving endothelial function. *Cardiovasc Drugs Ther* 23: 425–429.
- Liu H, Guan S, Fang W, Yuan F, Zhang M, Qu X. 2015. Associations between pentraxin 3 and severity of coronary artery disease. *BMJ Open* 5(4): e007123.
- Manfredi A, Rovere-Querini P, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A. 2008. Pentraxins, humoral innate immunity and tissue injury. *Curr Op Immunol* 20: 538–544.
- Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. 2008. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol* 28: 1–13.
- Matos RS, Baroncini LA, Précoma LB, Winter G, Lambach PH, Caron EY, Kaiber F, Précoma DB. 2012. Resveratrol causes antiatherogenic effects in an animal model of atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol* 98(2): 136–142.
- Matsuura Y, Hatakeyama K, Imamura T. 2012. Different distribution of pentraxin 3 and C-reactive protein in coronary atherosclerotic plaques. *J Atheroscler Thromb* 19(9): 837–845.
- NIH Guide for Grants and Contracts Vol . 7, No. 18, November 27, 1978 Page One Guide for the care and use of laboratory animals.
- Nerkiz P, Doganer YC, Aydogan U, Akbulut H, Parlak A, Aydogdu A. 2015. Serum pentraxin-3 level in patients who underwent coronary angiography and relationship with coronary atherosclerosis. *Med Princ Pract* 24(4): 369–375.
- Norata GD, Marchesi P, Pulakazhi Venu VK, Pasqualini F, Anselmo A, Moalli F. 2009. Deficiency of the long pentraxin PTX3 promotes vascular inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 120: 699–708.
- Norata GD, Garlanda C, Catapano AL. 2010. The long pentraxin PTX3: a modulator of the immunoinflammatory response in atherosclerosis and cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med* 20: 35–40.

- Ohbayashi H, Miyazawa C, Miyamoto K, Sagara M, Yamashita T, Onda R. 2009. Pitavastatin improves plasma pentraxin 3 and arterial stiffness in atherosclerotic patients with hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb* 16(4): 490–500.
- Pashkow F. 2011. Oxidative stress and inflammation in heart disease: do antioxidants have a role in treatment and/or prevention? *Int J Inflamm* 5: 1–10.
- Peri G, Inrona M, Corradi D. 2000. PTX3, a prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation* 102: 636–641.
- Rasmusen C, Moinard C, Martin C, Tricottet V, Cynober L, Couderc R. 2007. Larginine plus atorvastatin for prevention of atheroma formation in genetically hypercholesterolaemic rabbits. *Br J Nutr* 97: 1083–1089.
- Ridker P, Rifai N, Rose L, Buring J, Cook N. 2002. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *New Engl J Med* 347(20): 1557–1565.
- Rolph MS, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A. 2002. Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: e10–14.
- Sabry HH, Sabry JH, Daifalla AEH, Akl EM, Hamed AM, Torky A. 2018. Serum markers for asymptomatic atherosclerosis in egyptian psoriatic patients: study controlled by doppler estimation of carotid intima-media thickness. *Vasc Health Risk Manag* 14: 145–152.
- Savchenko A, Imamura M, Ohashi R, Jiang S, Kawasaki T. 2008. Expression of pentraxin 3 (PTX3) in human atherosclerotic lesions. *J Pathol* 215: 48–55.
- Shindo A, Tanemura H, Yata K, Hamada K, Shibata M. 2014. Inflammatory biomarkers in atherosclerosis: pentraxin 3 can become a novel marker of plaque vulnerability. *PLoS ONE* 9(6): e100045. doi:10.1371/journal.pone.0100045.
- Shiraki A, Kotooka N, Komoda H, Hirase T, Oyama J, Node K. 2016. Pentraxin-3 regulates the inflammatory activity of macrophages. *Biochem Biophys Reports* 5: 290–295.
- Soeki T. 2011. Elevated concentrations of pentraxin 3 are associated with coronary plaque vulnerability. *J Cardiol* 58(2): 151–157.
- Stary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfield M, Schwartz C, Wagner W, Wesler R. 1995. 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. American Heart Association. *Circulation* 15: 1512–1531.
- Tanko Y, Jimoh A, Ahmed A, Mohammed A, Ayo JO. 2016. Resveratrol protects rabbits against cholesterol diet-induced hyperlipidaemia. *Niger J Physiol Sci* 31(1): 71–75.
- Yang HS, Woo JE, Lee SJ, Park SH, Woo JM. 2014. Elevated plasma pentraxin 3 levels are associated with development and progression of diabetic retinopathy in korean patients with type 2 diabetes mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55(9): 5989–5997.
- Zghonda N, Yoshida S, Araki M, Kusunoki M, Mliki A, Ghorbel A, Miyazaki H. 2011. Greater effectiveness of e-viniferin in red wine than its monomer resveratrol for inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Biosci Biotechnol Biochem* 75(7): 1259–1267.
- Zhao Y, Feng G, Wang Y, Yue Y, Zhao W. 2014. A key mediator, PTX3, of IKK/IkappaB/NF-kappaB exacerbates human umbilical vein endothelial cell injury and dysfunction. *Int. J Clin Exp Pathol* 7(11): 7699–7707.
- Zwaka T, Hombach V, Torzewski J. 2001. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: Implications for atherosclerosis. *Circulation* 103: 1194–1197.

Recibido: 25-07-2019

Aceptado: 09-08-2019