MEMÒRIA DE L'ESTUDI

"ANTIOXIDANTS DEL VI I REDUCCIÓ DEL RISC CORONARI"

Autora: Pilar Caldú Julve
Beques L'Hospitalet 1995-96
Novembre 1996

INDEX

Pàg.

Introducció 1

Material i Mètodes 2

Estudi "in vitro" 2

Estudi "in vivo" 4

Resultats 7

Estudi "in vitro" 7

Estudi "in vivo" 13

Discussió i Conclusions 16

Bibliografia 19

INTRODUCCIÓ

L'arteriosclerosi és una malaltia d'orígen multifactorial (1), és a dir, hi ha molts factors que influeixen en la seva aparició i posterior desenvolupament. Un dels principals mecanismes implicats en el desenvolupament de l'arteriosclerosi és la modificació oxidativa de les lipoproteïnes (2), concretament de la lipoproteïna de baixa densitat (LDL). *In vivo,* l'oxidació de la LDL (LDLox) pot ser induïda per cél.lules que secreten al medi radicals lliures d'oxígen o que transfereixen lipoperòxids intracel.lulars directament cap a la LDL. Les lipoproteïnes modificades resultants d'aquest procés d'oxidació, poden ser reconegudes per uns receptors anomenats "scavenger" que es troben a la superfície de macròfags derivats de monòcits circulants. Aquestes cèl.lules, després de reconèixer les LDLox les internalitzen i es van carregant de colesterol fins a transformar-se en les anomenades "cèl.lules espumoses" (3). La infiltració i deposició d'aquest tipus cel.lular a la paret arterial es consideren els passos inicials en la formació de la placa d'ateroma i de l'aparició de la subsequent malaltia cardiovascular.

El desenvolupament d'aquest tipus de malaltia ha estat relacionat amb un consum elevat de colesterol i grasa saturada (4). No obstant, a França la incidència de coronariopatia es baixa malgrat ser un país amb una dieta rica en greixos. Aquest fenòmen es coneix com a "Paradoxa Francesa" i ha estat atribuït, en part, al consum regular de vi (5). De la mateixa manera, la incidència de malalties cardiovasculars és baixa en els països mediterranis en general (6,7), fins ara aquest fenòmen havia estat associat a un elevat consum de grasa monoinsaturada en la dieta de tipus mediterrani (8) però actualment també pot atribuir-se al consum regular de vi que és una part important de la dieta Mediterrània.

Actualment existeix un debat sobre si la relació inversa observada entre el consum de vi i l'arteriosclerosi és un fenòmen causal o per altra banda és només fruit de la casualitat (9-11) . Existeix controvèrsia sobre quins son els mecanismes responsables del paper protector que se li atribueix al vi (12-14). Una de les hipòtesis més acceptades per diversos autors és la teoria antioxidant (15-20). Existeix també una certa controvèrsia sobre si és l'alcohol per se o són els compostos no alcohólics del vi (majoritàriament polifenols) els que exerceixen aquesta activitat antioxidant.

Alguns estudis demostren la capacitat dels compostos polifenòlics del vi d'inhibir l'oxidació de les LDL "in vitro" (15.16,21). Els estudis "in vivo" son més controvertits, alguns indiquen que el consum moderat de vi inhibeix l'oxidació de les LDL dels individus que el consumeixen (17,18) i altres afirmen que el consum del vi no té cap efecte sobre la oxidació (20). La majoria d'estudis centren la seva atenció en el vi negre i els pocs que hi ha fets amb vi blanc no atribueixen a aquest tipus de vi una capacitat antioxidant (17,18,20). .

L'objectiu d'aquest estudi és comprovar "in vitro" i "in vivo" la capacitat antioxidant de vins blancs i negres, sotmesos a diferent procés d'elaboració, sobre l'oxidació de les LDL.

MATERIAL I MÈTODES

1. Estudi "in vitro"

Preparació del vi

Els vins utilitzats a l'estudi in vitro van ser dos vins blancs; un convencional i l'altre sotmés a una curta maceració del most amb la pell del raïm i un vi negre convencional. Els vins en qüestió van ser elaborats a l'Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI).

Vi blanc

Els vins blancs es van obtenir a partir de la varietat blanca de raïm *macabeu (viura)*, una de les més utilitzades en l'elaboració de vi a Catalunya, Aragó i La Rioja. Una partida de 1000 Kg de raïm va ser dividida en dues parts. Una d'elles va ser tractada segons la metodologia típica que es segueix en l'elaboració del vi blanc: es va obtenir el most en prensa horitzontal i a pressió moderada, posteriorment es va procedir a la clarificació, fermentació amb llevats a temperatura controlada i finalment a una nova clarificació amb gelatina i a la filtració amb terres diatomees. L'altra part de raïm es va procesar d'una manera un xic diferent a l'anterior: es va deixar en maceració el most amb la pell del raïm durant un període de 6-8 h a temperatura baixa i posteriorment es va seguir el procés d'elaboració del vi blanc convencional. Aquest procés és una variació del que s'utilitza habitualment en l'elaboració del vi negre.

A partir d'aquest moment ens referirem al vi blanc convencional com B1 i al vi blanc macerat com B2.

Vi negre

Va ser elaborat utilitzant la varietat *tempranillo*, una de les varietats de raïm negre de major qualitat i de les més utilitzades a les denominacions d'orígen espanyoles. El raïm es va xafar i un cop eliminada la llavor, es va deixar el most en maceració amb la pell durant 4 dies. Després del prensat, la fermentació va continuar 4 dies més, al final dels quals es va procedir a un trasvassament. La clarificació es va realitzar amb albúmina d'ou i finalment la filtració amb terres diatomees.

A partir d'aquest moment identificarem el vi negre com N.

Preparació i quantificació dels compostos fenòlics del vi.

Les mostres de vi es van diluir 1/5 i es van filtrar en un filtre d'un tamany de porus de 0.45 µm. Els extractes fenòlics es van obtenir per cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) utilitzant una columna semipreparativa C18 (10 cm de longitud i 7.5 mm diàmetre) que es va omplir amb Silica gel C18 amb un tamany de partícula de 0.040-0.063 mm. Com a fase mòbil es va utilitzar consecutivament àcid fòrmic (1.91 µmol/L), metanol, aigua desionitzada i metanol-àcid fòrmic (1:1). L'eluient es va monitoritzar en un detector de llum ultraviolada amb una longitud d'ona de

280 nm. Les concentracions de compostos fenòlics en cadascun dels vins es van determinar mitjançant l'índex de Folin-Cicolteau utilitzant àcid fosfomolíbdic-fosfotúngstic segons la tècnica descrita per Singleton (22). Aquesta concentració es va expressar com equivalents d'àcid gàlic (EAG).

Obtenció i oxidació de la LDL

A un pool de sèrum humà d'individus sans es va afegir 10 µl/ml d'una solució conservant que contenia 0.1 mmol/L cloramfenicol, 0.1 mmol/L gentamicina, 100 mmol/L EDTA i 0.2 mol/L NaCl. La LDL, de densitat 1.019-1.063 g/ml, es va obtenir per ultracentrifugació seqüencial preparativa utilitzant KBr segons la metodologia descrita per Havel i cols. (23). La integritat i la puresa de la lipoproteïna es va verificar per electroforesi en gel d'agarosa (24). La LDL es va dialitzar tota la nit a 4°C amb tampó fosfat i es va oxidar en presència o absència dels extractes fenòlics dels diferents vins. En un experiment l'oxidació es va realitzar afegint α-tocoferol (un antioxidant habitual) o etanol per tal de poder comparar els efectes antioxidants. La modificació oxidativa es va dur a terme a 37° mitjançant l'adició de $CuSO_4$ preparat al moment (concentració final 40 µmol/L per cada 1 mg/ml de massa total de lipoproteïna). L'oxidació es va aturar a diferents temps amb l'adició de EDTA a una concentració final cinc vegades superior a la de coure.

Determinació dels productes d'oxidació

El grau d'oxidació es va determinar mitjançant el seguiment de tres compostos produïts típicament en el procés d'oxidació lipoprotèica: compostos dièmics (CD), substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric (TBARS) i fluorescència.

La producció de CD es va mesurar essencialment com va descriure Esterbauer i cols. (25). Es va monitoritzar l'absorbància continuada a 234 nm i la quantitat de dienis presents a la lipoproteïna es va calcular a partir del coeficient molar d'absorció dels compostos dièmics (E_{234nm} = 27.000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$). Els resultats es van expressar com µmol CD/g lipoproteïna. A partir de la cinètica de producció de CD es van calcular diversos index d'oxidació (26). Compostos dièmics inicials presents a la lipoproteïna (CDi); temps previ a l'inici de l'oxidació (Fase lag) que indica la resistència de la LDL a l'oxidació; quantitat màxima de CD formats (CD_{max}); producció de CD que és la diferència entre els CD_{max} i els CD_i ; velocitat màxima d'oxidació que es calcula a partir del pendent de la corva durant la fase de propagació (V_{max}); i temps màxim (T_{max}) és el temps necessari per produir la màxima quantitat de CD.

Els TBARS es van determinar segons el mètode descrit per Yagi (27). Es va utilitzar com a patró el malondialdehid (MDA) que es forma a partir d'un compost anomenat 1,1,3,3-tetrametoxipropà. Els resultats es van expressar com µmol MDA/g lipoproteïna.

La fluorescència total es va mesurar a les lipoproteïnes per fluorimetria (excitació 360 nm i emissió 430 nm) (28). Amb l'objectiu de distingir entre la fluorescència lipo i hidrosoluble, els lípids de 1 ml de LDL es van extreure amb 1 ml d'etanol i 2 ml d'heptà. La fluorescència associada a la fase heptànica es va mesurar com en el cas de la fluorescència total. La fluorescència hidrosoluble es va calcular per diferència entre la total i la liposoluble. Els valors obtinguts es van expressar com unitats de fluorescència relativa (URF)/g lipoproteïna.

Vitamina E

La concentració de vitamina E (vit E) es va mesurar amb el mètode descrit per Tsen (29). Breument direm que es va fer una extracció dels tocoferols de les LDL amb heptà i es va quantificar per adició d'una solució reactiva que contenia batofenantrolina (4,7-difenil-1,10-fenantrolina) i $FeCl_3$. El complexe colorejat que resulta de la conversió de Fe^{3+} a Fe^{2+} es va mesurar espectrofotomètricament a 534 nm utilitzant com a standar α-tocoferol. Els resultats es van expressar com mg d'equivalents d'α-tocoferol/g lipoproteïna.

Anàlisi estadístic

Tots els valors es representen com mitjana ± SEM. La normalitat de les distribucions es va confirmar previament a les comparacions estadístiques. La comparació entre dos grups es va fer mitjançant l'aplicació del test de la *t de Student* i entre tres grups mitjançant un Anova. El nivell de significació es va fixar en $p < 0.05$.

2. Estudi "in vivo"

Subjectes

Es van reclutar 18 individus varons amb un rang d'edat entre els 25 i 50 anys. Sis d'aquests individus només eren consumidors de begudes alcohòliques d'una manera esporàdica i 12 eren bebedors habituals que no excedien 30 g/dia d'alcohol. Tres dels subjectes eren fumadors habituals. Cap dels participants estaba prenent fàrmacs que poguessin interferir en el metabolisme lipídic ni en els mecanismes oxidatius. Durant la setmana anterior a l'inici de l'estudi, els voluntaris no van consumir cap beguda alcohòlica considerant-se aquest temps com a període basal. Al finalitzar aquest període, els voluntaris es van randomitzar en dos grups i cada grup va consumir 250 ml/dia de vi negre o blanc durant dues setmanes. La ingesta de vi es va repartir en dos tomes de 125 ml cadascuna durant el dinar i el sopar. L' única beguda alcohólica permesa mentre va durar l'estudi va ser el vi en concret i es va recomanar als participants que no modifiquessin els seus hàbits higiènico-dietètics durant el mateix. En acabar el periode basal i el periode d'ingesta es va determinar a tots els subjectes un perfil lipídic complert i un anàlisi de la resistència de la LDL a l'oxidació.

Vins

Els vins utilitzats a l'assaig "in vivo" van ser elaborats com ja s'ha descrit en la metodologia corresponent a l'estudi "in vitro" però es va eliminar el vi blanc macerat, així els subjectes van ser consumidors d'un vi negre convencional i d'un vi blanc convencional.

Mostra

Es van recollir 20 ml de sang en tubs siliconats sense anticoagulant i es van centrifugar a 3000 r.p.m. durant 15 minuts per a l'obtenció del sèrum. El sèrum es va suplementar amb 10 µl/ml

d'una solució conservant que contenia 0.1 mmol/L de cloramfenicol, 0.1 mmol/L gentamicina, 100 mmol/L EDTA i 0.2 mol/L NaCl i es va procedir immediatament a l'obtenció de les lipoproteïnes.

Perfil lipidic

La fracció de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) (d = 1.006 g/ml) i la fracció de LDL (d = 1.019 - 1.063 g/ml) es van obtenir per ultracentrufugació preparativa amb solucions de KBr (23). La puresa de les lipoproteïnes es va comprovar per electroforesi en gel d'agarosa (24) i SDS-PAGE. La fracció HDL i la seva subfracció HDL_3 es van obtenir per precipitació selectiva amb polietilenglicol amb un reactiu comercialitzat per IMMUNO AG. El colesterol, triglicèrids i fosfolípids del sèrum i el colesterol de les diferents fraccions lipoprotèiques es van determinar per mètodes colorimètrics utilitzant kits comercialitzats per Boehringer Mannheim (Alemania). Les apolipoproteïnes apo A i apo B també es van analitzar per mètodes colorimètrics emprant kits comercials(Boehringer Mannheim). La lipoproteïna (a) (Lp(a)) es va quantificar en sèrum mitjançant un anàlisi automatitzat d' immunoprecipitines i comercialitzat per Incstar (Minnesota, USA). Totes aquestes magnituds es van determinar en un autoanalitzador Hitachi 705.

Oxidació de la LDL

La LDL separada del sèrum de cada subjecte al finalitzar el període basal i el d'ingesta, es va oxidar segons la metodologia ja descrita en l'apartat corresponent de l'estudi "in vitro" (25). El grau d'oxidació aconseguit es va caracteritzar també amb els índex d'oxidació: CD_{max} - CD_i, V_{max}, T_{max}, Fase lag.

Altres magnituds

Proteïnes

Les proteïnes de la fracció LDL es van determinar mitjançant el mètode de Bradford (30) utilitzant albúmina sèrica bovina com standard.

Vitamina E

Les concentracions de vitamina E (vit E) del sèrum i de la fracció LDL es va determinar com ja s'ha descrit en l'apartat referent a l'estudi "in vitro" (29). Els resultats van ser expresats com *mg d' equivalents d'α-tocoferol/L de sèrum* o com *mg d'equivalents d'α-tocoferol/mg de lípid de la LDL.*

CETP

L'enzim transferidor d'esters de colesterol (CETP) és un enzim del metabolisme del

colesterol sobre el que s'hipotetitza que pot estar relacionat amb l'augment del colesterol de les HDL provocat per l'alcohol. L'activitat CETP en sèrum es va determinar mitjançant un kit comercial (Wak-hemie, Bad Homburg, Alemania) que es basa en una emissió de fluorescència detectable a 465 nm excitació i 535 nm emissió quan es produeix la reacció catalitzada per aquest enzim.

Anàlisi estadístic

Per comparar el període basal amb el d'ingesta dintre de cadascun dels dos grups d'individus es va aplicar el test de la *t de Student* per dades aparellades. Per comparar els resultats del grup consumidor de vi negre amb el consumidor de vi blanc es va aplicar el test de la *t de Student* per dades independents. El nivell de significació es va fixar en $p < 0.05$.

RESULTATS

Estudi "in vitro"

La concentració de compostos fenòlics del vi negre va ser substancialment més alta que la dels vins blancs: 11411 µmol EAG/L per al vi negre convencional respecte a 3645 µmol EAG/L per al vi blanc macerat amb la pell del raïm i 1717 µmol EGA/L per al vi blanc convencional.

La LDL es va oxidar en presència de volums idèntics dels extractes fenòlics de cadascun dels vins i a partir de la cinètica de producció de CD es van calcular els índex d'oxidació que apareixen a la *taula 1*. Com es pot observar, la fase de latència era més llarga quan la LDL es va oxidar en presència dels diferents extractes dels vins que quan es va oxidar sense afegir-hi els extractes. L'increment en la fase de latència estava en relació directa a la concentració polifenòlica dels extractes, és a dir que va ser en ordre decreixent N>B2>B1>LDL sense extracte. Respecte a altres índexs calculats, la producció de dienis i la velocitat màxima van ser similars en tots els cassos excepte per al vi negre que va mostrar una velocitat de producció de CD inferior.

Taula 1

	LDLc (n=2)	**B1 (n=2)**	**B2 (n=2)**	**N (n=2)**
Fase lag (min)	101	152	304	714
CD_i (µmol/g LDL)	45	45	45	45
CD_{max} (µmol/g LDL)	176	181	177	181
CD_{max} - CD_i (µmol/g LDL)	132	136	132	136
T_{max} (min)	155	208	360	788
V_{max} (µmol/min/g LDL)	3.3	3.3	3.3	2.5

La LDL es va oxidar en absència (LDLc) i presència dels extractes diluits 1/1500 que van resultar a una concentració final de 1.14, 2.43, i 7.60 µmol EAG/L per B1, B2 i N respectivament. Els valors representats son la mitjana de dos experiments independents.

Per excloure la possibilitat de que l'efecte antioxidant observat fos degut a l'activitat quelant de metalls dels polifenols del vi, es va repetir l'assaig utilitzant una concentració de coure 5 vegades superior a la habitual i es va observar que les fases de latència van ser similars en tots els cassos (93 vs 91, 137 vs 143, 320 vs 281 i 774 vs 670 min per la LDL oxidada sense extracte, amb B1, amb B2 i amb N respectivament).

En un altre assaig la LDL es va oxidar en presencia de la mateixa concentració de tots els extractes (8μmol EAG/L) i es van obtenir els índexs d'oxidació que apareixen a la *taula 2*. Encara que tots els extractes es van afegir a la mateixa concentració fenòlica, l'increment en la fase de latència va ser diferent entre els diferents extractes, essent màxima per B2 seguit de N i de B1. La velocitat i la producció màxima de CD en tots els cassos va ser inversament proporcional a l'increment en la fase de latencia.

Taula 2

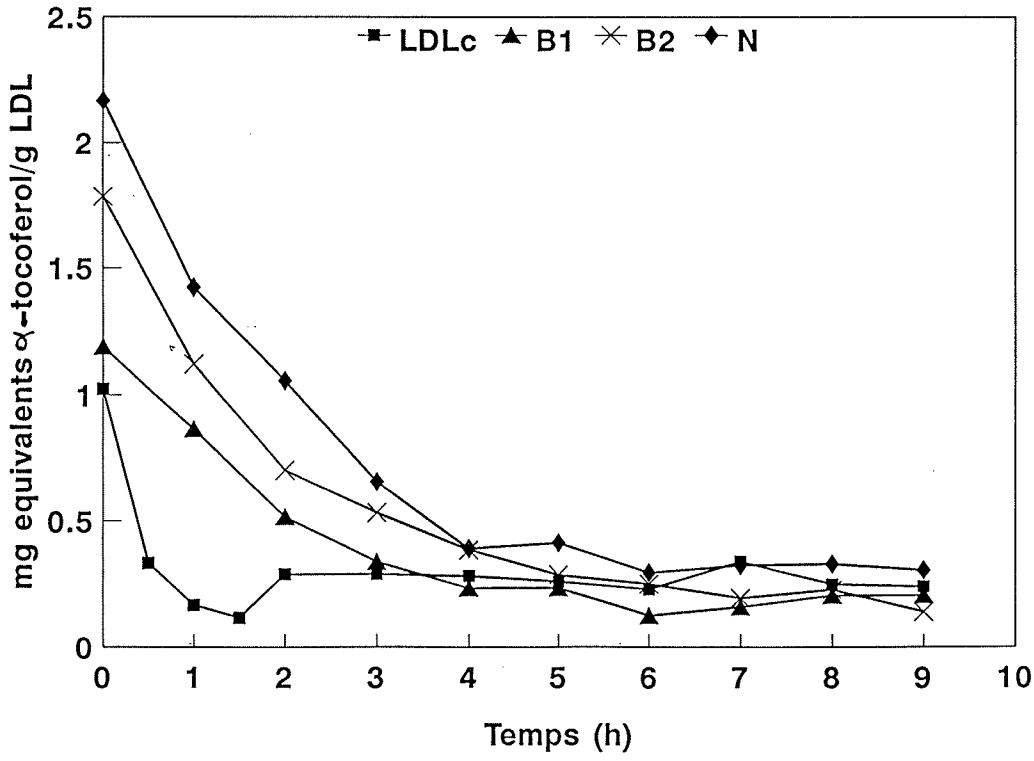
	LDLc (n=2)	**B1** (n=2)	**B2** (n=2)	**N** (n=2)
Fase lag (min)	78	410	516	442
CD_i (μmol/g LDL)	53	53	53	53
CD_{max} (μmol/g LDL)	169	152	133	140
CD_{max} - CD_i (μmol/g LDL)	116	99	80	87
t_{max} (min)	128	470	570	510
V_{max} (μmol /min/g LDL)	3.4	2.6	2.2	2.4

La LDL es va oxidar en absencia (LDLc) i presencia dels extractes adicionats tots a la mateixa concentració, 8 μmol EAG/L. Els valors representats son la mitjana de dos experiments independents.

El contingut de vitamina E de la LDL en el transcurs del procés oxidatiu es representa a la figura 1. La concentració d'equivalents d'α-tocoferol a l'inici de l'oxidació (mesura de la capacitat antioxidant) va ser més elevada en presència dels extractes que en absencia dels mateixos. La pèrdua de vitamina E característica en l'oxidació de la LDL, es va retrassar degut a la presencia dels extractes. Després de 4 hores d'oxidació, el potencial antioxidant s'havia exhaurit completament en tots els cassos.

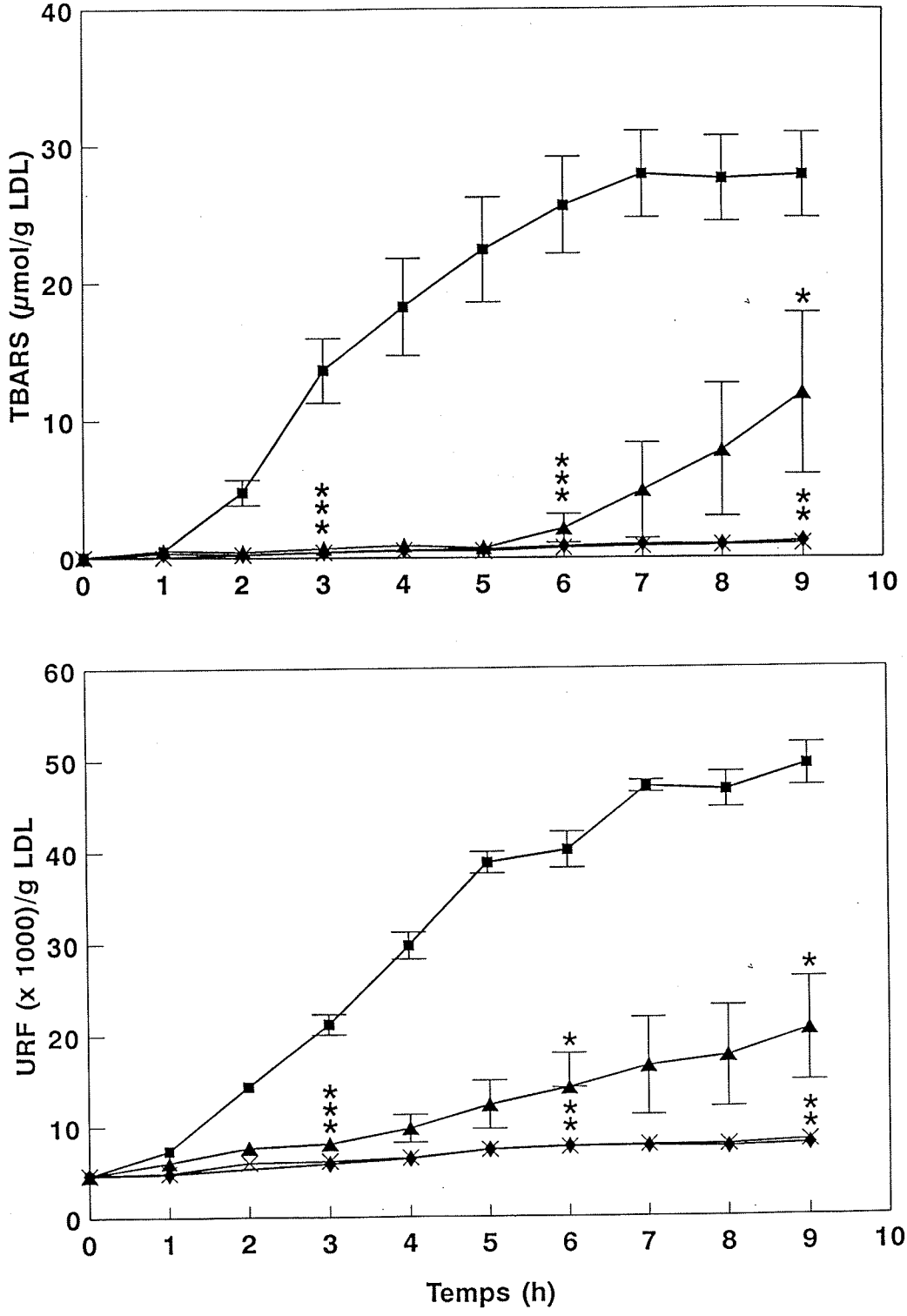
Les figures 2 i 3 mostren l'efecte dels extractes en la producció de TBARS i fluorescència. En relació a la LDL control, la formació de TBARS va estar dràsticament inhibida per l'adició de B1 i completament inhibida per B2 i N inclús a les 9 hores d'incubació (figura 1A). No obstant, quan l'oxidació es va allargar fins a 24 hores, es va perdre aquest efecte inhibidor (no es va arribar a la significació estadística, figura 2A). La producció de fluorescència també es va inhibir significativament fins i tot a les 9 hores d'incubació en presència de cadascun dels extractes (figura 1B). De forma diferent al que es va observar en els TBARS, a les 24 hores d'oxidació tots els extractes continuaven exercint un efecte inhibidor en la producció de fluorescència total (figura 2B). L'efecte inhibidor de N i B2 va ser significativament més gran que el produït per B1. A les 24 hores d'oxidació, la fluorescència liposoluble en presència dels extractes no va experimentar cap canvi respecte a la LDL control. No obstant, la fluorescència hidrosoluble produïda va ser significativament més petita en presència dels mateixos. N i B2 van produir una major concentració de compostos fluorescents hidrosolubles que B1 sense que aquesta diferència fos significativa.

Figura 1



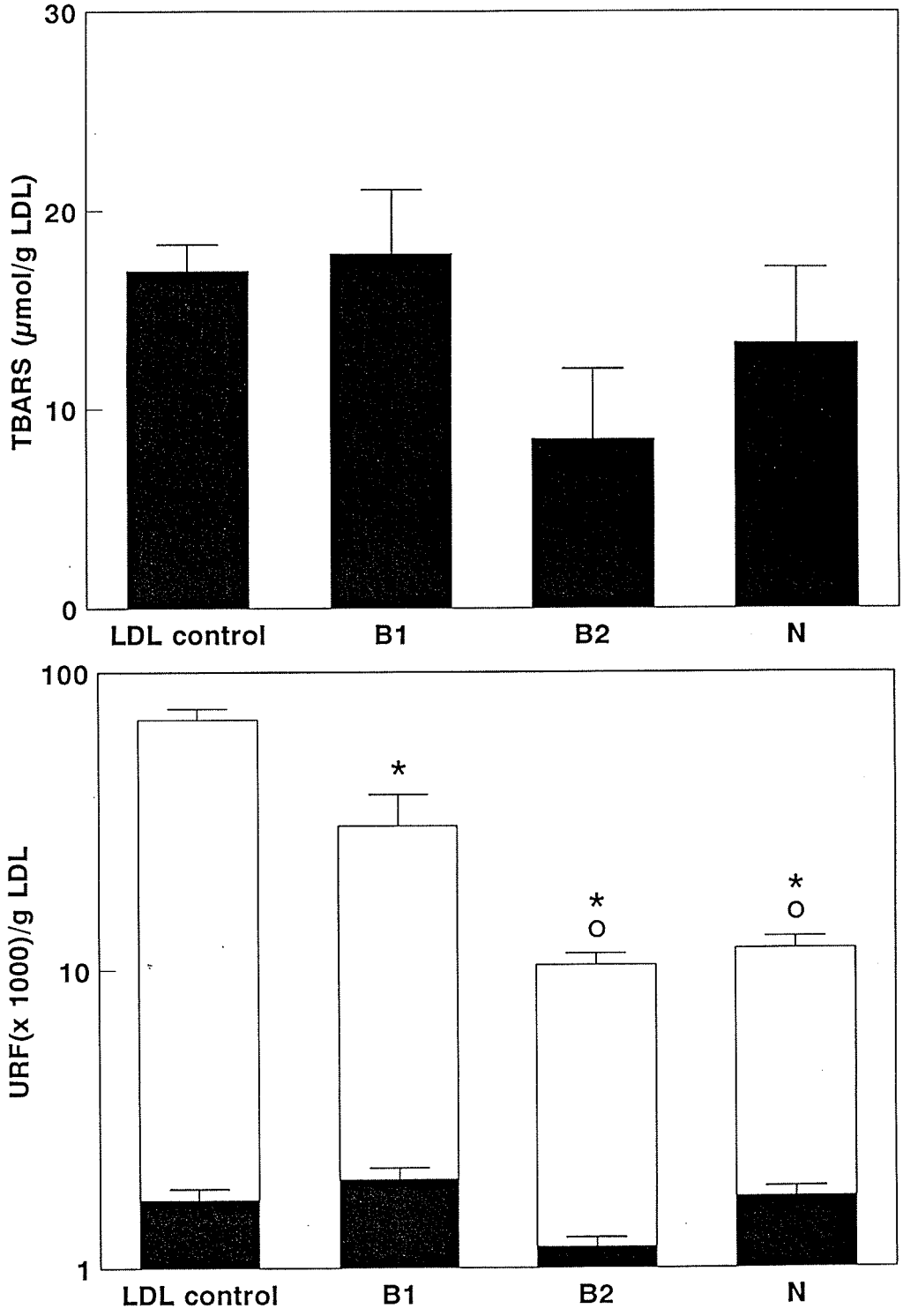
Concentració de vitamina E durant l'oxidació de la LDL. La concentració dels extractes era de 8 µmol EAG/L. Cada punt es la mitjana de 4 experiments independents.

Figura 2



Formació de TBARS (A) i fluorescència (B) durant 9 hores d'oxidació. Tots els extractes es van afegir a la mateixa concentració (8µmol EAG/L). L'anàlisi estadístic es va fer a les 3, 6 i 9 h d'oxidació i es va comparar l'efecte produït per cadascun dels extractes amb la LDL control (* p = 0.0001). Cada punt és la mitjana de quatre experiments independents. Els quadres representen la LDL control, els triangles la LDL en presència dels extractes de B1, les creus LDL amb els extractes de B2 i els rombs amb els extractes de N.

Figura 3



Producció de TBARS (A) i fluorescència (B) a les 24 hores d'oxidació. La fluorescencia ha estat separada en fluorescència hidrosoluble (negre) i liposoluble (blanc). Es va comparar estadísticament l'efecte dels extractes en la producció de TBARS com de fluorescència. En aquest cas només hi havia diferències significatives en la fluorescència. Concretament s'han representat les diferencies en la fluorescencia total en presencia dels extractes respecte a la LDL control (* $p<0.0001$) , també s'han comparat els extractes entre si (o $p< 0.0001$ quan es compara B2 o N amb B1).

Per poder avaluar la capacitat antioxidant dels extractes, aquesta es va comparar amb la produida per l'alfa-tocoferol, un antioxidant ben concegut i d'ús habitual. Per aconseguir increments en la fase de latencia comparables als obtinguts oxidant en presència de 8 μmol EAG/L dels extractes del vins, van fer falta concentracions d'alfa-tocoferol de 5 a 8 vegades superiors (40-60 μmol/L). També es va analitzar l'efecte de l'alcohol sobre l'oxidació oxidant LDL en presencia d'etanol pur. L'etanol al 1% no va produir cap efecte sobre la fase de latencia. No obstant, al 10 % va demostrar capacitat antioxidant (taula 3).

Taula 3

	Fase lag (min)
LDL control	78
B1 (8μmol EAG/L)	410
B2 (8 μmol EAG/L)	516
N (8 μmol EAG/L)	442
α-tocoferol	
(40 μmol/L)	398
(50 μmol/L)	500
(60 μmol/L)	583
Etanol	
1%	82
10%	99

Les dades que apareixen representades a la taula són la mitjana de dos experiments independents.

Estudi "in vivo"

En la taula que es presenta a continuació (taula 4) es resumeixen els resultats obtinguts en quant a les diferents magnituds analitzades en el perfil lipídic.

Taula 4

	Vi negre (n=9)		**Vi blanc** (n=9)	
	Basal	**2 setmanes**	**Basal**	**2 setmanes**
Colesterol (mg/dl)	183.33(26.69)	185.11(33.74)	200.56(49.23)	198.00(42.12)
Triglicèrids (mg/dl)	118.22(76.38)	129.89(108.72)	120.00(67.11)	141.89(76.41)
Colest. VLDL (mg/dl)	17.11(12.25)	16.89(10.89)	21.00(14.26)	17.78(11.61)
Colest. LDL (mg/dl)	98.67(26.00)	99.67(31.74)	116.89(42.38)	114.44(32.92)
Colest. HDL (mg/dl)	46.44(6.80)	46.89(9.58)	47.44(11.39)	46.11(10.04)
Colest. HDL_2 (mg/dl)	14.11(11.28)	14.22(7.76)	10.00(6.26)	9.00(3.20)
Colest. HDL_3 (mg/dl)	32.44(12.15)	32.67(10.39)	37.44(10.21)	37.22(7.38)
Apo A (mg/dl)	140.56(13.95)	143.44(18.22)	139.44(20.88)	141.11(23.49)
Apo B (mg/dl)	79.11(22.77)	82.11(26.16)	90.78(30.34)	93.44(25.62)
Lp (a) (mg/dl)	25.44(6.59)	26.00(20.42)	17.75(18.42)	16.50(19.21)
Act. CETP (pmol/ml/3h)	90.10(22.24)	91.56(9.98)	88.56(10.72)	87.52(11.80)

Els valors són la mijana (desviació standard).

Com es pot observar en la taula, la ingesta diària de 250 ml de vi negre o blanc no va modificar significativament cap de les magnituds del perfil lipídic; el colesterol total, els triglicèrids totals i el colesterol de les diferents fraccions de lipoproteïnes no van experimentar cap variació significativa després d'haver consumit ambdos tipus de vi. Tampoc van experimentar variació els valors de les apoproteïnes apo A i apo B del sèrum. Un altre factor analitzat i que tampoc va variar significativament va ser l'activitat de l'enzim CETP que com ja s'ha dit anteriorment participa en el transport revers de colesterol.

En quant a la composició de la LDL, la taula 5 mostra els resultats de l'anàlisi del contingut percentual de colesterol, triglicèrids, fosfolípids i proteïnes de la LDL després de la ingesta dels dos tipus de vi. El vi blanc no va produir cap modificació en el contingut percentual de les diferents fraccions de la LDL en canvi, el vi negre va produir una disminució significativa del tant per cent de fosfolípids.

Taula 5

	Vi negre (n=9)		**Vi blanc** (n=9)	
	Basal	**2 setmanes**	**Basal**	**2 setmanes**
% Colesterol	43.58(3.35)	44.64(3.62)	44.21(2.07)	44.75(2.68)
% Triglicèrids	8.81(2.65)	10.40(5.16)	9.01(2.03)	9.23(1.58)
% Fosfolípids	28.44(1.07)	26.69(1.42) *	27.99(1.88)	26.77(0.76)
% Proteïnes	19.39(1.65)	18.27(1.49)	18.78(1.41)	19.24(1.80)

Les dades s'expressen com mitjana (desviació standard). * p=0.01 respecte a les dades basals.

En quant a l'oxidació de la LDL, els diferents índex d'oxidació calculats es resumeixen a la taula que es presenta a continuació (taula 6). En aquesta taula es pot observar que el vi negre va produir un increment significatiu en la fase de latencia (temps previ a l'inicia de l'oxidació) de la LDL, així com una disminució de la velocitat de producció de CD. En el cas del vi blanc també es va incrementar la fase de latencia de la LDL tot i que no es va arribar a la significació estadística (p = 0.059). El temps necessari per obtenir la màxima producció de CD també va augmentar significativament respecte al valor basal després del consum dels dos tipus de vi. Respecte a la vitamina E, el consum de vi negre va disminuir significativament el contingut de vitamina E del sèrum però en canvi va incrementar també significativament el contingut de vitamina E de la LDL. El vi blanc no va provocar una modificació significativa del contingut de vitamina E del sèrum ni de la LDL.

Taula 6

	Vi negre (n=8)		**Vi blanc** (n=6)	
	Basal	**2 setmanes**	**Basal**	**2 setmanes**
Fase lag (min)	49.38(10.85)	75.12(10.43) **p<0.0001**	49.67(3.98)	63.33(13.22)
V_{max}(µmol/g lípid LDL/min)	6.38(0.77)	5.57(0.67) **p<0.02**	6.10(0.82)	6.28(1.96)
T_{max} (min)	88.12(13.61)	118.12(16.68) **p<0.03**	87.50(5.24)	115.00(14.83) **p<0.02**
Cd_{max}-Cd_i(µmol /g lípid LDL)	200.63(34.40)	196.21(28.98)	191.11(24.49)	205.73(50.08)
Vit E (mg/L sèrum)	9.83(1.67)	8.86(1.34) **p<0.03**	10.63(2.39)	9.83(1.44)
Vit E LDL (mg /g lípid LDL)	0.74(0.40)	1.69(0.58) **p<0.02**	0.97(0.75)	1.60(1.16)

Les dades s'expresen com mitjana (desviació standard). Les **p** representen diferencies significatives respecte als valors basals.

CONCLUSIONS

Actualment el vi i els àcids grassos monosaturats, principalment l'àcid oleic de l'oli d'oliva, presents a la dieta mediterrània, estan sent subjectes d'investigació. Semba ser que el consum moderat d'alcohol confereix una protecció en el desenvolupament de la malaltia arterioscleròtica. No obstant, el mecanisme pel qual s'exerceix aquesta capacitat antiaterogènica encara no està clar. Fins al moment, s'hipotetitza que pot ser per l'augment de la fracció de HDL induïda per l'alcohol. S'ha proposat que la HDL actua com acceptor de l'excés de colesterol transportant-lo desde els teixits perifèrics al fetge, anomenant-se aquest procés *transport revers del colesterol.*

Un altre possible mecanisme és la influència de l'alcohol en la homeostasi (5). L'alcohol redueix l'agregació plaquetaria i també influeix en els sistemes de la coagulació reduïnt les concentracions de fibrinògen en circulació (14).

Darrerament, l'arteriosclerosi s'ha relacionat amb les modificacions de les lipoproteïnes, particularment de la LDL, produides per l'estrès oxidatiu. L'alcohol per sí mateix podria actuar com a factor protector reduïnt la susceptibilitat de les lipoproteïnes a la oxidació, com ha estat demostrat "in vitro" (31) o facilitant l'absorció d'altres antioxidants pel lumen intestinal (32). No obstant, les begudes amb un elevat contingut alcoholic, com el Vodka, no proporcionen aquesta protecció (33). Pel que es refereix al vi, el tipus de vi que es consumeix sembla jugar un paper crític. Per exemple, el vi negre inhibeix la oxidació de les LDL "in vitro" (15,16) però el seu paper "in vivo" és controvertit (17,18,20). Els estudis sobre el consum de vi blanc no li atribueixen propietats antioxidants, sinó que inclús li confereixen propietats pro-oxidants (17,18).

Per altra banda, l'efecte antiaterogènic del vi negre podria ser degut, en part, a les propietats antioxidants dels compostos fenòlics que conté (15,16, 34). La pell del raïm és rica en polifenols i una incubació prolongada del vi amb aquesta pell durant el procés d'elaboració, proporciona un elevat contingut de polifenols al vi negre (35,36). En l'estudi "in vitro" es van investigar tres tipus de vi: un vi negre convencional, un vi blanc convencional i un vi blanc que havia estat en contacte amb la pell del raïm durant el procés de producció.

Com era esperable, el vi negre presentava unes concentracions més elevades de compostos polifenòlics, seguit del vi blanc que s'havia elaborat en contacte amb la pell del raïm i finalment del vi blanc convencional. Els resultats de l'estudi "in vitro" demostren que els polifenols del vi blanc, tot i que en aquest vi estan en menor concentració, també li confereixen una capacitat antioxidant, com es demostra per l'increment en la fase de latencia de la oxidació de les LDL en presencia de qualsevol dels tres vins. El fet que per obtenir uns increments en la fase de latencia similars als obtinguts amb els vins sigui necessària una concentració de 5 a 8 vegades superior d'alfa-tocoferol (antioxidant emprat habitualment), suggereix que els extractes polifenòlics actuen com a potents antioxidants. D'altra banda, el fet que una concentració de coure 5 vegades superior a la habitual no produeixi cap canvi en la fase de latencia de les LDL, demostra que l'efecte antioxidant no és degut a una capacitat de quelar metalls per part dels polifenols.

Quan la LDL es va oxidar en presència del mateix volum de cadascun dels extractes, l'increment de la fase de latència era directament proporcional a la concentració fenòlica dels mateixos. Això ens indica que les diferències en la capacitat antioxidant d'aquests vins poden ser degudes a la concentració de polifenols. De ser així, el vi negre podria ser el més protector, seguit del vi blanc macerat i del vi blanc convencional.

No obstant, quan els extractes es van afegir a la LDL a la mateixa concentració, l'extracte procedent del vi blanc macerat amb la pell del raïm va exercir un efecte inhibidor superior al del vi blanc convencional i inclús al del vi negre. Això ens suggereix que si bé la concentració relativa de polifenols és crítica en la capacitat antioxidant, també el tipus de polifenols que hi ha al vi hi

juga un paper important.

La mesura de TBARS reflexa la producció d'aldehids a partir de la descomposició progressiva dels àcids grassos de la LDL durant l'oxidació d'aquesta lipoproteïna (37). La fluorescència, per altra banda, està totalment asociada a la descomposició de la apoproteïna B de la LDL i és el resultat de la unió dels grups amino lliures de la proteïna amb els aldehids formats durant la peroxidació lipídica (38). La producció de TBARS i de compostos fluorescents va ser inhibida en presència de tots els extractes, d'una forma màxima per l'extracte del vi negre, seguit del blanc macerat i del vi blanc convencional. La inhibició de la fluorescencia total es va donar a càrrec de la fluorescencia hidrosoluble més que no pas de la liposoluble. Aquestes dades juntament amb l'observació de que l'adició d'extractes va reduir la producció de fluorescencia total a les 24 hores d'oxidació però no la de TBARS, suggereixen que els polifenols del vi poden endarrerir però no inhibir la lipoperoxidació lipídica. No obstant, si que inhibeixen la descomposició de la apo B. Això comportaria un clar efecte antiaterogènic, ja que canvis en l'estructura de la apo B disminueixen el reconeixement normal de la LDL pel receptor (39) i afavoreixen el reconeixement d'aquesta lipoproteïna pel receptor "scavenger" (40) la qual cosa, indueix a l'acumulació anormal de colesterol als macròfags i posterior transformació en cèl.lules espumoses.

La resistència natural de la LDL a l'oxidació és un reflexe del contingut d'antioxidants d'aquesta la lipoproteïna (41). La figura 3 demostra que la capacitat antioxidant inicial del sistema d'incubació era superior en presència dels extractes de cadascun dels vins, ara bé, l'efecte inhibidor es va prolongar fins a les 9 hores d'incubació i la vitamina E ja s'havia consumit pràcticament del tot a les 4 hores d'oxidació. Per tant, això ens indica que l'efecte inhibidor "in vitro" sembla que no és explicable pel contingut de vitamina E de la LDL. En canvi, en l'estudi "in vivo", i com es discutirà més endavant, la major resistència a l'oxidació presentada per la LDL dels subjectes consumidors de vi sembla estar relacionada amb el contingut de vitamina E d'aquesta lipoproteïna.

Els resultats obtinguts "in vitro" sobre l'efecte antioxidant del vi blanc han estat confirmats en la part "in vivo" del treball en la que es van comparar els efectes produïts pel consum moderat de vi negre enfront al de vi blanc. Els resultats indiquen que el consum moderat (250 ml/dia) de vi negre durant dues setmanes redueix la susceptibilitat de la LDL a l'oxidació i suggereix que el consum de vi blanc pot exercir també un efecte beneficiós en el desenvolupament de l'arteriosclerosi en contra del que han manifestat alguns autors (17,18,20).

Alguns estudis demostren que la ingesta de vi negre i blanc produeix canvis significatius en els lípids de la sang (42). En aquest estudi no es van detectar canvis significatius en el colesterol total, triglicèrids, colesterol HDL, colesterol LDL o apolipoproteïnes al finalitzar la ingesta dels dos tipus de vi. El resultat en les HDL resulta un xic inesperat, ja que l'increment d'aquesta lipoproteïna, i per tant del transport revers de colesterol, ha estat un dels principals mecanismes pels que s'explica el paper protector de l'alcohol. Aquest resultat pot ser degut a que la quantitat diària de vi ingerida pels voluntaris d'aquest estudi, inferior a la utilitzada en altres estudis (17,20,42), no sigui suficient per produir modificacions en el perfil lipídic. A més, alguns autors han descrit que l'increment en el colesterol HDL produït per la ingesta d'alcohol es produeix després de com a mínim tres setmanes d'ingesta (43) però la durada d'aquest estudi va ser de només dues setmanes i aquesta podria ser també la causa de no haver-se produït cap canvi significatiu en les diferents magnituts lipídiques.

El que si es va observar va ser que després del consum de vi negre es va produir una modificació en la composició de la LDL, concretament va disminuir el contingut de fosfolípids d'aquesta lipoproteïna. S'hipotetitza que l'oxidació de la LDL s'inicia per la descomposició dels seus àcids grassos poliinsaturats (44). Aquest tipus d'àcids grassos es localitzen majoritariament

al nucli de la LDL. Els àcids grassos poliinsaturats de la fracció de fosfolípids són els primers que s'oxiden, posteriorment l'oxidació continua pels esters de colesterol i consecutivament per tota la partícula (45). Així doncs, una disminució de la fracció lipídica que actua com a substrat inicial de l'oxidació, explicaria la major resistència a la oxidació de la LDL dels individus consumidors de vi negre. En conclusió, la protecció de la LDL davant l'oxidació exercida pel vi negre es podria explicar per la modificació de la composició de la lipoproteïna i per la pròpia activitat antioxidant dels compostos fenòlics.

Durant l'oxidació de la LDL dels subjectes consumidors, la fase de latencia en la producció de CD va augmentar significativament després de la ingesta de vi negre. El vi negre també va fer disminuir significativament la velocitat màxima de producció de CD. El consum de vi blanc també va incrementar la fase de latencia i encara que no es va arribar a la significació estadística ($p=0.059$) el resultat està molt pròxim a aquesta significació, probablement amb un número és elevat de subjectes s'hi arribaria. La major capacitat antioxidant del vi negre probablement sigui deguda als polifenols procedents de la pell del raïm (35), ja que per la mateixa quantitat de vi ingerida, amb el vi negre es consumeixen més polifenols. No obstant, a l'expressar la fase de latencia en relació a la quantitat de polifenols (dades no mostrades), el vi blanc va produir un increment més gran per mg d'equivalents d'àcid gàlic. Això demostra que encara que la concentració polifenòlica sigui menor, la qualitat dels polifenols presents al vi blanc és inclús superior a la dels polifenols del vi negre.

La capacitat antioxidant del vi sembla estar relacionada amb el contigut de vitamina E de la LDL, ja que al finalitzar les dues setmanes d'ingesta de vi blanc i de vi negre el contingut de vitamina E de la LDL va ser superior a la del període basal tot i que només es va obtenir un resultat significatiu en el cas del vi negre. Aquest resultat pot indicar que els polifenols podrien contribuir a retrasar el consum de vitamina E durant el procés d'oxidació o bé a una regeneració d'aquest antioxidant present a la LDL.

En conclusió, sembla bastant evident a partir dels resultats presentats que els polifenols del vi poseeixen capacitat antioxidant "in vitro". D'altra banda, els resultats també demostren que el vi blanc, tot i que presenta una concentració polifenòlica inferior al vi negre, presenta un clar efecte antioxidant "in vitro" i també es pot apreciar un cert efecte "in vivo". Finalment, també podem concloure que el vi elaborat en contacte amb la pell del raïm millora no només les seves qualitats organolèptiques sinó també el seu potencial efecte antiaterogènic.

BIBLIOGRAFIA

1. Davies MJ, Woolf N. Atherosclerosis: What is it and why does it occur?. Br Heart J 1993;69(suppl):s3-s11.

2. Parthasaraty S, Rankin SM. Role of oxidized low density lipoproteins in atherogenesis. Prog Lipid Res 1992;31:127.43.

3. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. Annu Rev Biochem 1983;52:223-61.

4. National Research Council Committee on Diet and Health. Diet and Health: implications for reducing chronic disease risk. Washington, DC: National Academy Press, 1989.

5. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. Lancet 1992;339:1523-26.

6. ERICA Research group. The CHD risk-map of Europe: the first report of the WHO-ERICA project. Eur Heart J 1988;9 (suppl 1) :1-36.

7. Keys A. Coronary heart disease in seven countries. Circulation 1970;4 (suppl 1):163-211.

8. Masana L, Camprubí M, Sardà P, Sola R, Joven J, Turner PR. The Mediterranean-type diet: is there a need for further modification?. Am J Clin Nutr 1991;53:886-89.

9. Jackson R, Beaglehole R. The relation between alcohol and coronary disease: is there a protective effect?. Current Opinion in Lipidology 1993;4:21-26.

10. Hegsted DM, Ausman LM. Diet, alcohol and coronary heart disease in man. J Nutr 1988;118:1184-89.

11. Rimm EB, Giovannucci FL, willett WC, et al. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary heart disease in men. Lancet 1991;338:464-68.

12. Moore RD, Pearson TA. Moderate alcohol consumption and coronary artery disease. A review. Medicine 1986;65:242-67.

13. Camargo CA, Williams PT, Vranizan KM, Albers JJ, Wood PD. The effect of moderate alcohol intake on serum apolipoproteins A-I and A-II. JAMA 1985;253:2854-57.

14. Meade TW, Mellows S, Brozovic M et al. Haemostatic function and ischaemic heart disease. Principal results of the Northwick Park Heart Study. Lancet 1986;2:533-37.

15. Frankel EN, Kanner J, German JB et al. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. Lancet 1993;341:454-57.

16. De Whalley CV, Rankin SM, Hault JRS et al. Flavonoids inhibit the oxidative

modification of low density lipoprotein by macrophages. Biochem Pharmacol 1990;39:1743-50.

17. Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. Am J Clin Nutr 1995;61:549-54.

18. Sharpe PC, McGrath LT, McLean E, Young IS, Archbold GPR. Effect of red wine consumption on lipoprotein(a) and other risk factors for atherosclerosis. Q J Med 1995;61:549-54.

19. Caldú P, Hurtado I, Gonzalo A, Ramon JM, Mínguez S, Fiol C. White wine reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation (letter). Am J Clin Nutr 1996;63:403.

20. De Rijke YB, Demacker PNM, Assen NA, Sloots LM, Katan MB, Stalenhoef AFH. Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoproteins in volunteers. Am J Clin Nutr 1996;63:329-34.

21. Kanner J, Frankel EN, Granit R, German B, Kinsella JE. Natural antioxidants in grapes and wines. J Agric Food Chem 1994;42:64-69.

22. Singleton SL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965;16:144-58.

23. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J Clin Invest 1959;34:1345-53.

24. Hatch FT, Lees ES. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. Adv Lipid Res 1968;6:1-68.

25. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. Free Radic Res Commun 1989;6:67-75.

26. Kleinveld HA, Hak-Lemmers HLM, Stalenhoef AFH, Demacker PNM. Improved measurement of low-density lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. Clin Chem 1992;38/10:2066-72.

27. Yagi K. A simple fluorimetric analysis for lipoperoxides in blood plasma. Biochem Med 1976;15:212-16.

28. Tsuchida M, Miura T, Mizutani K, Aibara K. Fluorescent substances in mouse and human sera as a parameter of in vivo lipid peroxidation. Biochem et Biophys Acta 1985;834:196-204.

29. Tsen CC. An improved spectrophotometric method for determination of tocopherols using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. Anal Chem 1961;33:849-51.

30. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.

31. Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A. Red wine, tea and antioxidants (carta). Lancet 1994;334:626.

32. Muller CJ, Fugelsang KC. Take two glasses of wine and see me in the morning (carta). Lancet 1994;343:1428.

33. Kondo K, Matsumoto A, Kurata H, et al. Inhibition of oxidation of low-density lipoprotein with red wine (carta). Lancet 1994;344:1152.

34. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. Lancet 1993;341:1103-4.

35. Sims CA, Bates RP. Effects of skin fermentation on the phenols, anthocyanis, ellagic acid sediment, and densory characteristics of a red Vitsi rotundifolia wine. Am J Enol Vitic 1994;45:56-52.

36. Kaner J, Frankel EN, Granit R, German B, Kinsella JE. Natural antioxidants in grapes and wines. J Agric Food Chem 1994;42:64-69.

37. Gebicki JM, Jürgens G, Esterbauer H. Oxidation of low-density lipoprotein in vitro. In: Sies H ed. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. New York, Academic Press, Inc, 1991:371-79.

38. Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Striegl G, Jürgens G. Biochemical, structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. Chem Res Toxicol 1990;3:77-92.

39. Witzum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. J Clin Invest 1991;88:1785-92.

40. Haberland ME, Fogelman AM, Edwards PA. Specificity of receptor-mediated recognition of malondialdehyde-modified low density lipoproteins. Proc Natl Acad Sci USA 1982;79:1712-16.

41. Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. Proc Matl Acad Sci USA 1992;89:106-20.

42. Seigneur M, Bonnet J, Dorian B, Benchimol D, Drouillet F, Gouverneur G, et al. Effect of the consumption of alcohol, white wine, andred wine on platelet function and serum lipids. J Appl Cardiol 1990;5:215-22.

43. Hartung GH, Foreyt JL, Reeres RS, et al. Effect of alcohol dose on plasma lipoprotein subfractions and lipolytic enzyme activity in active and inactive men. Metabolism

1990;39:81-86.

44. Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Hertuala S, Gurtner GC, Socher SA, Butler SW, et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:1372-76.

45. Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D, Witztum JL. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. J Clin nvest 1993;91:668-76.