



**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**Programa de Doctorado en Nutrición y Seguridad**  
**Alimentaria**

**Compuestos bioactivos en vino tinto y su efecto  
sobre el estrés oxidativo y marcadores vasculares, de  
inflamación, mutagénesis y degeneración del sistema  
nervioso central tras su ingestión dietética por  
voluntarios sanos**

Autor:

Javier Marhuenda Hernández

Directores:

Dr. Ángel Gil Izquierdo

Dra. Pilar Zafrilla Rentero

Dra. Juana Mulero Cánovas

Murcia, 20 de Abril de 2016





**UCAM**  
UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA



**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**Programa de Doctorado en Nutrición y Seguridad**  
**Alimentaria**

**Compuestos bioactivos en vino tinto y su efecto  
sobre el estrés oxidativo y marcadores vasculares, de  
inflamación, mutagénesis y degeneración del sistema  
nervioso central tras su ingestión dietética por  
voluntarios sanos**

Autor:

Javier Marhuenda Hernández

Directores:

Dr. Ángel Gil Izquierdo

Dra. Pilar Zafrilla Rentero

Dra. Juana Mulero Cánovas

Murcia, 20 de Abril de 2016



## AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El doctor Ángel Gil Izquierdo, la doctora Pilar Zafrilla Rentero y la doctora Juana Mulero Cánovas como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Compuestos bioactivos en vino tinto y su efecto sobre el estrés oxidativos y marcadores vasculares, de inflamación, mutagénesis y degeneración del sistema nervioso central tras su ingestión dietética por voluntarios sanos”, realizada por D. Javier Marhuenda Hernández en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición de la UCAM y en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos del CEBAS-CSIC, autorizan su presentación a trámite dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 20 de Abril de 2016.

Dr. Ángel Gil Izquierdo

Dra. Pilar Zafrilla Rentero

Dra. Juana Mulero Cánovas

Vº Bº Comisión de Doctorado

Tercer Ciclo. Vicerrectorado de Investigación

Campus de Los Jerónimos. 30107 Guadalupe (Murcia)

Tel. (+34) 968 27 88 22 • Fax (+34) 968 27 85 78

C. e.: [tercerciclo@pdi.ucam.edu](mailto:tercerciclo@pdi.ucam.edu)



La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por:

- El programa de potenciación de recursos humanos, y la convocatoria propia de contratos predoctorales de la UCAM para la formación de personal investigador.
- Proyectos de investigación privados de CEBAS-CSIC y parcialmente financiada por “Fundación Séneca de la Región de Murcia” Grupo de Excelencia 19900/GERM/15.





**CONTRIBUCIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA  
ACTIVIDAD CIENTÍFICA DURANTE EL PERIODO DE ESTA TESIS  
DOCTORAL**

1. Javier Marhuenda, Pilar Zafrilla, M<sup>a</sup> Dolores Alemán, Alfonso Perez, Gabriel Caravaca, Fernando Figueroa, Juana Mulero. "Efecto de la biodisponibilidad *in vitro* en la concentración de fenoles totales y antocianos de diferentes frutos rojos". 9<sup>o</sup> congreso iberoamericano de ingeniería de alimentos. Valencia (España), 2014.
2. Javier Marhuenda Fernando Figueroa, Begoña Cerdá, Pilar Zafrilla, Juana Mulero. "Efecto de la biodisponibilidad *in vitro* en la actividad antioxidante de diferentes frutos rojos". 9<sup>o</sup> congreso iberoamericano de ingeniería de alimentos. Valencia (España), 2014.
3. Fernando Figueroa, Javier Marhuenda, Begoña Cerdá, Pilar Zafrilla, Juana Mulero. "Biodisponibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos de 10 variedades de nogal". 9<sup>o</sup> congreso iberoamericano de ingeniería de alimentos. Valencia (España), 2014.
4. Fernando Figueroa, Javier Marhuenda, Begoña Cerdá, Pilar Zafrilla, Juana Mulero. "Influencia de las condiciones edafoclimáticas en la concentración en fenoles totales de 10 variedades de nogal". 9<sup>o</sup> congreso iberoamericano de ingeniería de alimentos. Valencia (España), 2014.
5. J. Marhuenda, A.C. Díaz-Castro, S. Medina, P. Martínez-Hernández, S. Arina, P. Zafrilla, J. Mulero, C. Oger, J.-M. Galano, T. Durand, F. Ferreres, A. Gil-Izquierdo. "UPLC-MS-MS analysis of phytoprostanes from three different musts and their resultant wines". 12<sup>th</sup> EUROFED lipid congress. Montpellier (France), 2014.
6. J. Marhuenda, A.C. Díaz-Castro, S. Medina, P. Martínez-Hernández, S. Arina, P. Zafrilla, J. Mulero, C. Oger, J.-M. Galano, T. Durand, F. Ferreres, M. Larrosa, A. Gil-Izquierdo. Phytoprostane fingerprinting is different depending on viticulture and enological process in must and wine. 7th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH 2015).
7. J. Marhuenda, S. Medina, P. Martínez-Hernández, S. Arina, P. Zafrilla, J. Mulero, C. Oger, J.-M. Galano, T. Durand, A. Solana, F. Ferreres, M. Larrosa, A. Gil-Izquierdo. Melatonin and hydroxytyrosol-rich wines exert protection of

the central nervous system against oxidative stress (neuroprostanes and dihydro-isoprostanes) after the intake of three types of wine by healthy volunteers. 7th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH 2015).

8. J. Marhuenda, S. Medina, P. Martínez-Hernández, S. Arina, P. Zafrilla, J. Mulero, C. Oger, J.-M. Galano, T. Durand, A. Larrosa, F. Ferreres, M. Larrosa, A. Gil-Izquierdo. Melatonin and hydroxytyrosol-rich wines influence the generation of lipoperoxidation markers based-lipidomics after the dietary intake of three types of wine by healthy female volunteers. 7th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH 2015).

**PONENCIAS ORALES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA  
ACTIVIDAD CIENTÍFICA DURANTE EL PERIODO DE ESTA  
TESIS DOCTORAL**

J. Marhuenda. "Melatonin and hydroxytyrosol-rich wines influence the generation of oxidative stress markers-related to the central nervous system-after the ingestion of three types of wine". Future Trends in Phytochemistry in the global era of agrifood and health. II: A Young Scientists Meeting. San Pedro del Pinatar (Spain), 2015.

## **EDICIÓN DE LIBROS DERIVADA DE LA ACTIVIDAD CIENTÍFICA DURANTE EL PERIODO DE ESTA TESIS DOCTORAL**

Nieves Baenas, Javier Marhuenda, Diego A. Moreno, Cristina García-Viguera. "Future Trends in Phytochemistry in the global era of agrifood and health. II: A Young Scientists Meeting". ISBN: 978-0-9565472-6-2

Javier Marhuenda, Begoña Cerdá, Débora Villaño, Pilar Zafrilla. "Isoprostanes and Neuroprostanes: Production and Role in Different Pathologies". Nova Publishers. ISBN: 978-1-63485-253-1

## **CAPÍTULOS DE LIBROS DERIVADOS DE LA ACTIVIDAD CIENTÍFICA DURANTE EL PERIODO DE ESTA TESIS DOCTORAL**

Amadeo Gironés, Debora Villaño, Javier Marhuenda, Diego A. Moreno, Cristina García-Viguera. "Nutraceutical and Functional Food Components: Vitamins". Elsevier. En proceso de publicación

## ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA ACTIVIDAD CIENTÍFICA DURANTE EL PERIODO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

1. Javier Marhuenda; Sonia Medina; Pedro Martínez-Hernández; Simon Arina; Pilar Zafrilla; Juana Mulero; Camille Oger; Jean-Marie Galano; Thierry Durand; Alexandra Díaz; Federico Ferreres; Ángel Gil-Izquierdo. "Phytopropane fingerprinting is different depending on viticulture and enological process in must and wine". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2015).
2. Javier Marhuenda; Sonia Medina; Pedro Martínez-Hernández; Simon Arina; Pilar Zafrilla; Juana Mulero; Camille Oger; Jean-Marie Galano; Thierry Durand; Antonio Solana; Federico Ferreres; Ángel Gil-Izquierdo. "Melatonin and hydroxytyrosol-rich wines influence the generation of oxidative stress markers-related to the central nervous system- after the ingestion of three types of wine by healthy volunteers". *Journal of Nutritional Biochemistry* (under review).
3. Javier Marhuenda; Sonia Medina; Pedro Martínez-Hernández; Simon Arina; Pilar Zafrilla; Juana Mulero; Camille Oger; Jean-Marie Galano; Thierry Durand; Antonio Solana; Federico Ferreres; Ángel Gil-Izquierdo. "Melatonin and hydroxytyrosol-rich wines influence the generation of urinary prostaglandins and isoprostanes after the dietary intake of three types of wine by healthy female volunteers". *Molecular Nutrition & Food Research* (under review).
4. Javier Marhuenda; Sonia Medina; Pedro Martínez-Hernández; Simon Arina; Pilar Zafrilla; Juana Mulero; Camille Oger; Jean-Marie Galano; Thierry Durand; Federico Ferreres; Ángel Gil-Izquierdo. "Melatonin and hydroxytyrosol-rich wines influence the generation of oxidative DNA and RNA metabolites after the dietary intake of three types of wine by healthy female volunteers". *The American Journal of Clinical Nutrition* (under review).
5. Javier Marhuenda, Amadeo Gironés, María Dolores Alemán, Gabriel Caravaca, Juana Mulero, Pilar Zafrilla. "Phenolic composition, antioxidant activity and *in vitro* availability of four different berries". *Journal of Chemistry* (2016).

6. Javier Marhuenda, Amadeo Gironés-Vilaplana, Mercedes Gálvez, Juana Mulero, Gabriel Caravaca, Pilar Zafrilla. Antioxidant Capacity and Totals Phenolics in Different Types of Edible Seaweed after Three Times of Cooking. *AgroFOOD Industry Hi Tech* (2016).
7. Francisco Avilés-Plaza, Juana Bernabé, Tânia O. Constantino, Juana Mulero, Begoña Cerdá, Javier Marhuenda, Cristina García-Viguera, Diego A. Moreno, José Abellán, Pilar Zafrilla, Soledad Parra-Pallarés. Biomarkers of Oxidative Stress in Syndrome Metabolic Patients, a case control study. *Journal of Metabolic Syndrome* (2015).
8. Francisco Avilés-Plaza, Juana Bernabé, Tânia O. Constantino, Juana Mulero, Begoña Cerdá, Javier Marhuenda, Cristina García-Viguera, Diego A. Moreno, José Abellán, Pilar Zafrilla, Soledad Parra-Pallarés. Changes in Antioxidant enzymes in Metabolic Syndrome patients after consumption a citrus-based juice enriched with *Aronia melanocarpa*. *Journal of Nutritional Disorders & Therapy* (2015).
9. Fernando Figueroa; Javier Marhuenda; Amadeo Gironés-Vilaplana; Pilar Zafrilla; Begoña Cerdá; Adela Martínez-Cachá; Juana Mulero. Effect of soil and climatic conditions on the antioxidant capacity of 10 genotypes of walnuts. *Journal of Food Biochemistry* (under review).
10. Fernando Figueroa; Javier Marhuenda; Juana Mulero; Pilar Zafrilla; Adela Martínez-Cachá; Begoña Cerdá. Evaluating Total Phenol Content in vitro availability of 10 different genotypes of walnuts (*Juglans Regia*, L). *International Journal of Food Properties* (under review).
11. Fernando Figueroa; Javier Marhuenda; Begoña Cerdá; Pilar Zafrilla; Adela Martínez-Cachá; Luis Tejada; Débora Villaño; Juana Mulero. HPLC-DAD Determination and Availability of Phenolic Compounds in 10 Genotypes of Walnuts. *Journal of Food and Nutrition Research* (2016, aceptado).
12. María Dolores Barnuevo Espinosa, Javier Marhuenda, Miriam Aldeguer García, María Salud Abellán Ruiz, Pilar Zafrilla Rentero, Carlos J. Contreras Fernández, Francisco Javier López Román "In vivo study of three marketed milk preparations enriched with calcium and vitamins (D and K) on bone markers". *The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* (under review)

13. Javier Marhuenda Hernández, Pilar Zafrilla Rentero, Begoña Cerdá Martínez-Pujalte. "Probiotics and Atopic Dermatitis in children. A review". *Nutrición Hospitalaria* (under review). *The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* (under review)

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer el apoyo a todas las personas que, de una forma u otra, han intervenido en la presente Tesis Doctoral.

A mis directoras, la Dra. Zafrilla y la Dra. Mulero. Siempre, y digo siempre, habéis confiado en mí. Nada de esto sería posible sin vosotras, gracias por aguantar las llamadas constantes y las reuniones para buscar un proyecto con el que desarrollar la tesis. Juana, estuviste pendiente de mí al principio de la Tesis, cuando más perdido estaba y cuando ni siquiera sabía hacer un kit correctamente. Gracias a tí reuní fuerzas para embarcarme en esta aventura. Pilar, no sé qué haría sin tí durante estos últimos meses de Tesis, con el corazón en un puño. Gracias por tu sonrisa, por tu optimismo constante, y por partirme la cara con quien haga falta para que salga adelante. Gracias a las dos por la confianza que habéis tenido y por apostar de manera incondicional en mí desde el principio. Sois muchísimo más que unas directoras de Tesis para mí.

A mi director, el Dr. Gil. Ángel, me acogiste con los brazos abiertos y has estado disponible desde que entré en tu despacho por primera vez, llamándote de usted y casi sin saber qué es lo que iba a hacer. Gracias por la cercanía que transmites, por nuestros partidos de pádel. Gracias por encauzar mi carrera y por formarme como investigador. Es un honor ser tu doctorando.

A Bodegas Baigorri S.A.U. en especial al Dr. Pedro Martínez Hernández y al enólogo jefe de la bodega D. Simón Arina por el suministro de los vinos y mostos, además de su orientación en el apartado enológico y su permanente disposición a la consecución de los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral.

Al doctor Thierry Durand y su grupo (Institut Max Mousseron, Montpellier, Francia), por el suministro de los compuestos y las directrices con los artículos.

Al grupo Jijijojomics, por supuesto. Una tesis se hace mejor con vosotros al lado. La filosofía y la sonrisa de Neus, las canciones matutinas de Chiti, las bromas de Christina (que locos estáis), los aparecimientos “guadianeros” y los desahogos con Debo (me sigues, y lo sabes), la disponibilidad absoluta de Libia, la bondad de Jacin (y la ironía de la nueva Jacin), la prometedora inclusión de Ángel, el mancheguismo de So (Manchacha, mereces ser directora de esta tesis), y Amadeo poniéndonos firmes con sus golpes en la mesa (CHÉ!!). Gracias a los

jefes. Diego, Cristina y Federico sois una referencia tanto personal como profesional, me habéis mostrado que se puede ser jefe sin perder de vista los valores humanos. Raúl y Pedro no es lo mismo sin vosotros, os echamos de menos. Las comidas, las despedidas y, por supuesto, las bienvenidas. Que os voy a decir familia, aunque la tesis hubiese durado diez años se me habría hecho corta.

Gracias a todos los compañeros del CEBAS, desde el primero hasta el último. A las chicas: Pepa, Anaís y Ana, Mariajo, Ana, Irene, Sara... A la casta-post-punk del fondo sur (sí Lolo y Edu, sois vosotros). A Silvia y a la zagalica, a Félix y a Vito, los orcos de Mordor comandados por Sauron... A todos, ¡¡Sois enormes!! Es muy difícil encontrar un grupo así, los jueves de kiosco y las casas rurales siempre estarán presentes.

Me pongo serio. Gracias a los zagales. Aquí me repito, pero es necesario. Vito, Félix, Amadeo y Cornelio, los ratos en el piso habrán lastrado unos cuantos años de vida...pero sin duda los harán más llevaderos!! La calidad humana que me habéis demostrado es impresionante, me quito el sombrero con vosotros. Siempre ahí para lo bueno, y sobre todo para lo malo. ¡¡Lo que unió la amistad que no lo rompa la ciencia!!

Al Departamento de Farmacia y al de Tecnología de la Alimentación y Nutrición de la UCAM. Es fácil ser uno más, gracias por la cercanía como compañeros. Mención especial para José María Cayuela, muchas gracias por confiar en mí y por hacerme sentir importante. Gracias a Gabi por sus constantes ayudas dentro del laboratorio, habrás tenido que aguantar mucho conmigo. Gracias a mis compis becarios por la cercanía y las ganas de ayunarnos los unos a los otros, se hace más fácil el trabajo de laboratorio con vosotros. Y, por supuesto, muchas gracias Adela...desde el principio, gracias por tu amistad y tu apoyo incondicional.

A mi familia. Tenemos suerte de formar la familia que formamos, realmente lo somos. Cada consejo, cada abrazo y cada broma son siempre de agradecer. A mis abuelos, os echo mucho de menos, aprendí mucho de vosotros y habríais disfrutado mucho con esta tesis. A mis abuelas, sois lo más valioso de nuestra familia. Gracias y mil gracias por ser una referencia para mí.



A mis padres, el mayor agradecimiento es para vosotros. Nunca os agradeceré lo suficiente todo lo que representáis. Soy lo que soy gracias a vuestro esfuerzo, GRACIAS por dejaros el alma por mí. Madre, gracias por hacerme ver las cosas con los pies en la tierra, por intentar que tenga siempre la cabeza fría, por ser el pegamento que une nuestra familia. Padre, gracias por hacerme ser más de lo que soy, por hacerme crecer cada día, por mostrarme que sólo hacen falta dos pares de cosas para avanzar en la vida. A mi hermana Ana, estoy muy orgulloso de ti. Puedes ser quien te propongas, tienes el mundo en tus manos y una tesis no es nada para ti. No olvides que nunca estarás sola, un hermano es para toda la vida. Sé que estáis aún más orgullosos de esta tesis que yo. Disfrutad de ella, os la merecéis. A los tres, os quiero.

A Rocío. Gracias por aguantar la cabeza en otra parte, los nervios, la mala leche y acompañarme a lo largo de esta tesis. Gracias por cada mañana, gracias por nosotros. Te quiero.

A todos los que se me olvidan.



## ABREVIATURAS

<b>5-LO</b>	5-lipoxigenasa
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>AFMK</b>	N1-acetil-N2-formil-5-metoxikynuramina
<b>ALA</b>	Ácido linolénico
<b>AM</b>	Mosto de origen del vino de crianza
<b>AMK</b>	N1-acetyl-5-metoxikynuramina
<b>AQC</b>	6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato
<b>AW</b>	Vino de crianza
<b>BER</b>	Base excision repair
<b>BH<sub>4</sub></b>	Tetrahidrobiopterina
<b>CETP</b>	Proteína Transferidora de Colesterol Esterificado
<b>CMM</b>	Mosto de origen del vino de maceración carbónica
<b>CMW</b>	Vino de maceración carbónica
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DHA</b>	Ácido docosaenoico
<b>Dihomo-IsoP</b>	Dihomo-isoprostano
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintetasa
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenoico
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de oxígeno
<b>HEM</b>	Mostos de origen del vino de autor
<b>HEW</b>	Vino de autor
<b>HV-Acid</b>	Ácido homovanílico
<b>HV-Alc</b>	Alcohol homovanílico
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IsoP</b>	Isoprostano
<b>LPL</b>	Lipoproteín lipasa
<b>MDA</b>	Malondialdehido

<b>MEL</b>	Melatonina
<b>NER</b>	Nucleotide excision repair
<b>NeuroP</b>	Neuroprostano
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OGG<sub>1</sub></b>	8-hydroxiguanina ADN glicosilasa
<b>OHTyr</b>	Hidroxitirosol
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>FitoP</b>	Fitoprostano
<b>PLa<sub>2</sub></b>	Fosfolipasas A <sub>2</sub>
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>TP</b>	Receptor de tromboxano
<b>t-PA</b>	Activador del plasminógeno tisular
<b>TRP</b>	Triptófano
<b>TX</b>	Tromboxano
<b>Tyr</b>	Tirosol
<b>WR</b>	Ron blanco

*“No es suficiente con ser listo o inteligente,  
lo más importante en esta vida es ser trabajador”*

*Juan José Marhuenda Calero  
María del Carmen Hernández Arjona*



*A mi familia*  
*A mis padres*  
*A mi hermana*  
*A Rocío*





## **INDICE GENERAL**



## ÍNDICE GENERAL

<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	33
1. ALIMENTACIÓN Y SALUD.....	35
2. EL VINO .....	36
2.1. DEFINICIÓN E HISTORIA .....	36
2.2. PROCESOS DE VINIFICACIÓN .....	38
2.2.1. Maceración carbónica.....	38
2.2.2. Procesos de fermentación .....	39
2.2.3. Tipos de crianza. Crianza en barrica.....	40
2.3. EL ALCOHOL Y LA SALUD .....	42
2.4. EL VINO Y LA SALUD .....	44
3. COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL VINO .....	47
3.1. POLIFENOLES .....	47
3.2. HIDROXITIROSOLES Y SUS METABOLITOS .....	50
3.3. MELATONINA .....	52
4. MARCADORES VASCULARES Y DE INFLAMACIÓN EN EL SER HUMANO.....	55
5. MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO .....	59
5.1. CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO .....	59
5.2. MARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HUMANOS A NIVEL SISTÉMICO. ISOPROSTANOS.....	60
5.3. MARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	64
5.4. MARCADORES DE OXIDACIÓN Y MUTAGÉNICOS DE ADN .....	67
5.5. MARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN PLANTAS SUPERIORES. FITOPROSTANOS.....	69

---

<b>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS</b> .....	73
<b>CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	77
1. MUESTRAS EMPLEADAS DURANTE EL ENSAYO CLÍNICO .....	79
1.1. VINOS TINTOS .....	79
1.1.1. "Baigorri Maceración Carbónica 2010" (MCW) .....	79
1.1.2. "Baigorri crianza 2007" (AW) .....	80
1.1.3. "Baigorri Garaje 2010" Vino de autor (HEW).....	80
1.2. MUESTRAS DE MOSTO .....	80
1.3. MUESTRA DE ALCOHOL ETÍLICO .....	81
2. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	81
2.1. PERIODO DE CONTROL EN CONDICIONES INICIALES Y CONTROL DE ETANOL .....	82
2.2. INGESTA DE VINO Y MOSTO.....	83
2.3. TOMA DE MUESTRAS DE ORINA Y PLASMA SANGUÍNEO.....	84
3. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE ORINA PARA EL ANÁLISIS DE ISOPROSTANOS, PROSTAGLANDINAS, NEUROPROSTANOS Y F <sub>2</sub> -DIHOMO-ISOPROSTANOS.....	85
4. ANÁLISIS DE ISOPROSTANOS Y PROSTAGLANDINAS EN ORINA MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS.....	86
5. ANÁLISIS DE NEUROPROSTANOS Y F <sub>2</sub> -DIHOMO-ISOPROSTANOS EN ORINA MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS .....	88
6. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE FITOPROSTANOS EN MUESTRAS DE VINO Y MOSTO MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS. ....	89
7. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE HPLC-DAD. ....	91
8. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE HIDROXITIROSOLO Y SUS METABOLITOS EN MUESTRAS DE VINO Y MOSTO MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS.....	92

---

9. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE MELATONINA Y SEROTONINA EN MUESTRAS DE VINO Y MOSTO MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS... 93	
10. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE TRIPTÓFANO EN MUESTRAS DE VINO Y MOSTO MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS..... 94	
11. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE CATABOLITOS DE ADN EN MUESTRAS DE PLASMA MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS..... 95	
12. PRUEBAS ESTADÍSTICAS REALIZADAS PARA COMPROBAR LA RELACIÓN ENTRE LA INGESTA DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS PRESENTES EN EL VINO Y LOS DIFERENTES MARCADORES ESTUDIADOS..... 96	
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 99</b>	
1. CARACTERIZACIÓN DE LOS MOSTOS Y VINOS EN BASE A SU CONTENIDO EN POLIFENOLES, MELATONINA E HIDROXITIRO SOL Y SUS METABOLITOS..... 101	
1.1. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL MOSTO Y DE VINO..... 101	
1.2. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE MELATONINA Y SEROTONINA EN VINOS Y MOSTOS..... 104	
1.3. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE HIDROXITIRO SOL Y SUS METABOLITOS EN VINOS Y MOSTOS..... 105	
1.4. CUANTIFICACIÓN DE TRIPTÓFANO EN MOSTO Y VINO ..... 106	
1.5. EVOLUCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DURANTE LA VINIFICACIÓN..... 107	
1.6. BIODISPONIBILIDAD DE MELATONINA E HIDROXITIRO SOL. ROL DEL ETANOL..... 111	
2. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO, FUNCIÓN VASCULAR E INFLAMACIÓN MEDIANTE EL ANÁLISIS DE ISOPROSTANOS Y PROSTAGLANDINAS EN ORINA..... 115	
2.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE ISOPROSTANOS EN ORINA ..... 115	
2.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ISOPROSTANOS EN ORINA..... 116	

---

2.3. ANÁLISIS CUALITATIVO DE PROSTAGLANDINAS EN ORINA .....	119
2.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE PROSTAGLANDINAS EN ORINA ....	121
2.5. RELACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL VINO CON LA EXCRECIÓN DE ISOPROSTANOS Y PROSTAGLANDINAS EN ORINA .....	125
3. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL MEDIANTE EL ANÁLISIS DE NEUROPROSTANOS Y F <sub>2</sub> -DIHOMO-ISOPROSTANOS.....	131
3.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE NEUROPROSTANOS Y F <sub>2</sub> -DIHOMO-ISOPROSTANOS.....	131
3.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE NEUROPROSTANOS Y F <sub>2</sub> -DIHOMO-ISOPROSTANOS TOTALES ENCONTRADOS EN ORINA.....	131
3.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE NEUROPROSTANOS Y F <sub>2</sub> -DIHOMO-ISOPROSTANOS INDIVIDUALES .....	134
3.4. RELACIÓN ENTRE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL VINO Y LOS MARCADORES DE ESTRÉS DEL SNC.....	136
4. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO MEDIANTE EL ANÁLISIS DE CATABOLITOS DE OXIDACIÓN DE ADN. MARCADORES DE MUTAGÉNESIS.....	140
4.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE CATABOLITOS DE OXIDACIÓN DE ADN. ....	140
4.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE CATABOLITOS DE OXIDACIÓN DE ADN. ....	140
4.3. EFECTOS DE LA INGESTA DE VINO Y MOSTO EN RELACIÓN CON LA OXIDACIÓN NO ENZIMÁTICA DE ADN. ....	144
4.4. RELACIÓN ENTRE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y LOS MARCADORES DE OXIDACIÓN Y MUTAGÉNESIS DE ADN.....	147
5. NUEVOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA. FITOPROSTANOS.....	151

---

5.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE FITOPROSTANOS EN VINO Y MOSTO .....	151
5.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FITOPROSTANOS EN VINO Y MOSTO .....	151
5.3. INFLUENCIA DE LA VINIFICACIÓN EN EL CONTENIDO DE FITOPROSTANOS .....	154
5.4. POSIBLES EFECTOS DE LA INGESTA DE VINOS Y MOSTOS EN BASE A SU CONTENIDO EN FITOPROSTANOS .....	156
<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>159</b>
<b>CAPÍTULO 6. REFERENCIAS .....</b>	<b>163</b>





## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**



## 1. ALIMENTACIÓN Y SALUD

En los últimos años las investigaciones sobre la relación entre la nutrición y las distintas enfermedades se han dirigido a buscar el patrón de alimentación más adecuado para el mantenimiento de un estado óptimo de salud. De todos los patrones de alimentación propuestos, el que tiene mayor interés y aceptación es el denominado como “Dieta Mediterránea” (Altomare y col., 2013; Sofi y col., 2013). Este concepto fue acuñado por Ancel Keys después de realizar un estudio epidemiológico, demostrando que las poblaciones pertenecientes a la cuenca mediterránea tienen una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer, en comparación con otras poblaciones no limítrofes (Keys y col., 1986).

De hecho, las patologías cardiovasculares y la Diabetes mellitus tipo II podrían reducirse hasta en un 80% y un 90% respectivamente con cambios en la alimentación y el estilo de vida (Martinez-Gonzalez & Bes-Rastrollo, 2014) (Singh y col., 2014). Las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento y el deterioro cognitivo, también puede verse mejoradas mediante la dieta y el consumo de productos característicos de la dieta mediterránea como el vino tinto (Stockley, 2009). Otro gran ejemplo de enfermedad relacionada con la alimentación es el cáncer y sus diversos tipos, que podrían reducirse hasta casi un 40% con las adecuadas pautas dietéticas y la ingesta de compuestos antioxidantes naturales (Dilis y col., 2012; Giacosa y col., 2013; Key y col., 2004; Tandon y col., 2008).

El vino, especialmente el tinto, es uno de los exponentes principales de la Dieta Mediterránea, siendo responsable de la denominada “Paradoja Francesa”. Hace 30 años, Leger St y col. (1979) encontraron que la población francesa, con una dieta rica en grasas, presentaba una menor tasa de mortalidad asociada a accidente cardiovascular comparada con otros países en los que la ingesta de grasa era menor. Encontraron una relación inversa entre la mortalidad por enfermedad cardiovascular y el consumo de vino tinto, atribuyéndole de ésta manera efectos cardioprotectores.

Es evidente que, cada vez más, existe un gran interés por una alimentación equilibrada y sana. En este sentido, la Dieta Mediterránea es una fuente de antioxidantes naturales y juega un papel esencial en la prevención de gran parte de las enfermedades, las cuales tienen en la alimentación un factor primordial en su etiología.

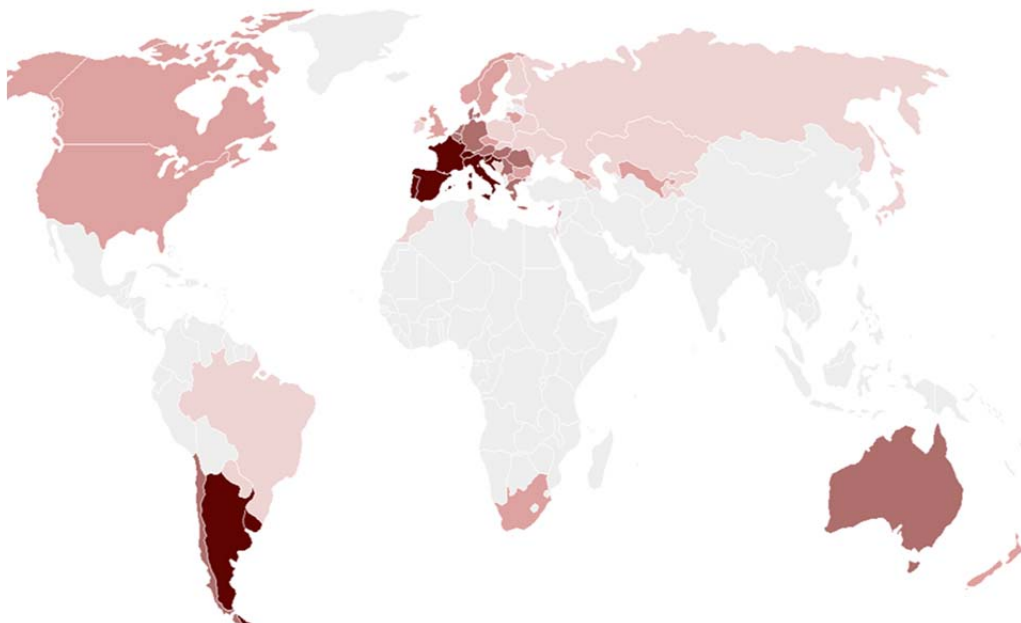
## 2. EL VINO

### 2.1. DEFINICIÓN E HISTORIA

El vino es una bebida alcohólica fermentada procedente del mosto, el zumo de la uva (*vitis vinifera*), y contiene una cantidad de alcohol moderada con respecto a otras bebidas espirituosas (14º alcoholicos aproximadamente) (Chrzan, 2013). La historia del vino se enlaza con otras actividades humanas íntimamente relacionadas, como la agricultura y la gastronomía. La mayoría de los pueblos han estado necesitados de vino, y esto ha hecho que sea una mercancía de valor en diferentes culturas a lo largo de los años (Toussaint-Samat, 2009). Diversas fuentes indican que las primeras producciones de vino proceden de una extensa área geográfica, datando desde el año 6.000 al 5.000 a.C. Los primeros hallazgos de la *vitis vinifera* ocurrieron en la edad del bronce, en lugares cercanos a Oriente Próximo, Sumeria y el Antiguo Egipto, alrededor del año 3.000 a.C. (Chrzan, 2013; Toussaint-Samat, 2009).

La vid posee una gran capacidad adaptativa, ya que requiere pocos cambios genéticos para acomodarse a su nuevo cultivo en las diferentes zonas, lo que le ha permitido extenderse ampliamente. Posee unos bajos requerimientos de agua y minerales, además de crecer en tierras donde otros frutales no crecerían. Por último, permite una recolección intensiva anual gracias a su capacidad regenerativa (Jackson, 2008). Esta adaptabilidad ha sido esencial en la expansión a lo largo de Europa, así como en la mayoría de los climas templados. Así pues, la calidad final del vino depende de numerosos factores (sobre todo agronómicos), pero también de factores ambientales como el clima, la latitud, la altura o las horas de luz (Jackson, 2008; Toussaint-Samat, 2009).

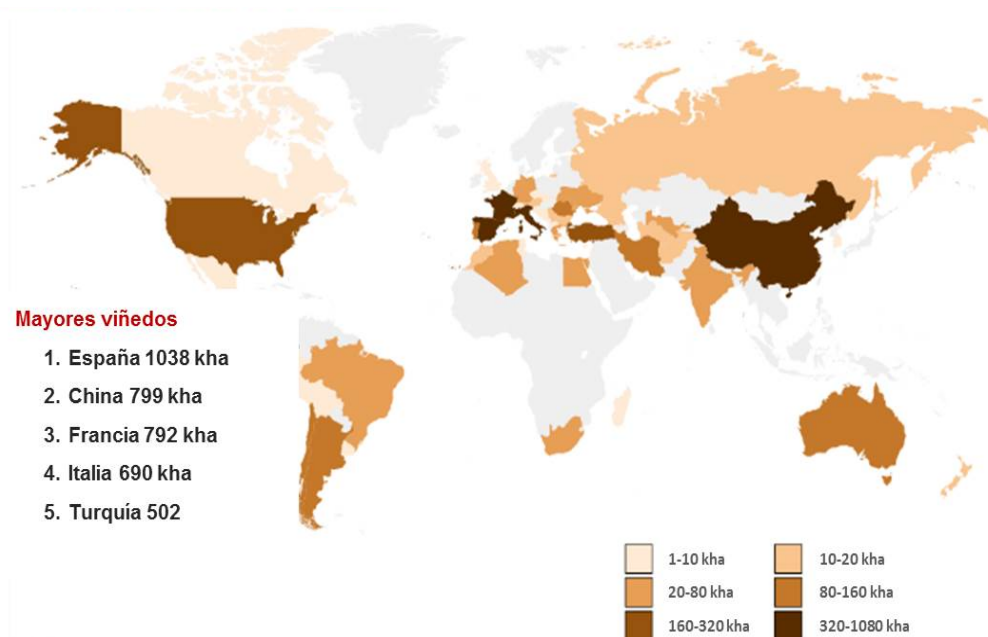
Los diversos productores de vino del mediterráneo y de Oriente Próximo reclaman la autoría del proceso de vinificación. Sin embargo, el comercio y la expansión de algunas culturas e imperios han hecho que el vino y su cultivo se fuesen extendiendo por diversas regiones de todos los países, adoptando nuevos sabores y aromas propios de cada zona (Toussaint-Samat, 2009). Esto es debido a la mencionada capacidad adaptativa de la uva y su alto rendimiento, además de la gran concentración de ácido tartárico de sus frutos, lo que favorece la acción de las levaduras.



**Figura 1.** Producción de vino a nivel mundial en 2014 (OIV, 2015). Predominan los tres tradicionales productores de vino (17% Francia, 16% Italia y 15% España).

Actualmente, la uva es una de las frutas más recolectadas a nivel mundial, siendo el 70% de la misma dedicada a la producción de vino (Chrzan, 2013; Jackson, 2008; Toussaint-Samat, 2009). España es uno de los países más importantes en cuanto a extensión cultivada de uva y la producción de vino, siendo la mayor superficie cultivada y el tercer mayor productor de vino del mundo (Figura 1) (OIV, 2015). Sin embargo, mientras que los productores tradicionales de vino como España, Francia o Italia no han crecido durante los últimos años, otros países emergentes (EEUU, China, Sudáfrica, Chile o Nueva Zelanda) han visto como su producción de vino creció exponencialmente durante

los últimos 5 años (OIV, 2015) (Figura 2). Así pues, el mercado mundial del vino es cada vez más competitivo y cualquier factor diferencial puede decantar la balanza en favor de un tipo de vino u otro.



**Figura 2.** Cultivo de uva a nivel mundial en 2014 (OIV, 2015).

## 2.2. PROCESOS DE VINIFICACIÓN

La calidad y características organolépticas de un vino vienen proporcionadas, en gran medida, por el proceso de vinificación. Así pues, dependiendo de la uva empleada y del tipo de vino deseado las condiciones de vinificación pueden variar. Hay tres procesos claves en el proceso de vinificación: la fermentación, la maceración y el proceso de envejecimiento o crianza.

### 2.2.1. Maceración carbónica

La vinificación por maceración carbónica se ve favorecida por la adaptabilidad de los granos de uva intactos a un medio sin oxígeno, enriquecido con dióxido de carbono. Esta adaptación se refleja inmediatamente dentro de cada

grano de uva, por la transición de una fermentación aerobia a un metabolismo fermentativo anaeróbico (Tesniere & Flanzy, 2011).

El proceso de elaboración de un vino con maceración carbónica es diferente de los demás procesos de vinificación, debido al papel desempeñado por la fermentación propia del grano de uva. Dichos granos, siendo activos biológicamente, pueden gestionar su propia fermentación antes de la acción de los microorganismos exógenos. De este modo, es imprescindible que la integridad anatómica de los granos de uva se preserve en la medida de lo posible. En esto, la maceración carbónica también se diferencia de otras tecnologías, y es que el mecanismo de recolección es un aspecto crucial en el proceso, donde debe evitarse una manipulación brusca. La maceración carbónica puede ser utilizada no sólo en la producción de vinos tintos y vinos jóvenes, sino también en la elaboración de vinos fortificados y vinos espumosos (Tesniere & Flanzy, 2011).

La técnica de elaboración del vino mediante maceración carbónica, se puede dividir en cuatro pasos (Tesniere & Flanzy, 2011):

1. El encubado de racimos de uvas intactos en un tanque cuya atmósfera ya está compuesta principalmente de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).
2. El paso maceración-fermentación, donde una proporción de las uvas se sumergen en la fase acuosa.
3. El escape libre o bombeo del mosto y prensado de las uvas.
4. La segunda etapa de fermentación alcohólica.

### **2.2.2. Procesos de fermentación**

Los diferentes procesos de fermentación producidos en los vinos se llevan a cabo gracias a la acción del metabolismo de las levaduras. Estos organismos vivos se caracterizan por llevar a cabo el proceso de la glicólisis (vía EMBDEN-MEYERHOFF) (Martinez, 2010). La degradación de azúcares por las levaduras, vía glicolítica, comprende todo un conjunto de reacciones que permiten a las células transformar la glucosa en ácido pirúvico, gracias a un importante contenido enzimático celular (Martinez, 2010).

El primer paso es la formación de ésteres de los azúcares glucosa o fructosa, mientras que la última fase de la glicólisis es la formación de piruvato, a partir de 3-fosfoglicerato. En esta fase es donde se producen las diferentes etapas de fermentación del proceso de vinificación (Martinez, 2010):

- La fermentación maloláctica, producida por la acción de bacterias lácticas. Durante este proceso, el ácido málico se transforma debido a la acción de las levaduras, lo que deriva en la pérdida de acidez de los vinos y su consecuente mejora en la estabilización y la sensación gustativa.
- La fermentación alcohólica, que proporciona etanol y CO<sub>2</sub> a partir de las moléculas de azúcar presentes en el mosto. Es importante destacar que dentro de la fermentación alcohólica se puede englobar la llamada fermentación malo-alcohólica. En esta fermentación, el ácido málico se degrada entre un 10% y un 25%, debido a la acción de la levadura (*sacharomyces cerevisiae*).
- La fermentación gliceropirúvica, que permite la obtención de glicerol. Durante la fermentación del mosto, aproximadamente el 8% de las moléculas de azúcar sufren esta fermentación, en lugar de la fermentación alcohólica.
- Finalmente, durante la respiración de la uva, se puede observar un aumento del empleo de azúcar por vía aeróbica. Esto provoca que el ácido pirúvico generado en la glicólisis aerobia sufra una descarboxilación oxidativa, generando principalmente dióxido de carbono.

Tras finalizar la fermentación, después del trasiego, la clarificación y la estabilización del vino, se puede embotellar para un consumo temprano o someterlo a crianza en barrica.

### **2.2.3. Tipos de crianza. Crianza en barrica**

La definición de crianza se aplica a los vinos sometidos a un proceso de envejecimiento de cierta duración, dependiendo del producto deseado, lo que modifica las características organolépticas del vino. Dependiendo de las



condiciones del ambiente y el tipo de recipiente en el que se realiza la crianza, se pueden diferenciar varios tipos de fermentación:

- Crianza oxidativa. Los vinos envejecen durante un periodo de tiempo determinado en condiciones de oxidación, generalmente dentro de envases de madera. Esta crianza corresponde a los vinos meridionales y de carácter mediterráneo.
- Crianza reductora. Los vinos evolucionan en ausencia casi total de aire, aplicando técnicas que impiden la oxidación de los mismos, siendo conservados en depósitos herméticos y más tarde en botellas bien cerradas, donde se desarrollan en un ambiente reductor. Este tipo de crianza responde más bien a vinos septentrionales, y especialmente elaborados a partir de variedades blancas aromáticas.
- Crianza mixta. Se trata de un sistema de envejecimiento que participa de los dos anteriores. Generalmente, primero se realiza un envejecimiento oxidativo en barrica de madera y posteriormente un “terminado” del vino en botella donde los vinos alcanzan su plenitud en condiciones anaerobias.

El proceso de la crianza no es solamente un proceso oxidativo y de disolución, sino algo mucho más complejo, sin olvidar que el objetivo final es obtener un producto con las características organolépticas deseadas. En la crianza en barrica, la composición de la madera de roble juega un papel importante en la crianza del vino, puesto que contiene compuestos extraíbles que le comunican aromas y sabores característicos (Vivas, 2005).

Este estudio, pone claramente de manifiesto que la crianza del vino en barrica es muy compleja, y que en ella intervienen diversos procesos concurrentes, siendo los más importantes (Palomar, 2009):

1. Extracción de compuestos de la madera.
2. Acción microbiológica.
3. Oxidación.
4. Condensación con fenoles.
5. Adsorción en la madera y en los sedimentos.

Estos procesos están directamente ligados a la madera, y tienen lugar de forma mucho más intensa que en el acero inoxidable (Palomar, 2009; Vivas, 2005). La barrica de madera es capaz de ceder al vino no solamente algunos compuestos específicos de la madera, sino también otros que son característicos del proceso fermentativo, así como determinados aromas generados a partir de compuestos precursores (Palomar, 2009).

Otra característica muy importante relacionada con la barrica, es su capacidad de inducir la oxidación de algunos componentes del vino, lo que modifica su perfil sensorial (Oliveira y col., 2011). Esta modificación puede deberse a la aparición de compuestos, tales como feniletanol y aldehídos, y/o a la desaparición o reducción de ciertos alcoholes. La absorción de cantidades significativas de compuestos aromáticos no polares es otra característica muy importante e interesante de la barrica. Por último la disminución del contenido de etanol en el vino mantenido en barrica, corrobora que el color del vino se estabiliza por unión de distintos compuestos fenólicos, generalmente antocianinas y taninos (Oliveira y col., 2011).

### 2.3. EL ALCOHOL Y LA SALUD

Hasta el momento, los efectos cardioprotectores del consumo moderado de vino o alcohol han sido documentados en numerosos estudios realizados en poblaciones tan dispares como Francia, Dinamarca, Yugoslavia, Estados Unidos, China, Nueva Zelanda o Alemania entre otros (Djoussé y col., 2009; Hoffmeister y col., 1999; Schnohr y col., 2002; Veenstra, 1991). En este sentido, la propia Asociación Americana de Cardiología ha llegado a afirmar que los bebedores moderados tienen un riesgo entre un 40% y 50% menor de sufrir cardiopatía isquémica, comparado con sujetos abstemios. Por tanto, existe un notable consenso entre la comunidad científica mundial en cuanto a los efectos beneficiosos del consumo moderado de bebidas alcohólicas sobre la mortalidad global y aquella asociada a accidente cardiovascular en particular (Abramson y col., 2001; Walsh y col., 2002).

Aunque los mecanismos biológicos de esta relación no están claramente dilucidados, una serie de posibles mecanismos apoyan el aparente efecto protector del etanol sobre las enfermedades cardiovasculares. El etanol puede

disminuir la agregación plaquetaria, las tasas de proliferación y migración del músculo liso vascular, además de la inflamación y la participación de los monocitos y los linfocitos T (Abramson y col., 2001; Albert y col., 1999). Otros posibles mecanismos que contribuyen al efecto cardioprotector del consumo moderado de alcohol incluyen los cambios en la función plaquetaria, la coagulación y los mecanismos fibrinolíticos produciendo un descenso en la trombogénesis (De Gaetano y col., 2003; Renaud y col., 1992; Wang y col., 1999).

El etanol parece afectar a varios factores que intervienen en el mantenimiento del equilibrio entre la formación y la disolución del coágulo sanguíneo. De esta manera, protege contra procesos hemorrágicos y contra la formación de coágulos sanguíneos en las arterias, implicados como factores de riesgo de infarto de miocardio (Rimm y col., 1999). Además de las cualidades ya mencionadas, el consumo de etanol se ha asociado con la reducción de la agregación plaquetaria (Klatsky, 1996; Klatsky, 1996; Renaud & Ruf, 1996), un aumento de los niveles de activador tisular del plasminógeno (tPA) y niveles más bajos de fibrinógeno y antitrombina III (Ridker y col., 1994). Se ha demostrado que el alcohol aumenta la secreción del activador del t-PA por las células endoteliales, y que existe una relación directa entre el consumo de alcohol y la concentración plasmática del t-PA antigénico, aún después de controlar otros factores de riesgo cardiovascular, incluyendo el colesterol HDL (Laug, 1983). Esto apoya la hipótesis de que la alteración de la actividad fibrinolítica podría contribuir a la protección contra la enfermedad coronaria, mediada por el efecto sistémico del etanol (Rayo Llerena & Marín Huerta, 1998).

Por otro lado, la disminución de la agregación plaquetaria retrasaría la coagulación sanguínea y en definitiva la formación del trombo que obstruiría la arteria. Así pues, los efectos favorables del consumo moderado y regular de etanol podrían residir en estas dos acciones, dado que ambos procesos (formación de la placa de aterosclerosis y del coágulo sanguíneo) son los que, en definitiva, conducen a la manifestación clínica de la enfermedad cardiovascular (Rayo Llerena & Marín Huerta, 1998).

El consumo de alcohol también modifica la distribución de lipoproteínas de forma multifactorial. La ingesta de alcohol está asociada a una menor actividad de la proteína transferidora de colesterol esterificado (CETP) (Hannuksela y col.,

1996; Serdyuk y col., 2000) y a la estimulación de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) en los seres humanos (Belfrage y col., 1977; Taskinen y col., 1987). El alcohol puede actuar también indirectamente a través del aumento de adiponectina tras una ingesta moderada, y que a su vez puede aumentar la actividad de la LPL (Fernández-Mar y col., 2012; Toth, 2005; Von Eynatten y col., 2004).

El efecto más conocido del alcohol sobre las lipoproteínas plasmáticas es el aumento de los niveles circulantes de lipoproteínas de alta densidad (HDL colesterol) (Gaziano y col., 1993; Linn y col., 1993). En los estudios epidemiológicos que valoran el consumo total de alcohol y las tasas más bajas de enfermedad coronaria en los que se dispone de medidas del colesterol HDL, se estima que al menos la mitad del efecto beneficioso del alcohol es debido a su efecto sobre el colesterol HDL (Langer y col., 1992; Suh y col., 1992). Algunos estudios muestran un incremento de HDL del 5%, asociado al consumo de una bebida alcohólica diaria; y de un 10% con un consumo de entre dos y tres bebidas al día (Greenfield y col., 2005; Mukamal y col., 2005; Mukamal y col., 2007).

Finalmente, Boban & Modun (2010) describieron un incremento de ácido úrico tras el consumo de etanol y glicerol, lo cual coincide con resultados previos (Thieden, 1969), indicando que los nucleótidos de adenina se metabolizan hasta ácido úrico. El urato es un potente antioxidante, y ha sido encontrado tras la ingesta de vino tinto y de etanol y relacionado con un incremento en la actividad antioxidante en plasma (De La Torre y col., 2006; Miro-Casas y col., 2003). Por tanto el incremento en la actividad antioxidante del plasma debido al ácido úrico podría ser una parte importante de los efectos beneficiosos que se atribuyen a la ingesta de etanol.

#### 2.4. EL VINO Y LA SALUD

Como se acaba de mencionar, existen efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular derivados del consumo de alcohol de forma moderada. Sin embargo, otros estudios demuestran que los bebedores de vino, y más concretamente de vino tinto, obtienen un beneficio adicional atribuido a la presencia de compuestos bioactivos (Klatsky y col., 2003; Pearson, 1996; Pearson, 1997).

Se han propuesto tres mecanismos para explicar la menor incidencia de enfermedad cardiovascular en los consumidores regulares de vino. Dos de ellos se deben principalmente al etanol (anteriormente comentados), mientras que el tercer mecanismo estaría mediado por la capacidad de los componentes antioxidantes del vino de proteger de la oxidación las partículas de lipoproteínas de baja densidad, de acuerdo con la hipótesis oxidativa de la aterogénesis (Leighton F, 1999).

Además, el vino participa en el mantenimiento de la función endotelial, desempeñando un papel clave en la regulación del tono vascular y la reactividad. La preservación de la función endotelial es un requisito indispensable para mantener la salud cardiovascular, y más en particular para evitar la aterosclerosis. El óxido nítrico (NO) es el principal mediador de la relajación vascular, en un proceso muy sensible a la presencia de radicales libres. Estudios recientes muestran que los polifenoles del vino mejoran la respuesta endotelial mediada por NO (Andriambeloson y col., 1997; Leighton y col., 2006).

Otros estudios, indican que el vino tinto mejora la función y la expresión de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) en un proceso dependiente de los compuestos antioxidantes, con marcadas diferencias de actividad entre ellos. Los antioxidantes son necesarios no sólo para la protección del NO, sino también porque protegen de la oxidación a la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), un cofactor de eNOS cuya oxidación conduce a su disociación y a la producción del anión superóxido (Martin y col., 2002; Wallerath y col., 2002; Wallerath y col., 2005). Además, los compuestos fenólicos del vino tinto mejoran la función endotelial a través de la inhibición de la secreción de endotelina 1, un agente vasoconstrictor (Agewall y col., 2000). De hecho, estudios recientes relacionan el consumo de vino con la vasodilatación y el aumento de flujo sanguíneo (Agewall y col., 2000).

La adhesión de las plaquetas al endotelio dañado y la posterior agregación plaquetaria son las principales medidas en los procesos trombóticos y aterogénicos. Los compuestos fenólicos interfieren con el metabolismo del ácido araquidónico, produciendo una inhibición de la agregación plaquetaria y reduciendo la síntesis de mediadores trombóticos y proinflamatorios (Freedman y col., 2001; Pace-Asciak y col., 1996; Polette y col., 1996). Los polifenoles también pueden regular la expresión de moléculas adhesivas y del factor de actividad

tisular resultando en la modulación funcional de las interacciones procoagulantes y actividades entre células (Rotondo y col., 1998).

Varios estudios han evaluado la posibilidad de que el consumo de etanol en forma de vino podría tener un efecto añadido sobre la función plaquetaria respecto a la ejercida por el etanol. Estudios previos han demostrado un efecto inhibitor del vino tinto sobre la agregación plaquetaria, tanto en ensayos *in vivo* como en ensayos *in vitro*. Sin embargo, otros estudios sobre la actividad antiplaquetaria de los polifenoles del vino (Kawashima, 2004; Pace-Asciak y col., 1995), no parecen conferir un beneficio significativo por encima del ofrecido por el alcohol en sí.

Rimm y col. (1999) demostraron la relación dosis-dependiente entre el consumo de etanol y los niveles plasmáticos de HDL. El colesterol HDL activa la eNOS (Gong y col., 2003) y, tal como se ha comentado anteriormente, es estrictamente dependiente de la presencia de antioxidantes, que impiden la inactivación de NO (Mineo y col., 2006). Aunque el etanol puede contribuir al efecto cardioprotector por el incremento de las HDL y el descenso de los niveles de fibrinógeno y de la reactividad plaquetaria (Pellegrini y col., 1996; Wollny y col., 1999), varios estudios recientes sugieren también un papel clave de los componentes fenólicos del vino. De hecho, el consumo de alcohol en forma de vino tinto potenciaría la función protectora de las HDL, por su contenido en compuestos fenólicos (Avellone y col., 2006; Dell'Agli y col., 2004; Estruch y col., 2004; Stoclet y col., 2004).

De la misma manera, en un estudio realizado por Estruch y col. (2004), se ha comprobado que tras el consumo de vino o de ginebra se reducían los niveles sanguíneos de marcadores sanguíneos de inflamación, como la proteína C reactiva, el fibrinógeno y la interleuquina $1\alpha$ , indicando que este efecto es debido al contenido de etanol en ambas bebidas. No obstante, sólo tras el consumo de vino apreciaron una reducción significativa de las moléculas de adhesión monocitarias y endoteliales, por lo que este mayor efecto anti-inflamatorio del vino debería atribuirse a los componentes no alcohólicos del vino.

En este mismo sentido, un estudio realizado por Badía y col. (2004) analizó la capacidad de adhesión al endotelio de monocitos en humanos tras el consumo de 30 g de alcohol al día en forma de vino o de ginebra durante un mes. El

consumo de vino redujo significativamente la adhesión de los monocitos en comparación con el consumo de ginebra, lo que retrasa de manera mucho más significativa el inicio y la progresión de la arteriosclerosis.

Por lo tanto, queda patente el efecto beneficioso de la ingesta de vino de tinto. La capacidad antioxidante demostrada por el vino, amén de sus efectos vasodilatadores y anticancerogénicos, destaca su ingesta como un factor clave dentro de un estilo de vida saludable, sobre todo enmarcada dentro de la Dieta Mediterránea.

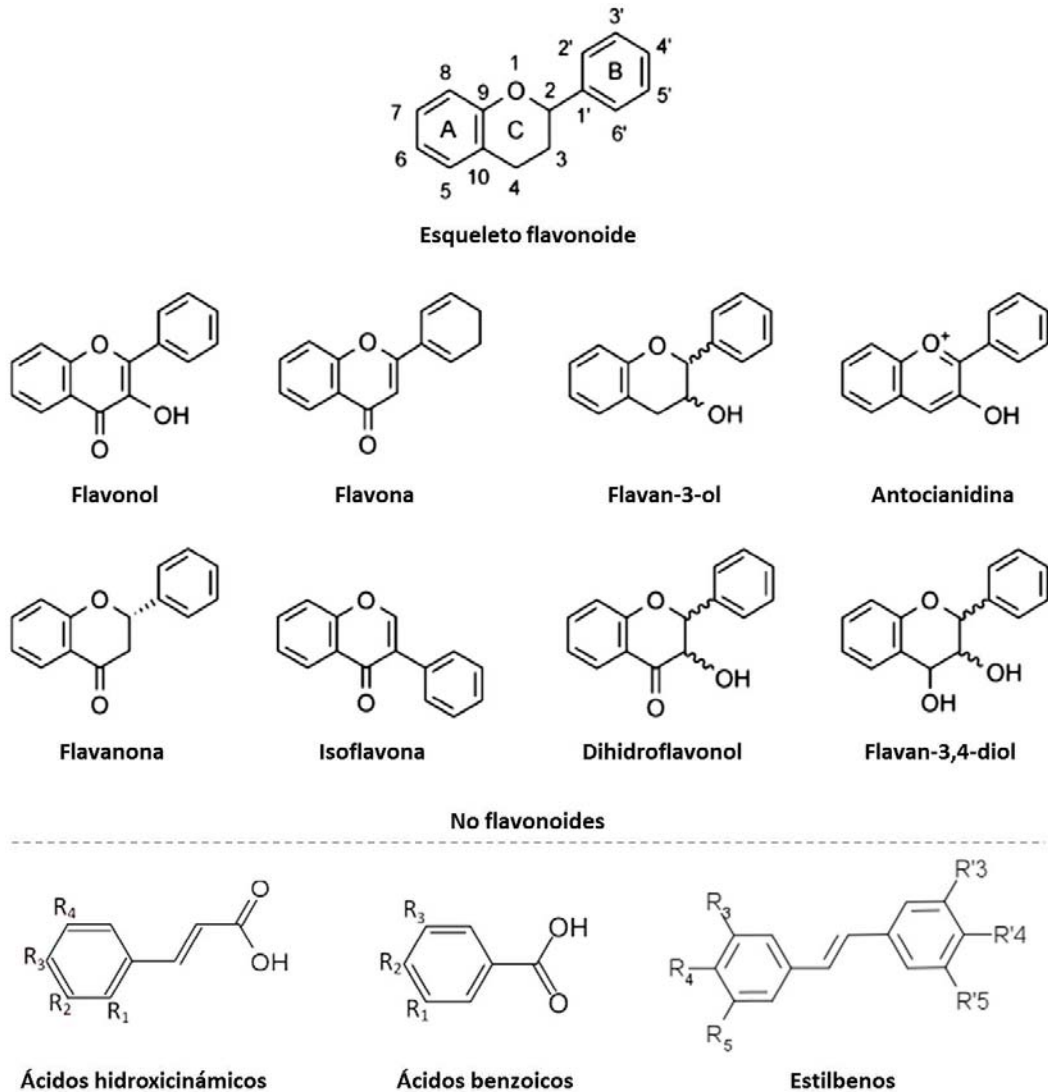
### 3. COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL VINO

#### 3.1. POLIFENOLES

Los polifenoles se caracterizan por tener un fenol (anillo bencénico con, al menos, un sustituyente hidroxilo) en su composición. Aunque los polifenoles se encuentran en todos los órganos de las plantas, cada especie tiene una composición fenólica determinada, la cual puede estar condicionada por factores agronómicos y ambientales (Smoliga y col., 2011). En la uva, los polifenoles se encuentran principalmente en las partes sólidas de la uva (hollejos, pepitas o raspones), mientras que la pulpa es menos rica en estos compuestos (Basli y col., 2012).

Los polifenoles varían desde compuestos relativamente sencillos, producidos por las vides, hasta compuestos complejos formados por interacciones físico-químicas durante la elaboración y crianza del vino tinto. La naturaleza química de los compuestos fenólicos es muy heterogénea, englobando desde estructuras libres de unidades monoméricas a estructuras conjugadas, derivadas de la unión con otros compuestos de similar o distinta naturaleza (Gris y col., 2011). Los polifenoles pueden ser clasificados siguiendo varios criterios, la clasificación más común y empleada se basa en la estructura de su esqueleto carbonado, dividiéndose en flavonoides y no-flavonoides, ambos grupos de gran importancia enológica (Dell'Agli y col., 2004). Los flavonoides de importancia enológica comprenden principalmente: flavonoles, antocianos y taninos, mientras

que en el segundo grupo de estructura fenólica no-flavonoidea se incluyen ácidos hidroxicinámicos, ácidos benzoicos y estilbenos (Murtaza y col., 2013). Sin embargo, otros polifenoles también se pueden encontrar en la matriz del vino, los cuales se muestran en la Figura 3.



**Figura 3.** Principales familias de polifenoles. Adaptado de Crozier y col. (2009)

Durante los últimos años, se los relaciona con los efectos beneficiosos sobre la salud humana, vinculados al consumo moderado de vino tinto (Basli y col., 2012; Murtaza y col., 2013; Pérez-Mañá y col., 2015; Renaud & De Lorgeril, 1992;



Visioli & Davalos, 2011). Entre otras, se les han atribuido propiedades antioxidantes (Mulero y col., 2011), antiinflamatorias (Bertelli & Das, 2009), anticancerígenas (Artero y col., 2015; Damianaki y col., 2000; Kampa y col., 2000), neuroprotectoras (Basli y col., 2012) (debido a la capacidad de los antocianos de traspasar la barrera hematoencefálica (Schaffer & Halliwell, 2012)) y cardioprotectoras (Bertelli & Das, 2009; Dudley y col., 2008), gracias a su capacidad antiinflamatoria, vasodilatadora y para reducir la aterogénesis.

El vino tinto contiene mayor cantidad y variedad de compuestos fenólicos que el mosto del que proviene, llegando a contener entre 1.000 y 4.000 mg L<sup>-1</sup> de los distintos tipos de polifenoles (Basli y col., 2012). Esta característica se ha relacionado con el aumento de la actividad antioxidante, debido al aumento del contenido fenólico producido tras el proceso de maceración y envejecimiento de los vinos (Marín, 2003). De manera que a mayor concentración de fenoles totales, mayor es la capacidad antioxidante de los vinos tintos (Mulero y col., 2011).

Principalmente, la capacidad antioxidante de los vinos tintos ha sido tradicionalmente relacionada con su contenido en flavanoles (Teissedre y col., 1996), antocianos (Ghiselli y col., 1998) y ácido tartárico (Larrauri y col., 1999). Sin embargo, la concentración de polifenoles totales es más importante a la hora de valorar la actividad antioxidante de un vino (Frankel y col., 1995). La capacidad antioxidante *in vitro* de los polifenoles es incluso más alta que algunas vitaminas antioxidantes ampliamente estudiadas, como la vitamina E y la vitamina C (Muíño y col., 2014). Finalmente, los polifenoles tienen incluso la capacidad de reducir la catalización por metales, en la formación de radicales libres, siendo capaces de quelar metales como el hierro y el cobre (Yang y col., 2001).

Sin embargo, la literatura muestra una biodisponibilidad muy baja en relación al consumo de polifenoles (Bouayed y col., 2012; Bouayed y col., 2011; Tagliacucchi y col., 2010). Por tanto, pese a la capacidad antioxidante de los polifenoles y la importancia de estos compuestos en la matriz del vino, su escasa absorción parece ser un factor limitante a la hora de considerar la ingesta de polifenoles como el factor clave en los efectos beneficiosos derivados de la ingesta de vino tinto.

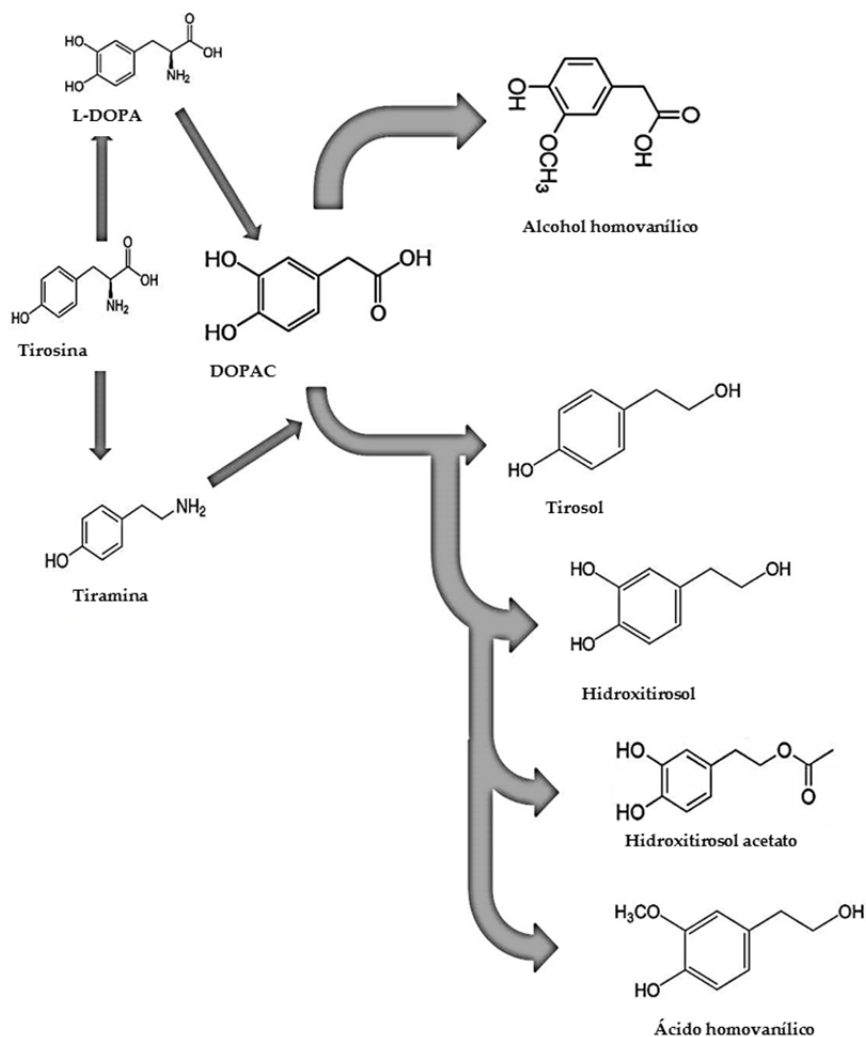
### 3.2. HIDROXITIRO SOL Y SUS METABOLITOS

El hidroxitirosol (OHTyr) es también conocido como 2-(3,4-dihidroxifenil)-etanol (3,4-DHPEA) y como DOPET (Figura 4). Se encuentra principalmente en el aceite de oliva, como derivados secoiridoides o como acetato y en forma libre (Mateos y col., 2001). Tanto el OHTyr como sus derivados surgen de la oleuropeína (éster de OHTyr y ácido elenólico), presente en la olivas durante la extracción del aceite de oliva (Fernández-Mar y col., 2012).

Sin embargo, el vino ha demostrado ser otra importante fuente de OHTyr en nuestra dieta. El OHTyr fue hallado por primera vez en vinos italianos por Di Tommaso y col. (1998), y posteriormente en otros vinos griegos e italianos (Boselli y col., 2006; Dudley y col., 2008; Proestos y col., 2005). Algunos autores describen una mayor concentración en los vinos tintos (3.66-4.20 mg L<sup>-1</sup>) que en los blancos (1.72-1.92 mg L<sup>-1</sup>) (Fernández-Mar y col., 2012; Minuti y col., 2006). Finalmente, Minuti y col. (2006) obtuvieron concentraciones de OHTyr entre 1.8 y 3.1 mg L<sup>-1</sup> en vino tinto. Se estima que la formación de OHTyr en la matriz del vino se produce a partir de tirosol, durante la fermentación alcohólica. Así pues, la literatura científica evidencia que el vino es una fuente importante de OHTyr en la dieta, junto al aceite de oliva (Fernández-Mar y col., 2012).

Diversos estudios han profundizado en los efectos beneficiosos del OHTyr, principalmente en la matriz de aceite de oliva (ya que es la mayor fuente de OHTyr en la dieta), incluyendo: capacidad antioxidante, efecto cardioprotector, actividad anticancerígena, antimicrobiana, neuroprotectora y antidiabética (Fernández-Mar y col., 2012). Numerosos autores han probado su capacidad tanto para quelar compuestos oxidantes (Cornwell & Ma, 2008; Goya y col., 2007), como para aumentar la concentración de enzimas antioxidantes (Goya y col., 2007; Martín y col., 2010; Oliveras-López y col., 2008).

Las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, también podrían mejorar mediante la ingesta de OHTyr (Bazoti y col., 2006; González-Correa y col., 2008). El OHTyr tiene la capacidad de traspasar la barrera hematoencefálica, de manera que puede acceder al encéfalo y ser rápidamente metabolizado, actuando donde los radicales se formen (Fernández-Mar y col., 2012).



**Figura 4.** Vías de formación de hidroxitirosol y sus metabolitos.

En cuanto a la biodisponibilidad de OHTyr en la matriz del vino, estudios recientes compararon su farmacocinética, después de la ingesta de dosis moderadas de vino y aceite de oliva en voluntarios sanos (De La Torre y col., 2006; Pérez-Mañá y col., 2015). Se observó que la ingestión diaria de 250 mL de vino, conduce a concentraciones en plasma de alrededor de  $8 \text{ ng mL}^{-1}$  de OHTyr. Del mismo modo, los resultados mostraron una mayor recuperación urinaria de OHTyr después de la administración de vino tinto, a pesar de las diferencias de las dosis administradas (0.35 mg en vino tinto y 1.7 mg en aceite de oliva). Estos autores plantearon la hipótesis de la interacción entre el etanol y la dopamina,

después de la ingestión de vino tinto, que se traduce en un aumento en la formación endógena de OHTyr, hecho que fue corroborado posteriormente (Schröder y col., 2009).

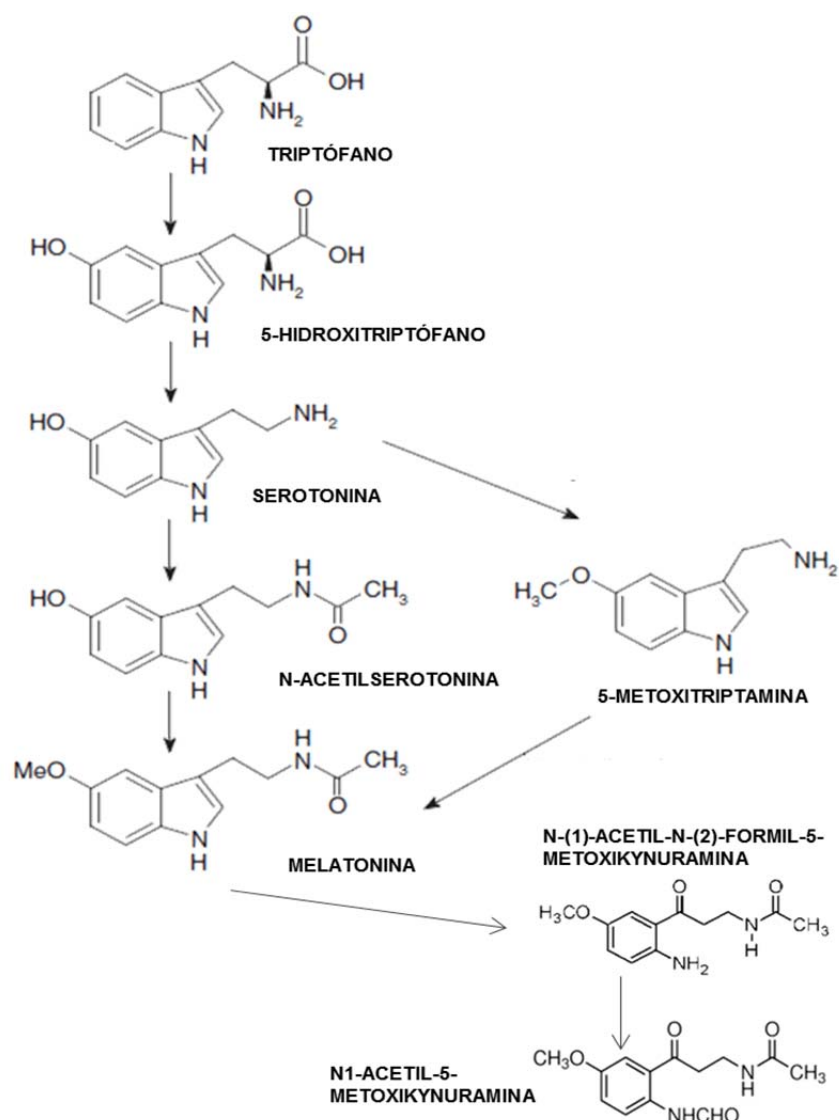
### 3.3. MELATONINA

La melatonina (MEL) es una neurohormona (N-acetil-5-metoxitiramina) propia de la glándula pineal, también producida como metabolito secundario en plantas (Figura 5). Se ha demostrado que la síntesis de MEL se produce a partir de triptófano, 5-hidroxitriptófano, serotonina y N-acetilserotonina en última instancia. Por otra parte, la molécula de MEL también puede ser formada por O-metilación de la serotonina seguido por N-acetilación de la 5-metoxitriptamina en levaduras (Hardeland & Pandi-Perumal, 2005; Sprenger y col., 1999).

La MEL ha sido descrita en semillas tales como el arroz y el maíz dulce, raíces, hojas y frutos de una considerable variedad de plantas. De hecho, está presente en fresas, kiwis, piñas, plátanos y manzanas (Fernández-Mar y col., 2012). Asimismo se ha descrito la presencia de MEL en el aceite de oliva, especialmente en el aceite de oliva virgen extra, y en el aceite girasol (De la Puerta y col., 2007). Además, se ha descrito recientemente la presencia de MEL en uvas y vinos. Iriti y col. (2004) detectaron diversas cantidades de MEL en diferentes variedades de uvas, como: Nebbiolo, Croatina, Sangiovese, Merlot, Marzemino, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon y Barbera. Estos autores, describieron concentraciones desde 0.005 ng g<sup>-1</sup> hasta 0.9 ng g<sup>-1</sup>. Igualmente, Mercolini y col. (2008) también observaron la presencia de MEL en vino (0.4-0.5 ng mL<sup>-1</sup>). Recientemente, la MEL se ha encontrado en concentraciones aún mayores (245-423 ng mL<sup>-1</sup>), en diez vinos monovarietales: Cabernet Sauvignon, Petit Verdot, Prieto Picudo, Syrah, Tempranillo (Rodríguez-Naranjo y col., 2011). La MEL y sus isómeros, a pesar de no estar presentes en mostos de uva, sí se detectaron en diferentes vinos terminados. Finalmente, algunos procesos de vinificación experimentales revelaron que la MEL se forma después de la inoculación con levaduras, siendo crucial el papel de *Saccharomyces cerevisiae* (Rodríguez-Naranjo y col., 2011; Rodríguez-Naranjo y col., 2011).

La MEL puede ejercer diversos efectos beneficiosos para la salud, demostrando acción antioxidante, anticancerígena, inmunomoduladora y

neuroprotectora (Fernández-Mar y col., 2012). Por otra parte, las actividades biológicas de los metabolitos de MEL más importantes, N-1-acetil-N-2-formil-5-metoxikynuramina (AFMK) y N-1-acetil-5-metoxikynuramina (AMK), también han sido estudiadas. AFMK es un potente antioxidante, que proporciona protección al ADN y a los lípidos a través de distintas rutas metabólicas. Por otro lado, AMK es también un potente antioxidante y es capaz de inhibir la biosíntesis de prostaglandinas uniéndose a los receptores de diazepam (Guenther y col., 2005; Schaefer & Hardeland, 2009; Than y col., 2006).



**Figura 5.** Vías de formación de la melatonina y sus metabolitos. Adaptado de Rodríguez-Naranjo y col. (2011)

Al igual que otros metabolitos secundarios, la MEL puede estimular enzimas antioxidantes endógenas y/o captar radicales libres (actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo*) (Hardeland & Pandi-Perumal, 2005; Reiter, 2003; Reiter y col., 2005). Esta neurohormona es capaz de captar especies de oxígeno reactivo, tales como peroxinitrito (Hardeland & Pandi-Perumal, 2005); e incluso peróxido de hidrógeno de forma dosis-dependiente (Than y col., 2006), además de demostrar capacidad antioxidante *in vitro* mediante el método ABTS<sup>+</sup> (Herraiz & Galisteo, 2004).

Estudios *in vivo*, también han demostrado su efecto antioxidante. Cuando se administró en ratones, se observó que la MEL fue capaz de reducir el estrés oxidativo crónico relacionado con el envejecimiento (Nogués y col., 2006), y que incluso podría reducir la presión arterial en hombres con hipertensión crónica (Scheer y col., 2004).

El papel de la MEL como agente neuroprotector también es relevante. Ha sido probada con éxito en trastornos del sueño, ayudando a restaurar el ritmo circadiano, y es especialmente eficaz en pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Srinivasan y col., 2005). Se han realizado diversos ensayos con el objetivo de mitigar las consecuencias de enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson, la enfermedad de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica, obteniendo resultados satisfactorios (Fernández-Mar y col., 2012). Finalmente, la MEL también ha conseguido inhibir el proceso de fibrinogénesis de forma significativa (Hardeland y col., 2006; Srinivasan y col., 2005).

El carácter anfipático de la molécula le permite traspasar barreras fisiológicas, de ahí que se describa su presencia en el núcleo del citosol, en las mitocondrias y en distintas membranas biológicas (Karbownik y col., 2001). La importancia de este hecho reside en que la molécula puede actuar en los lugares donde se forman los radicales libres, proporcionando las defensas antioxidantes allí donde se necesitan, al igual que anteriormente se describió para el OHTyr.

#### 4. MARCADORES VASCULARES Y DE INFLAMACIÓN EN EL SER HUMANO

Los eicosanoides constituyen una familia de metabolitos lipídicos, derivados de los ácidos grasos de 20 carbonos. Los prostanooides son quizás la clase más conocida de eicosanoides (Figura 6), incluyendo compuestos como las prostaglandinas (PGs) o los tromboxanos (TXs) (Funk, 2001; Smith, 1989). Las PGs pueden ser formadas por la mayoría de las células del organismo, actuando como mediadores lipídicos autocrinos y paracrinos. No se almacenan, sino que se sintetizan *de novo* a partir del ácido araquidónico (AA) de las membranas celulares, liberado cuando las células se activan por trauma mecánico, por alguna citoquina específica o por factor de crecimiento, entre otros (Zhou y col., 2007). El AA se encuentra regulado enzimáticamente, manteniéndose esterificado hasta que es movilizado por las fosfolipasas (PLA<sub>2</sub>, principalmente). Si bien, durante los últimos años se han descubierto numerosos nuevos receptores de PLA<sub>2</sub> (Six & Dennis, 2000). A pesar de esto, la fosfolipasa citosólica PLA<sub>2</sub> tipo IV (cPLA<sub>2</sub>) sigue considerándose clave en la producción de eicosanoides (Evans y col., 2001).

La elevación intracelular de AA mediante la acción de la cPLA<sub>2</sub> permite la biosíntesis de eicosanoides en el retículo endoplasmático y en la membrana nuclear. Este AA liberado por la cPLA<sub>2</sub> es captado por las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2. Estas enzimas actúan primero como ciclooxigenasas, dando como resultado la síntesis de PGG<sub>2</sub> y luego como peroxidasas para reducir el peróxido de PGG<sub>2</sub> a un alcohol, resultando la formación de PGH<sub>2</sub> (Smith, 1989; Smith y col., 2000; Smith y col., 2011).

Tanto PGG<sub>2</sub> como PGH<sub>2</sub> están consideradas moléculas transitorias, y su producción constituye un paso crucial en la biosíntesis de PGs (Figura 6). La prostaciclina sintasa transforma PGH<sub>2</sub> hasta PGI<sub>2</sub> hematopoyético, mientras que la enzima PGD<sub>2</sub> sintasa convierte PGH<sub>2</sub> a PGD<sub>2</sub>. Las sintasa de membrana y la sintasa citosólica son capaces de convertir PGH<sub>2</sub> hasta PGE<sub>2</sub>. A su vez, la PGF<sub>2α</sub> se puede sintetizar a través de un número de diferentes vías (Basu, 2010; Smith y col., 2011).

A diferencia de las PGs, los leucotrienos se forman predominantemente en las células inflamatorias, como los leucocitos polimorfonucleares, macrófagos o

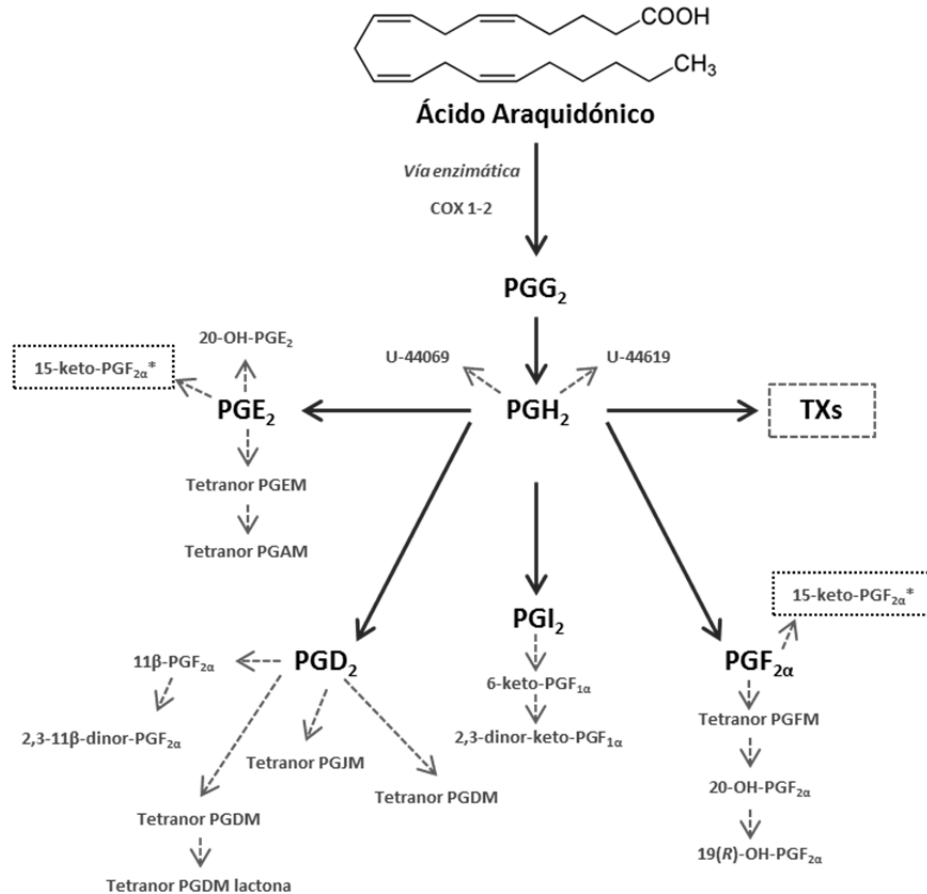
mastocitos. La activación celular provoca la acción de diversas enzimas, como la cPLA<sub>2</sub> y la 5-lipoxigenasa (5-LO). La 5-LO es la enzima clave para la formación de TXs, situándose en el núcleo y el citosol de las células (Peters-Golden & Brock, 2001). La 5-LO tiene capacidad para unir iones calcio y hierro, similar al funcionamiento de otras enzimas como cPLA<sub>2</sub> y la proteína quinasa C (Chen & Funk, 2001; Hammarberg y col., 2000). La formación de TXs también puede provenir de la ruta de formación de las PGs, de este modo la enzima TXA<sub>2</sub> sintasa (TXAs) convierte PGH<sub>2</sub> en TXA<sub>2</sub> (Basu, 2010; Smith y col., 2011) (Figura 6).

Los avances en el campo de las PGs, se deben en gran parte a los trabajos realizados en ratones a finales del siglo pasado, y principios de este (Austin & Funk, 1999; Green & Pavord, 2001; Narumiya & FitzGerald, 2001). Las áreas en las que los eicosanoides han demostrado tener más importancia son: el dolor, la fiebre y la inflamación, actuando principalmente sobre el sistema nervioso central (SNC), el sistema cardiovascular, el respiratorio, el reproductivo o el renal.

Una de las funciones primordiales de la PGs es su relación con el sistema cardiovascular. El papel de los prostanoides en la disfunción cardiaca sigue siendo controvertido; sin embargo, los prostanoides parecen ser terapéuticamente útiles en diversas enfermedades cardiovasculares, como arritmias, infartos de miocardio, ciertos tipos de anginas de pecho y aterosclerosis, entre otras. A su vez, la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y las PGs, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y D<sub>2</sub> están consideradas beneficiosas, jugando un papel relevante en la inhibición de la progresión del trombo y en la vasodilatación coronaria. Por otro lado, el TXA<sub>2</sub> y la PGF<sub>2α</sub> se consideran nocivos por su actividad vasoconstrictora, por lo que su inhibición puede resultar beneficiosa (Beamish y col., 1985; Chan & Cervoni, 1986).

En este sentido, ciertas PGs actúan en el músculo liso vascular. De hecho, PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>, son moléculas vasodilatadoras, mientras que TXA<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> actúan produciendo vasoconstricción, principalmente en el musculo liso vascular. De igual manera, las PGs afectan al sistema respiratorio relajando el músculo liso de las vías aéreas por acción de la PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>, y contrayéndolo por la acción de TXA<sub>2</sub> y de PGF<sub>2α</sub> (Miller, 2006).





**Figura 6.** Esquema de la formación y relación metabólica de las distintas familias de prostaglandinas y de los tromboxanos.

Así pues, 11-dehidro-TXB<sub>2</sub>, derivado del TXA<sub>2</sub>, produce liberación plaquetaria y es un potente vasoconstrictor (Catella y col., 1986). En este sentido, el tetranor PGEM, es el metabolito de síntesis de la PGE<sub>1</sub> y la PGE<sub>2</sub>, PGs con acciones vasodilatadoras, activadoras de procesos inflamatorios y moduladoras de la respuesta inmune (Honda y col., 1980). Igualmente, la PGI<sub>2</sub>, sintetizada en el endotelio vascular y en el cortex renal, posee efecto vasodilatador y antiagregante plaquetario, efectos muy similares a los de la PGD<sub>2</sub> (Funk, 2001).

Por otra parte, las PGs primarias tienen una vida media corta, metabolizándose y excretándose rápidamente. Así pues, la tetranor PGFM puede ser cuantificado en orina como metabolito mayoritario de PGF<sub>2α</sub>, que ejerce

acciones vasoconstrictoras en los bronquios, útero, venas y tracto gastrointestinal, entre otros (Funk, 2001; Medina y col., 2012).

Otro de los aspectos clave de los prostanoides es su acción en la agregación plaquetaria, condicionada por la concentración de PGs. La PGI<sub>2</sub> es antiagregante y vasodilatadora, mientras que el TXA<sub>2</sub> es un potente agregante plaquetario y vasoconstrictor (Demers, 1984).

Los efectos de las PGs en el sistema nervioso central (SNC) son todavía poco conocidos. Sin embargo, diversos estudios demuestran la presencia de prostanoides en ciertas enfermedades relacionadas con el SNC. La PG más común en el SNC es la PGE<sub>2</sub>, producida a nivel neuronal y con un papel relevante en la generación de fiebre e hiperalgesia y coadyuvante en la adquisición de la memoria (Rall y col., 2003). Además, está relacionada con el transcurso de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Bazan y col., 2002; Teismann & Ferger, 2001).

Finalmente, ciertas PGs también tienen funciones descritas dentro del sistema reproductivo, específicamente en el útero. Procesos como la menstruación, luteólisis o el inicio del parto, están condicionados por la participación de la PGF<sub>2α</sub>, y en menor medida por la PGE<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub> (Sales & Jabbour, 2003). En el hombre también se encuentran funciones para las PGs. Por ejemplo, la PGE<sub>2</sub> tiene un papel importante en la erección, eyaculación y transporte del espermatozoide. Otro punto de interés es el sistema renal. Tanto la PGE<sub>2</sub> como la PGI<sub>2</sub> regulan el flujo sanguíneo renal, produciendo diuresis y natriuresis (Spector y col., 1974).

En resumen, las funciones de las PGs se pueden agrupar en cinco puntos (Bazan y col., 2002; Beamish y col., 1985; Catella y col., 1986; Chan & Cervoni, 1986; Demers, 1984; Honda y col., 1980; Miller, 2006; Rall y col., 2003; Sales & Jabbour, 2003; Spector y col., 1974; Teismann & Ferger, 2001):

1. Intervienen en la respuesta inflamatoria: produciendo vasodilatación, y el aumento de la permeabilidad de los tejidos permitiendo el paso de los leucocitos, tienen efecto antiagregante plaquetario o estimulador de las terminaciones nerviosas del dolor.

2. Aumentan la secreción de mucus gástrico, y disminuyen la secreción de ácido gástrico.
3. Provocan la contracción de la musculatura lisa, especialmente importante en el útero. Del mismo modo, son liberadas durante la menstruación, para favorecer el desprendimiento del endometrio.
4. Intervienen en la regulación de la temperatura corporal.
5. Controlan el descenso de la presión arterial.

## 5. MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

### 5.1. CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre antioxidantes y prooxidantes (radicales libres y otras especies reactivas), con aumento de los niveles de prooxidantes que conducen a un daño oxidativo potencial (Halliwell B, 2007). Este desequilibrio puede ser consecuencia del agotamiento de antioxidantes endógenos, de una escasa ingesta de antioxidantes exógenos, o por aumento de la formación de radicales libres (Scalbert y col., 2005).

El daño oxidativo al ADN, a las proteínas y a los lípidos en última instancia, puede conducir a disfunción o destrucción de membranas, enzimas y proteínas (Leopoldini y col., 2011). Específicamente, la peroxidación lipídica de los lípidos de membrana puede provocar un deterioro de la función de la misma, la disminución de su fluidez, la inactivación de receptores y enzimas de membrana, aumento de la permeabilidad a los iones y su posible ruptura (Kadiiska y col., 2005).

Los dobles enlaces son más fácilmente oxidables que los enlaces simples; de este modo, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son particularmente susceptibles a la peroxidación (Funk, 2001; Kadiiska y col., 2005; Medina y col., 2012; Medina y col., 2012; Morrow y col.). Una vez que se inicia el proceso de peroxidación, se desencadena una reacción en cadena, seguida de las fases de propagación y de terminación (Morrow y col., 1994).

La iniciación de la peroxidación lipídica es causada por el ataque de cualquier especie que tenga suficiente reactividad para abstraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno (Gutteridge & Halliwell, 1990). Un átomo de hidrógeno es, en principio, un radical libre con un solo electrón no apareado, y su eliminación deja un electrón no apareado en el átomo de carbono al que estaba asociado originalmente. El radical formado se estabiliza mediante un reordenamiento molecular, reaccionando con oxígeno para dar lugar a un radical peroxilo. Estos radicales son capaces de captar un átomo de hidrógeno a partir de otro ácido graso adyacente, para formar un hidroperóxido lipídico. Incluso se pueden combinar entre sí o atacar proteínas de membrana. Cuando los radicales peroxilo reaccionan con un átomo de hidrógeno de un ácido graso, el nuevo radical puede reaccionar con el oxígeno para formar otro radical peroxilo. De este modo se produce la propagación del daño oxidativo, generando nuevos hidroperóxidos y aumentando la intensidad de la lesión (Gutteridge & Halliwell, 1990).

## 5.2. MARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HUMANOS A NIVEL SISTÉMICO. ISOPROSTANOS

Los Isoprostanos (IsoPs) son estereoisómeros de las PGs (Figura 7). Se generan mediante la oxidación no enzimática del ácido araquidónico, siendo descubiertos hace veinte años por Morrow y col. (1992). Se forman a partir del AA esterificado en los fosfolípidos, liberándose en forma libre en la circulación, presumiblemente gracias a la acción de las fosfolipasas (Morrow y col., 1992). La forma libre representa sólo una pequeña parte del total de F<sub>2</sub>-IsoPs *in vivo*, por ello es necesario una hidrólisis antes de su análisis, liberando los compuestos esterificados (Medina y col., 2012). Mediante la cuantificación de F<sub>2</sub>-IsoPs es posible averiguar la localización de la lesión oxidativa ocasionada por las diferentes enfermedades; además de determinar si algunos tejidos son más propensos a la oxidación que otros bajo ciertas condiciones patológicas específicas (Morrow y col., 1994).

Los F<sub>2</sub>-IsoPs son metabolizados y excretados en orina rápidamente (Medina y col., 2012). Su cuantificación resulta un parámetro de mucha utilidad para comprobar el estado oxidativo en un periodo de tiempo concreto (Medina y col.,

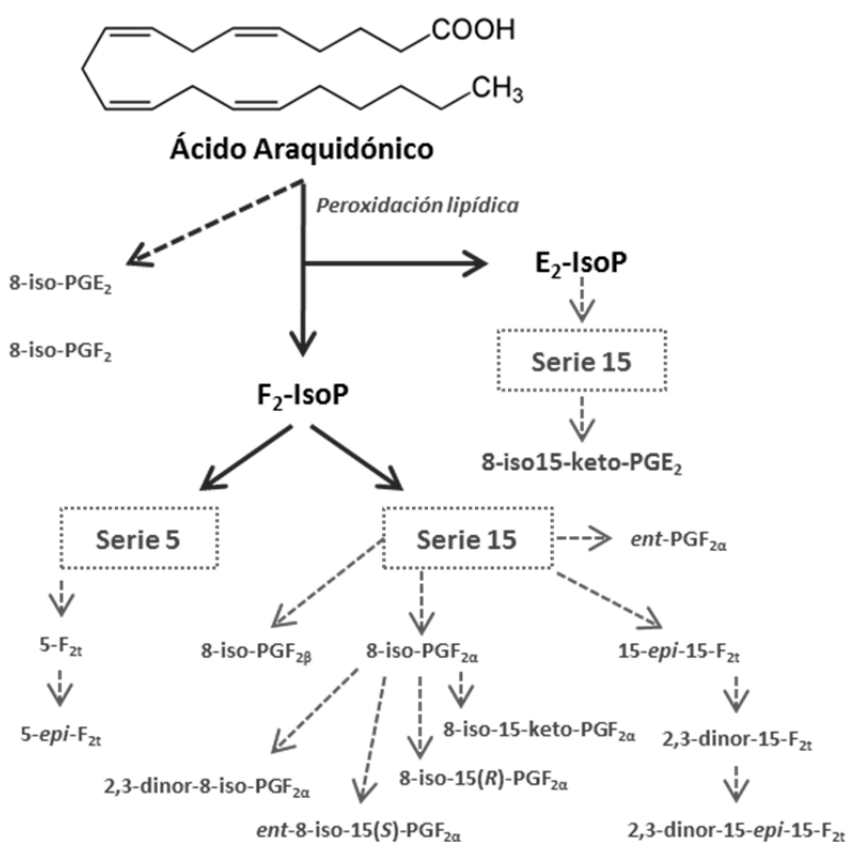
2012; Morrow y col., 1992; Morrow y col., 1990; Morrow y col., 1994). Otras formas de IsoPs también se pueden formar en el organismo, y pueden ser interesantes desde el punto de vista fisiológico. Por ejemplo, los F<sub>3</sub>-IsoPs derivados del ácido eicosapentaenoico o los F<sub>4</sub>-IsoPs derivados del ácido docosahexaenoico, que se expondrán más adelante.

Los F<sub>2</sub>-IsoPs circulan libres en sangre (Awad y col., 1993; Li y col., 1999) y son filtrados en el riñón, dando como resultado multitud de metabolitos urinarios (Figura 7). Yan y col. (2010) observaron que los F<sub>2</sub>-IsoPs se excretan en orina como glucurónidos, y que los niveles urinarios de F<sub>2</sub>-IsoPs aumentan significativamente tras procesar las muestras de orina con  $\beta$ -glucuronidasa ( $0.43 \pm 0.02$  vs.  $0.61 \pm 0.03$  nmol creatinina<sup>-1</sup>). Este hecho también ha sido descrito en otras publicaciones (Medina y col., 2015; Medina y col., 2012), incluso llegando a un porcentaje de glucuronización del 100%. Generalmente, los conjugados glucurónidos se forman por reacción con grupos hidroxilo libres o grupos carboxilo (Medina y col., 2012). Debido a la similitud en la estructura entre 15-F<sub>2t</sub>-IsoPs y los metabolitos 2,3-dinor-IsoPs y 2,3-dinor-5,6-dihidro-IsoPs, es posible que los conjugados glucurónidos de 2,3-dinor-15-F<sub>2t</sub>-IsoPs y 2,3-dinor-5,6-dihidro-15-F<sub>2t</sub>-IsoPs pudieran existir, pero estos compuestos no se han estudiado hasta la fecha. Por lo tanto, la glucuronización representa la principal ruta del metabolismo de los IsoPs y necesita ser considerada a la hora de medirlos en orina, evitando la subestimación de su formación a nivel sistémico o local en el organismo.

La generación de IsoPs se ha relacionado con numerosas enfermedades (Milne y col., 2014). En conjunto, los estudios indican que la formación de F<sub>2</sub>-IsoPs se incrementa en poblaciones obesas, a la vez que con un mayor índice de masa corporal (IMC). Algunos estudios indican que el papel de los agentes oxidantes en el desarrollo de cáncer de mama es diferente según el IMC. De hecho, las poblaciones con un alto IMC tienen una producción excesiva de agentes oxidantes y, por tanto, tienen un alto riesgo sufrir un mayor grado de estrés oxidativo (Dai y col., 2009; Morrow y col., 1999).

El aumento de F<sub>2</sub>-IsoPs ha sido asociado con diversos tipos de cáncer. Rossner Jr y col. (2006) observaron un aumento de F<sub>2</sub>-IsoPs en pacientes con cáncer de mama. La misma tendencia fue referida por Wu y col. (2008) en pacientes con cáncer hepático.

Otros cánceres como el de próstata y el cáncer gástrico también fueron relacionados con un incremento en la concentración urinaria de F<sub>2</sub>-IsoPs (Asombang y col., 2013; Barocas y col., 2011; Brys y col., 2013). Además, Epplein y col. (2009) descubrieron que en pacientes con cáncer pulmonar existía un aumento en la concentración urinaria de F<sub>2</sub>-IsoPs en hombres pero no se vio reflejada en las mujeres, demostrando variación entre sexos.



**Figura 7.** Esquema de la formación y relación metabólica de isoprostanos y sus metabolitos.

Un incremento en los niveles de IsoPs se ha asociado con el incremento del riesgo de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, próstata, estómago, así como el adenoma colorectal. Sin embargo, los resultados observados son inconsistentes al no poder concretar si este aumento de IsoPs conduce a un mayor riesgo de cáncer; o el incremento en la tasa de células cancerígenas, aumenta la producción de F<sub>2</sub>-IsoPs por un incremento del estrés oxidativo (Milne y col., 2014).

Diversas enfermedades neurodegenerativas también han demostrado relación con los F<sub>2</sub>-IsoPs. La enfermedad de Parkinson, el Alzheimer, la enfermedad de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica han mostrado un aumento del estado oxidativo del organismo, marcado por elevadas concentraciones de F<sub>2</sub>-IsoPs (Fessel y col., 2003; Montine y col., 1999; Montine y col., 1998; Praticò y col., 2000; Seet y col., 2010).

Los estudios hasta la fecha, evidencian que los hábitos alimentarios pueden afectar los niveles de peroxidación lipídica. Es importante observar que, incluso mediante la única restricción de las calorías totales, se ha demostrado un descenso en los niveles de F<sub>2</sub>-IsoPs (Milne y col., 2014). La síntesis de F<sub>2</sub>-IsoPs específicos por varios investigadores de todo el mundo, ha permitido la exploración de la actividad biológica de estos metabolitos. La mayoría de los estudios se han centrado en el análisis de IsoPs en forma de ácido graso libre. El 8-iso-PGF<sub>2α</sub> es quizás el IsoP más estudiado, centrándose gran parte del trabajo que rodea la actividad biológica de esta molécula en sus efectos en el sistema cardiovascular (Milne y col., 2014).

Recientemente, Bauer y col. (2014) publicaron una revisión de los efectos de los IsoPs en el sistema cardiovascular. En resumen, el 15-F<sub>2</sub>-IsoP puede actuar como un potente vasoconstrictor. Además, puede modular la actividad plaquetaria, inhibir la angiogénesis, y promover la aterosclerosis mediante la estimulación de la adhesión de los monocitos y neutrófilos endoteliales. Estas actividades biológicas de 15-F<sub>2</sub>-IsoP se definen por la interacción con el receptor de tromboxano (TP).

Del mismo modo, el 15-E<sub>2i</sub>-IsoPs (igualmente referido como 8-iso-PGE<sub>2</sub> o IPE<sub>2-III</sub>) también media sus funciones a través del receptor TP. El 15-F<sub>2T</sub>-IsoP y el 15-E<sub>2i</sub>-IsoP han demostrado ejercer actividad biológica a través de otros receptores de PG (receptor de PGE<sub>2</sub> (EP) y de PGF<sub>2α</sub> (FP)) (Bauer y col., 2014; Clarke y col., 2005; Clarke y col., 2004; Elmhurst y col., 1997; Janssen & Tazzeo, 2002; Joy & Cowley, 2008; Paredes y col., 2007; Sametz y col., 2000; Seto y col., 2008; Weber & Markillie, 2003; Zhao y col., 2009).

Es destacable que la actividad de las moléculas puede variar en función del receptor al que se une. Por ejemplo, mientras que el 15-F<sub>2i</sub>-IsoP y el 15-E<sub>2i</sub>-IsoP son vasoconstrictores a través de los receptores TP, ambas moléculas pueden inducir

vasodilatación a través del receptor EP. Estos efectos opuestos han sido particularmente estudiados en el pulmón (Janssen & Tazzeo, 2002). Además, Chen y col. (2012) han informado de ambos efectos, vasoconstrictor y vasodilatador, del 15-F<sub>2t</sub>-IsoP y del 15-E<sub>2t</sub>-IsoP en el conducto arterial de Botalli, una derivación vascular central que se constriñe poco después del nacimiento (Janssen & Tazzeo, 2002). Estos autores mostraron que, el conducto arterioso de Botalli, se contrae en respuesta tanto al 15-F<sub>2t</sub>-IsoP como al 15-E<sub>2t</sub>-IsoP, de una manera concentración-dependiente. Además, este efecto podría invertirse mediante la administración de un antagonista del receptor TP.

Curiosamente, cuando los receptores TP se bloquean antes de la administración de los IsoPs, tanto el 15-F<sub>2t</sub>-IsoP como el 15-E<sub>2t</sub>-IsoP producen un incremento de la vasodilatación; presumiblemente, debido a la activación del receptor EP<sub>4</sub>. Ambos, 15-F<sub>2t</sub>-IsoP y 15-E<sub>2t</sub>-IsoP, actúan como potentes vasoconstrictores dosis-dependiente en embriones de pollo; de nuevo, actuando a través del receptor TP, modificándose con la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Van Der Sterren y col., 2014; van der Sterren & Villamor, 2011). Finalmente, otros trabajos relacionados observaron que los niveles de IsoPs son más altos en recién nacidos que en los lactantes de más edad (Comporti y col., 2004).

### 5.3. MARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El AA no es el único PUFA que puede ser oxidado para formar análogos de IsoPs. Mediante la peroxidación de los ácidos grasos  $\omega$ -3, eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), se pueden formar IsoPs de la serie 3 e IsoPs de la serie 4 respectivamente. Estos compuestos análogos de los IsoPs se han denominado neuroprostanos (NeuroPs) (Roberts li & Milne, 2009) (Figura 8). Los F<sub>3</sub>-IsoPs se forman en abundancia tanto *in vitro* como *in vivo* a partir de la oxidación no enzimática de EPA (Barden y col., 2012; Brooks y col., 2008; Comporti y col., 2008), mientras que el DHA puede oxidarse hasta formar las series F<sub>4-</sub>, D<sub>4-</sub>, E<sub>4</sub>, A<sub>4</sub> y J<sub>4</sub>-NeuroPs (Barden y col., 2012; Brooks y col., 2008; Comporti y col., 2008).

El AA se encuentra uniformemente distribuido en el cerebro, con concentraciones similares tanto en materia gris como en la blanca, así como



dentro de las glías y las neuronas. A diferencia del AA, el DHA está en concentraciones considerablemente altas en las membranas neuronales y la vaina de mielina, mientras que no se encuentra en otros tipos de tejidos celulares. De este modo, los F<sub>4</sub>-NeuroPs son, con mucho, el producto más abundante procedente de la oxidación no enzimática del DHA en el cerebro (Reich y col., 2001).

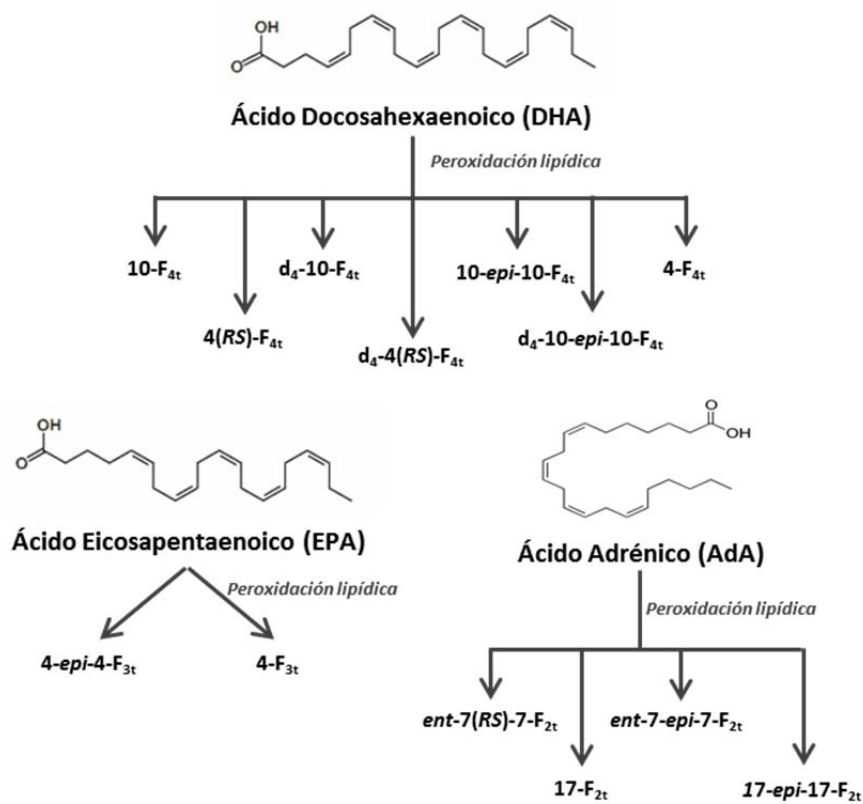
Por tanto, el análisis de los NeuroPs proporciona una vía muy específica para cuantificar el daño oxidativo *in vivo*, que pueda ocurrir en regiones cerebrales y del SNC. Roberts Ii & Milne (2009) observaron valores de F<sub>3</sub>-NeuroPs mucho mayores que los encontrados para F<sub>2</sub>-IsoPs, debido al mayor número de dobles enlaces que existen en el EPA, siendo más fácilmente oxidable. Dichos autores, también han observado que el mecanismo, por el cual EPA puede ser beneficioso en ciertas enfermedades, es su capacidad para disminuir la generación de F<sub>2</sub>-IsoPs.

Del mismo modo que los F<sub>2</sub>-IsoPs son el resultado de la peroxidación del AA, y que los F<sub>3</sub>-NeuroPs y F<sub>4</sub>-NeuroPs lo son del EPA y el DHA, respectivamente. Los F<sub>2</sub>-dihomo-isoprostanos (F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs) son el resultado de la peroxidación del ácido adrenico (AdA) (Figura 8), el cual se encuentra en grandes cantidades en cerebro, principalmente en la materia blanca y asociado a la mielina.

La materia blanca se daña con facilidad en casos de accidente cerebrovascular y se degrada de manera uniforme en varias enfermedades, por ejemplo durante el transcurso de la esclerosis múltiple. Los F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs se generan cuando existen grandes cantidades de AdA y sus niveles son mucho mayores en condiciones de estrés oxidativo, como ocurre en la porción de la sustancia blanca del cerebro humano. De la misma manera que se ha comentado anteriormente, Roberts Ii & Milne (2009) demostraron que los niveles de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs en la materia blanca son proporcionalmente superiores a los IsoPs y los NeuroPs cuando existían condiciones oxidativas. De este modo, sus estudios sugieren que la cuantificación de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs podría ser un marcador selectivo de lesión *in vivo* de la materia blanca. También están presentes en el riñón, glándulas y tejidos adrenales. Además, podría considerarse como uno de los primeros marcadores de la peroxidación lipídica en el síndrome de Rett, un

trastorno del sistema nervioso que conduce al retraso en el desarrollo de las áreas de lenguaje expresivo (De Felice y col., 2011)

Por lo tanto, la cuantificación de los NeuroPs proporciona datos para conocer el papel del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas principalmente. De hecho, los productos relativos a la peroxidación lipídica han demostrado tener acciones biológicas más allá de ser marcadores fiables de estrés oxidativo (Roberts II y col., 2005).



**Figura 8.** Neuroprostanos y F<sub>2</sub>-dihomo-isoprostanos divididos por familias, según su procedencia.

La investigación sobre productos de la peroxidación lipídica derivados del daño oxidativo en las regiones cerebrales y del sistema nervioso central ha comenzado hace sólo unos años. Sin embargo, existen pruebas convincentes sobre la utilidad de estos marcadores para comprender el papel del daño oxidativo en el sistema nervioso central en distintas enfermedades (Milatovic & Aschner, 2009).

De hecho, se ha establecido el papel del daño oxidativo inducido por radicales libres en la patogénesis de diversos trastornos neurodegenerativos (Ayala-Peña, 2013; Melo y col., 2011; Ortiz y col., 2014; Sultana & Butterfield, 2010). Numerosas enfermedades neurodegenerativas están relacionadas con un incremento en la formación de prostanoïdes en tejidos del SNC y fluidos corporales, incluyendo: la enfermedad de Alzheimer (Reich y col., 2001), la enfermedad de Parkinson (Farooqui & Farooqui, 2011), la enfermedad de Huntington (Greco y col., 2000), la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Greco y col., 2000), esclerosis múltiple (Miller y col., 2011), epilepsia (Medina y col., 2015), y la esclerosis lateral amiotrófica (D'Amico y col., 2013).

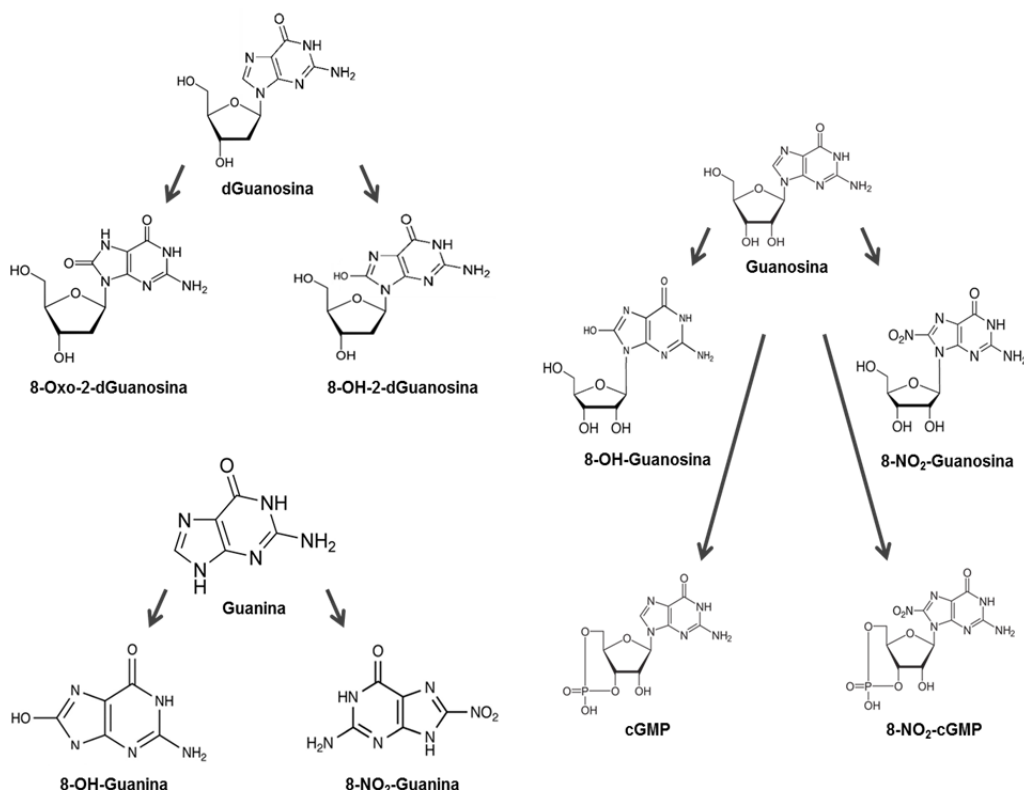
#### 5.4. MARCADORES DE OXIDACIÓN Y MUTAGÉNICOS DE ADN

El daño oxidativo deriva en un cambio estructural del compuesto afectado y puede ser especialmente grave si se produce en la cadena de ADN o de ARN (Figura 9), derivando en una amplia variedad de compuestos de terminación (Cooke, 2012). La reparación del ADN y ARN dañado implica la eliminación de las bases y/o nucleótidos defectuosos, así como la liberación de los nucleótidos y nucleósidos que circulan en plasma (Mateos & Bravo, 2007).

Es bien sabido que existen cuatro tipos de bases nitrogenadas las cuales forman el ADN. Estas son: citosina, timina, adenosina y guanina. Esta última base nitrogenada, presenta el potencial de reducción más bajo de todas; por tanto, el daño oxidativo se producirá predominantemente en la base guanina antes que en las demás bases (siendo un donante de electrones más eficaz). Algunos catabolitos de oxidación de ADN, tales como 8-nitroguanina (8-NO<sub>2</sub>-Gua) y su nucleósido 8-nitroguanosina (8-NO<sub>2</sub>-Guo), se forman bajo condiciones inflamatorias (Cooke, 2012). Sin embargo, los catabolitos más estudiados de la oxidación de DNA y que se establecen comúnmente como marcadores de daño oxidativo son 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dGuo) y 8-hidroxyguanosina (8-OH-Guo) (Dizdaroglu & Jaruga, 2012).

Otros catabolitos del ADN, como la guanosina-3'-5'-monofosfato cíclica (cGMP), ejercen una función tremendamente relevante en la respuesta celular al estrés. NO actúa ejerciendo la transducción de señales celulares, además de activar la cGMP. Lo que deriva en la activación de las proteína-quinatas

dependientes, que juegan un papel importante en el mantenimiento de los sistemas vasculares y neuronales (Nunomura y col., 2012). Por último, el metabolito nitrogenado de la cGMP, la 8-nitroguanósina-3'-5'-monofosfato cíclica (8-NO<sub>2</sub>-cGMP), se ha encontrado en las células después del ataque de ROS/NOS actuando como molécula de señalización, mediante la activación del grupo sulfhídrico en respuesta a un desequilibrio en el sistema redox celular (Halliwell B, 2007; Ihara y col., 2011).



**Figura 9.** Formación de los catabolitos de oxidación de la base guanina, y sus nucleósidos: guanosina y desoxiguanosina.

Las consecuencias genéticas de la oxidación de las bases nitrogenadas, los nucleótidos y nucleósidos de ADN son principalmente dos: los efectos genotóxicos y los mutagénicos. El factor clave es la replicación de ADN, si una malformación en la cadena de ADN susceptible de ser transcrita por las DNA polimerasas se bloquea de forma parcial o completa, la lesión se denomina genotóxica. Sin embargo, si la replicación se produce y además la base alterada es incorporada mediante las ADN polimerasas frente su réplica de ARN, entonces la

lesión se considera mutagénica (Delaney y col., 2012). Los distintos catabolitos de la oxidación de la base guanina se emparejan con la base citosina, pero una base oxidada puede conllevar a la unión con otra cadena de bases. De este modo, si la replicación de la base guanina se produce con adenina o timina, conllevará a un error en la transcripción de la información genética (Cooke y col., 2003).

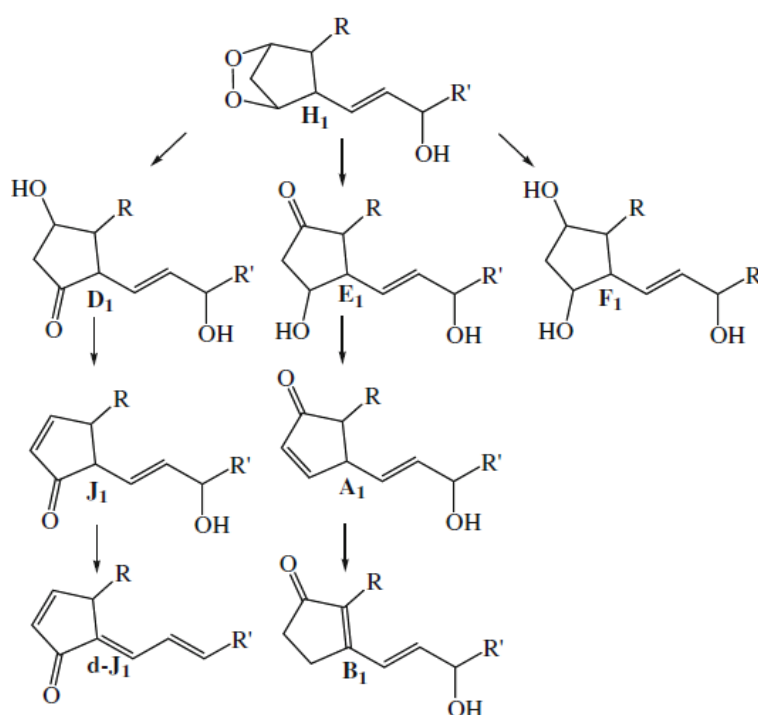
Por tanto, parece evidente que dependiendo de la lesión en cuestión y del lugar donde se produzca, esta puede conllevar un proceso mutagénico. Así pues, el organismo ha desarrollado diversos sistemas de prevención y de eliminación de errores, en la cadena de ADN. La mutación del ADN es un factor de riesgo en la promoción de la carcinogénesis. Asimismo, la literatura científica ha descrito elevadas concentraciones de catabolitos oxidados de ADN durante el desarrollo de diversos tumores, señalando que tales daños en la cadena de ADN pueden ser considerados como factor de riesgo importante en la etiología del cáncer (Cooke y col., 2003).

#### 5.5. MARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN PLANTAS SUPERIORES. FITOPROSTANOS

El ácido linolénico (ALA; C18: 3 $\omega$ 3) se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal y puede convertirse en ácido jasmónico mediante reacciones enzimáticas (Durand y col., 2011). Sin embargo, un estudio de Imbusch & Mueller (2000) reveló una nueva serie de dinor-isoprostanos en plantas resultante de la oxidación no enzimática de ALA, los cuales fueron nombrados fitoprostanos (FitoPs) (Figura 10).

Los efectos de los FitoPs están condicionados por el estereoisómero en cuestión (Karg y col., 2007). La oxidación no enzimática de ALA conduce a dos series de FitoPs incluyendo 16 isómeros cada una, teóricamente sintetizados a partir de los lípidos de membrana de las células vegetales (Durand y col., 2011). La peroxidación de ALA conlleva a la formación de los isómeros H<sub>1</sub>-FitoP, que a su vez pueden resultar en D<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>, y F<sub>1</sub>-FitoP. A su vez, D<sub>1</sub>-FitoP puede transformarse en J<sub>1</sub>-FitoP y deoxi-J<sub>1</sub>-FitoP; mientras que E<sub>1</sub>-FitoP derivará en A<sub>1</sub>-FitoP y B<sub>1</sub>-FitoP. Los FitoPs se encuentran esterificados mayoritariamente, de hecho el 90% de F<sub>1</sub>-FitoPs se encuentran en esta forma (Imbusch & Mueller, 2000).

Las actividades biológicas de los FitoPs han sido descritas en plantas, pudiendo estar relacionadas con posibles efectos en la salud humana. De hecho, B<sub>1</sub>-FitoP y A<sub>1</sub>-FitoP han demostrado que regulan la expresión de genes en *Arabidopsis thaliana* y en la planta del tabaco. Diversos autores encontraron que el 28% de esos genes estaban relacionados con la desintoxicación, la respuesta al estrés y la secreción de metabolitos secundarios (Gilles y col., 2009; Loeffler y col., 2005; Thoma y col., 2003).



**Figura 10.** Formación de las distintas series de fitoprostanos, a partir del precursor H<sub>1</sub>-FitoP. Adaptado de Durand y col. (2009)

En modelos animales, los FitoPs también han demostrado efectos bioactivos. En efecto, A<sub>1</sub>-FitoP y d-J<sub>1</sub>-FitoP mostraron un efecto antiinflamatorio similar a PGA<sub>1</sub> y dPGJ<sub>2</sub> en riñón embrionario, células humanas y en macrófagos RAW<sub>2</sub> (Karg y col., 2007). Además, E<sub>1</sub>-FitoP inhibe la síntesis *in vitro* de la interleuquina-12 en células dendríticas y aumenta la polarización de las células Th<sub>1</sub> (Mariani y col., 2007; Traidl-Hoffmann y col., 2005). Al mismo tiempo, E<sub>1</sub>-

FitoP y F<sub>1</sub>-FitoP fueron capaces de reducir la producción *in vivo* de citoquinas Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub> (Gutermuth y col., 2007).

Las plantas tienen una gran cantidad de prostanoides. De hecho, Imbusch & Mueller (2000) encontraron el doble de concentración de FitoPs en plantas, comparado con la concentración de IsoPs observada en seres humanos. Además, diversos extractos de plantas secas han demostrado una mayor concentración de FitoPs que las plantas frescas. En particular, los niveles de FitoPs más altos se encontraron en el polen de abedul (Traidl-Hoffmann y col., 2005). El porqué de estos niveles tan elevados de FitoPs en plantas podría ser debido tanto a un incremento en la formación, como a una reducción en su catabolismo (Thoma y col., 2004). Por su parte, Durand y col. (2009) encontraron concentraciones de FitoPs aproximadamente 10 veces menores en las raíces de las plantas que en las hojas, y comparable a los niveles de isoprostanos que se detectan en los mamíferos. Se ha propuesto que el responsable de este incremento puede ser el oxígeno singlete formado en los cloroplastos durante la fotosíntesis, lo cual podría conducir a un aumento en la peroxidación del ALA (Triantaphylidès y col., 2008).

Los estudios de identificación y cuantificación de los FitoPs se limitan sólo a la planta de tabaco, algunos tipos de hojas y al tomate (Durand et al., 2011), además de diversos tipos de aceite (Collado-González y col., 2015; Collado-González y col., 2015). Según la literatura, no hay estudios sobre el contenido de FitoPs en uva o en vino. Por lo tanto, la existencia de FitoPs en uva y el efecto del procedimiento de vinificación en relación a los cambios en el contenido de FitoPs en el vino terminado, abre un amplio campo de investigación. Aún más, teniendo en cuenta que la literatura científica ha definido los FitoPs como una herramienta representativa y útil para medir el estrés *in vivo* en plantas (Imbusch & Mueller, 2000).





## **CAPÍTULO 2. OBJETIVOS**



El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es:

- Estudiar la capacidad de protección contra el estrés oxidativo, y marcadores enzimáticos de mutagénesis, y los ligados al sistema vascular, inflamatorio, y del sistema nervioso central, *in vivo* de tres vinos con diferentes procesos de vinificación, comparándolo con sus respectivos mostos de origen (placebo).

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, se abordaron los siguientes objetivos particulares:

- Caracterizar los mostos y los vinos en base a su contenido, cualitativo y cuantitativo, en nuevos compuestos bioactivos de interés para la salud humana.
- Relacionar la actividad biológica de los nuevos compuestos descritos en mosto y vino con los marcadores de estrés oxidativo, función vascular, inflamatoria, mutagénesis y de neurodegeneración tras la ingesta de 3 tipos de vinos y sus correspondientes mostos por voluntarios sanos a través de:
  - La medida del estado oxidativo a nivel general, mediante el análisis de isoprostanos.
  - La medida el estado oxidativo del sistema nervioso central, mediante el análisis de neuroprostanos y F<sub>2</sub>-dihomo-isoprostanos.
  - La determinación de la excreción de prostaglandinas para la evaluación del estado inflamatorio y vascular a nivel sistémico.
  - La medida del daño al ADN (mutagénesis) mediante el análisis plasmático de catabolitos de oxidación del ADN oxidado.



## **CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. MUESTRAS EMPLEADAS DURANTE EL ENSAYO CLÍNICO

### 1.1. VINOS TINTOS

Los vinos tintos se obtuvieron de “Bodegas Baigorri” (Bodegas Baigorri SAU, Samaniego, Álava). Se seleccionaron tres vinos diferentes con el fin de elegir diferentes procedimientos de vinificación y crianza. La vendimia de las uvas se llevó cabo manualmente en pequeñas cajas plásticas de 10 kgs de capacidad debidamente aireadas, impidiendo la ruptura de las bayas y el inicio de la fermentación antes de la llegada a la bodega. Para su correcto mantenimiento los vinos fueron almacenados entre 12 °C y 14 °C, desde el embotellado.

#### 1.1.1. "Baigorri Maceración Carbónica 2010" (MCW)

D.O. calificada Rioja. Elaborado con 100% uva “Tempranillo”. La maceración carbónica tiene lugar en tinos de madera. El mosto procedente de las uvas rotas inicia su fermentación desprendiendo CO<sub>2</sub>, que satura la atmósfera del depósito que lo contiene. Las uvas enteras absorben el gas carbónico, iniciándose así la fermentación intracelular de la uva. Este proceso es posible gracias a la presencia de enzimas endógenas de la uva. Cuando el mosto exterior de la uva está a punto de terminar su fermentación, el tino se sangra y la pasta se descuba. A continuación se prensan las uvas enteras, que aún tienen mosto rico en azúcares, los dos mostos se mezclan para así finalizar la fermentación alcohólica la cual se realiza a 28 °C en tanques de acero inoxidable con levadura seleccionada. Se practican todos los controles diarios de acidez, densidad, temperatura y posteriormente la fermentación maloláctica igualmente en depósitos de acero inoxidable. Como procesos especiales, solo se emplea la clarificación con albúmina de huevo. La botella empleada es de tipo “Elite” y el corcho es de 49/24 mm de origen natural.

### **1.1.2. "Baigorri crianza 2007" (AW)**

D.O. calificada Rioja. Elaborado con 90% "Tempranillo", 5% "Garnacha" y un 5% de otras variedades. Una vez en bodega, la mecanización se inicia con el despalillado y el estrujado. La fermentación alcohólica se realiza a 28 °C en tinos de madera con levadura seleccionada. Se practican todos los controles diarios de acidez, densidad y temperatura. Se realiza el prensado con prensa horizontal durante una hora y; posteriormente, la fermentación maloláctica en barricas de roble francés "Alier". La crianza se lleva a cabo únicamente en barricas de roble francés, durante 18 meses. Durante la clarificación se emplea albúmina de huevo. La botella empleada es de tipo "Elite" y el corcho es de 49/24 mm de origen natural.

### **1.1.3. "Baigorri Garaje 2010" Vino de autor (HEW)**

D.O. calificada Rioja. Elaborado con 100% uva "Tempranillo" de cepas viejas (más de 50 años). Una vez en bodega, la mecanización se inicia con el despalillado y el estrujado de la uva. La fermentación alcohólica se realiza a 28 °C en tinos de madera con levadura seleccionada. Se practican todos los controles diarios de acidez, densidad y temperatura. Se realiza el prensado con prensa horizontal durante una hora y; posteriormente, la fermentación maloláctica en barricas de roble francés Alier. La crianza se lleva a cabo sólo en barricas de roble francés durante 22 meses. El agente clarificante es albúmina de huevo. La botella empleada es de tipo "Byblos" y el corcho es de 49/24 mm de origen natural.

## **1.2. MUESTRAS DE MOSTO**

Los mostos empleados durante el ensayo se almacenaron a -20 °C desde la vendimia de las uvas, con el fin de que la fermentación no pudiera producirse. Cada mosto corresponde con el zumo de uva original utilizado para el procedimiento de elaboración de cada vino. Esta procedencia permite conocer las diferencias entre los vinos, con el fin de evitar las posibles diferencias en las variedades de uva o procedimiento de vinificación de mosto a vino. Las muestras de mosto se refieren en el texto en base a sus siglas en inglés, de la siguiente manera:



Mosto origen del vino "Baigorri maceración carbónica": CMM

Mosto origen del vino "Baigorri crianza": AM

Mosto origen del vino "Baigorri Garaje" Vino de autor: HEM

### 1.3. MUESTRA DE ALCOHOL ETÍLICO

El alcohol ha demostrado su capacidad antioxidante *in vivo* (De La Torre y col., 2006; Renaud & De Lorgeril, 1992; Schröder y col., 2009). De este modo, el etanol podría ser parcialmente responsable de los efectos del vino tinto, tras su ingestión por voluntarios sanos. En consecuencia, creímos conveniente evaluar los efectos de la ingesta de etanol, y su efecto en el cuerpo humano. Para ello, se incluyó un volumen específico de ron blanco (en adelante WR) (Ron Bacardí SA, Santiago de Cuba), equivalente al etanol ingerido con la ingesta de un servicio de vino tinto (2.07 g de etanol por ingesta) utilizado en los diferentes ensayos de la presente tesis doctoral.

## 2. DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente estudio incluyó un total de 18 mujeres voluntarias sanas (N=18), con edades comprendidas entre 18 y 27 años (las características se muestran en la Tabla 1). Se obtuvo el consentimiento informado y firmado de cada voluntaria participante del estudio.

El desarrollo del estudio fue doble ciego, cruzado y controlado mediante placebo. El estudio se llevó a cabo en cuatro etapas. Al comienzo de cada una de las etapas, las voluntarias (N=18) se dividieron de forma aleatoria en dos grupos iguales (N<sub>1</sub>=9 y N<sub>2</sub>=9), con el fin de poder desarrollar el cruzado del estudio. La representación gráfica de las diferentes etapas desarrolladas en el presente estudio, se muestra en la Figura 11.

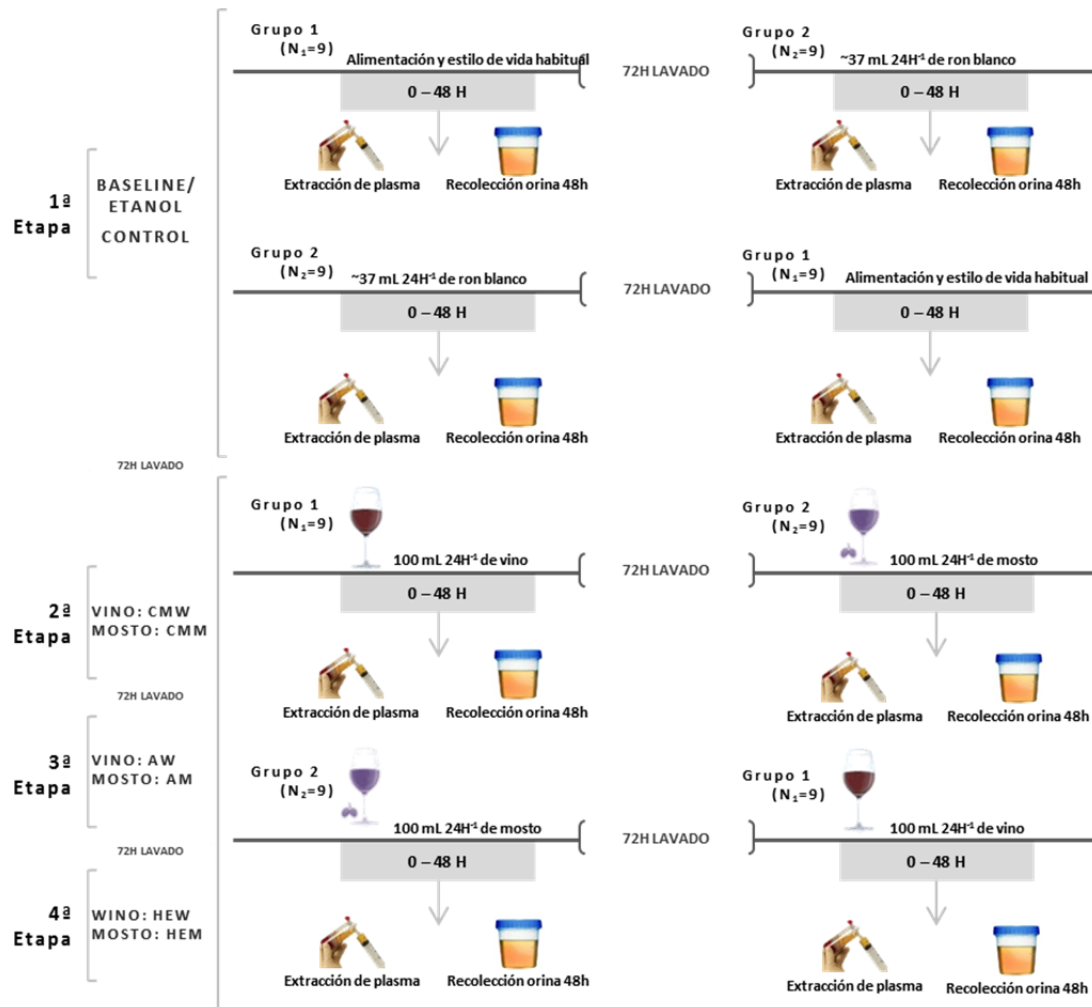
**Tabla 1.** Características de las voluntarias al inicio del estudio (N=18)

PARÁMETROS	MEDIA	SD	PARÁMETROS	MEDIA	SD
Edad (años)	22.5	6.3	HDL-Colesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	70.9	18.8
Peso (Kg)	64.3	16.4	LDL-Colesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	101.1	24.7
Talla (cm)	164.1	17.7	GOT (U L <sup>-1</sup> )	21.1	9.9
IMC	23.5	1.1	GTP (U L <sup>-1</sup> )	18.4	12.6
Glucosa (mg dL <sup>-1</sup> )	87.2	7.7	Fosfatasa Alcalina (U L <sup>-1</sup> )	53.9	14.5
Urea (mg dL <sup>-1</sup> )	28.7	6.6	Gamma GT (U L <sup>-1</sup> )	11.3	3.5
Creatinina (mg dL <sup>-1</sup> )	0.7	0.1	LDH (U L <sup>-1</sup> )	178.7	25.1
Ac. Úrico (mg dL <sup>-1</sup> )	3.8	0.8	Creatinina quinasa (U L <sup>-1</sup> )	90.7	49.6
Proteínas totales (g dL <sup>-1</sup> )	7.4	0.3	Amilasa pancreática (U L <sup>-1</sup> )	33.5	11.9
Albúmina (g dL <sup>-1</sup> )	4.6	0.3	Lipasa (U L <sup>-1</sup> )	41.1	22.4
Calcio (mg dL <sup>-1</sup> )	9.6	0.3	Sodio (mEq L <sup>-1</sup> )	141.0	1.7
Fósforo (mg dL <sup>-1</sup> )	3.9	0.5	Potasio (mEq L <sup>-1</sup> )	4.5	0.2
Bilirrubina total (mg dL <sup>-1</sup> )	0.5	0.2	Cloro (mEq L <sup>-1</sup> )	102.6	1.5
Colesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	190.1	31.7	Hierro (mcg dL <sup>-1</sup> )	103.2	37.5
Triglicéridos (mg dL <sup>-1</sup> )	87.5	39.3	Ferritina (ng mL <sup>-1</sup> )	39.8	22.7

## 2.1. PERIODO DE CONTROL EN CONDICIONES INICIALES Y CONTROL DE ETANOL

Durante la primera etapa se establecieron los parámetros iniciales, los cuales se tomaron como referencia, además de los efectos *in vivo* de la ingesta de etanol derivados de la ingesta de ron blanco (lo que se estableció como un control de etanol). A las 0 horas y durante las siguientes 48 horas, las voluntarias del grupo 1 (N<sub>1</sub>=9) siguieron su estilo de vida habitual, excluyendo de su dieta vino, mosto, uva y bebidas alcohólicas. A su vez, las voluntarias del Grupo 2 (N<sub>2</sub>=9) realizaron la ingesta de dos dosis (una cada 24 horas) de 37 mL de ron blanco (el volumen proporcional que aporta la misma cantidad de etanol incluida en una dosis de vino (2.07 g de etanol 24 horas<sup>-1</sup>)). Después de 72 horas de lavado se realizó el cruzado de los grupos, con el fin de poder desestimar cualquier solapamiento entre etapas. Por lo tanto, a las 0 horas y durante las siguientes 48 horas, las voluntarias del Grupo 1 (N<sub>1</sub>=9) realizaron la ingesta de dos dosis diarias de 37 mL de ron blanco (2.07 g de etanol 24 horas<sup>-1</sup>). Mientras tanto, las voluntarias del

Grupo 2 ( $N_2=9$ ) siguieron las recomendaciones nutricionales descritas anteriormente.



**Figura 11.** Representación gráfica de las distintas etapas del estudio *in vivo*.

Al finalizar el cruzado de los grupos se volvió a realizar un periodo de limpieza de 72 horas, previo al desarrollo de la segunda etapa.

## 2.2. INGESTA DE VINO Y MOSTO

La ingesta de vino y mosto se realizó a lo largo de la segunda, tercera y cuarta etapa. Estas etapas se desarrollaron de forma similar, con la única de

diferencia de las bebidas a estudio empleadas. Así pues, la segunda etapa sirvió para comprobar los efectos *in vivo* del vino de maceración carbónica (CMW) y su mosto de origen (CMM). Del mismo modo, durante la tercera etapa, las bebidas a estudio fueron el vino de crianza (AW) y su mosto de origen (AM). Finalmente, el estudio del vino de autor (HEW) y su mosto de origen (HEM) se desarrolló durante la cuarta etapa.

Al igual que durante la primera etapa, las voluntarias (N=19) se dividieron en dos grupos iguales (N<sub>1</sub>=9 y N<sub>2</sub>=9). Cada una de las voluntarias, realizó la ingesta de dos dosis (una cada 24 horas) de 100 mL de vino (2.07 g de etanol 24 horas<sup>-1</sup>), en el caso de las voluntarias del primer grupo (N<sub>1</sub>=9), o 100 mL mosto en el caso de las voluntarias del grupo 2 (N<sub>2</sub>=9). La primera toma coincide con el inicio de la etapa (a las 0 horas), mientras que la segunda toma se realizó a las 24 horas. Después de 72 horas de lavado, se realizó el cruzado de los grupos, con el fin de poder desestimar cualquier solapamiento entre etapas. De este modo, las voluntarias que ingirieron vino al principio de la etapa (N<sub>1</sub>=9), intercambiaron la bebida con las voluntarias que ingirieron mosto (N<sub>2</sub>=9). El desarrollo del cruzado se realizó de la misma manera que durante las primeras 48 horas. Así pues, las voluntarias de grupo 1 (N<sub>1</sub>=9) ingirieron dos dosis diarias de 100 mL de mosto durante 48 horas, mientras que las voluntarias del grupo 2 (N<sub>2</sub>=9) realizaron una ingesta diaria de 100 mL de vino (2.07 g de etanol 24 horas<sup>-1</sup>), durante las mismas 48 horas.

### 2.3. TOMA DE MUESTRAS DE ORINA Y PLASMA SANGUÍNEO

La toma de muestras de orina se realizó de la misma manera en cada etapa. En primer lugar y antes de cualquier ingesta, a las 0 horas se recogió la primera orina de la mañana. Para poder determinar el efecto de cada etapa, se recogió la orina excretada por las voluntarias, desde las 0 horas hasta las 48, abarcando la duración completa del tratamiento. Tras las 72 horas de lavado y tras el cruzado de los grupos, la toma de muestras de orina se realizó de nuevo, exactamente de la misma manera.

La toma de muestras de plasma se realizó siempre en ayunas, a primera hora de la mañana. Cada toma se realizó coincidiendo con el principio y el final de cada etapa, de modo que se pudiera abarcar todo el tratamiento. Así pues, la

primera extracción de sangre se realizó a las 0 horas y, una vez finalizado el tratamiento, se realizó otra extracción de sangre en ayunas a las 48 horas. Al igual que para la recolección de muestras de orina, la extracción de sangre tras las 72 horas de lavado se realizó de la misma manera, para comprobar los efectos del cruzado de los grupos.

### 3. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE ORINA PARA EL ANÁLISIS DE ISOPROSTANOS, PROSTAGLANDINAS, NEUROPROSTANOS Y F<sub>2</sub>-DIHOMO-ISOPROSTANOS

La extracción de IsoPs, PGs, TXs, NeuroPs y F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs en orina, se llevó a cabo siguiendo métodos desarrollados anteriormente (Medina y col., 2015; Medina y col., 2012). Para la hidrólisis enzimática, se añadió 1 mL de orina en 250 mL de tampón 0.1 M de acetato (pH 4.9), además de 55 µL de la enzima β-glucuronidasa de *Helix pomatia*. La mezcla, se incubó a 37 °C en un bloque térmico durante dos horas. Posteriormente, se llevó a cabo la precipitación de proteínas con 500 µL de metanol:ácido clorídrico 200 mM. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos.

Para la extracción en fase sólida (SPE), se usaron 1000µL de muestra y un cartucho Strata X-AW (Phenomenex, 100 mg, 3 mL<sup>-1</sup>; California, EE.UU), previamente acondicionado. Los analitos se eluyeron con 1 mL de metanol, y se secaron en condiciones de vacío usando un concentrador SpeedVac (Savant SPD121P, Thermo Scientific, MA, EE.UU). Los extractos secos se reconstituyeron con mezcla de fases A:B (90:10, v:v), y se pasaron a través de un filtro de 0.45 µm (Millipore, MA, EE.UU). Las muestras se inyectaron y se analizaron por UHPLC-QqQ-MS/MS.

#### 4. ANÁLISIS DE ISOPROSTANOS Y PROSTAGLANDINAS EN ORINA MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS

La detección e identificación de los eicosanoides presentes en orina se realizó mediante un UHPLC Agilent-1290, acoplado a un espectrómetro de masas con tecnología de triple cuadrupolo modelo 6460 y electrospray como fuente de ionización (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La columna usada fue una ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> (2.1 x 50 mm, 1.8 µm de tamaño de partícula) y su temperatura fue 5 °C, en ambos extremos. Las fases móviles constaron de una fase A (agua al 0.01% de ácido acético (*v:v*)) y una fase B (metanol al 0.01% de ácido acético (*v:v*)). El volumen de inyección de la muestra fue de 20 µL. El flujo se fijó en 0.3 mL min<sup>-1</sup>, siguiendo un gradiente lineal que comenzó en 60% de fase B entre 0-7 minutos, se incrementó a 73% de fase B entre 7.01-10 minutos y alcanzó el 100% de fase B en el minuto 10.01, para mantenerse en ese porcentaje hasta el minuto 13.50 (Medina y col., 2012).

Los 0.3 mL min<sup>-1</sup> de flujo, fueron nebulizados con flujo de nitrógeno de 480 y 560 L h<sup>-1</sup> para la impulsión de la muestra e ionización en modo negativo. La temperatura del nitrógeno, como gas secante, fue de 325 °C. El flujo de nitrógeno del dispositivo "jetstream" fue de 12 L min<sup>-1</sup> (350 °C). El voltaje del capilar y el de la boquilla de "jetstream" (nozzle) fueron 2.750 y 1.500 V, respectivamente, para conseguir una mayor eficacia en la desolvatación y generación iónica a través de un mayor enfoque térmico.

La fragmentación se realizó en la celda de colisión ubicada en el segundo cuadrupolo, mediante el uso de nitrógeno en fase gas y con la ayuda del voltaje de colisión. De la misma manera, el voltaje a la salida del capilar ("fragmentor"), fue también optimizado con el objetivo de conseguir la mayor concentración de ión precursor y, por tanto, mayor sensibilidad. Los analitos obtenidos de la fragmentación se detectaron en modo de monitorización por reacción múltiple (MRM) (Tabla 2). La adquisición y procesamiento de datos para el análisis cualitativo y cuantitativo de los IsoPs y PGs, se realizó con el programa MassHunter (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania).

**Tabla 2.** Características MRM para la determinación de eicosanoides en UHPLC-MS/MS

Nombre del compuesto	Ion Precursor	Ion Resultante	Energía de fragmentación	Energía de colisión	Polaridad
11- $\beta$ -PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	353	309.1	150	17	Negativa
11-dehidro-TXB <sub>2</sub>	367	161.1	120	13	Negativa
15(R)-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	353	193	135	21	Negativa
15- <i>epi</i> -15F <sub>2t</sub>	351.2	315.1	90	0	Negativa
15-keto-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	351.1	314.9	100	0	Negativa
17- <i>trans</i> -PGF <sub>3<math>\alpha</math></sub>	350.9	307	100	15	Negativa
19(R)-OH-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	369.2	325.1	75	17	Negativa
2,3-dinor-11- $\beta$ -PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	325.2	237.1	100	5	Negativa
2,3-dinor-15- <i>epi</i> -15-F <sub>2t</sub>	324.9	237.1	80	0	Negativa
2,3-dinor-15-F <sub>2t</sub>	325.1	137.1	80	0	Negativa
2,3-dinor-6-keto-PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub>	341	134.9	160	24	Negativa
2,3-dinor-8-iso-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	325.2	237.1	100	5	Negativa
20-OH-PGE <sub>2</sub>	367.1	349.2	120	0	Negativa
20-OH-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	369.2	325.1	80	0	Negativa
5- <i>epi</i> -5-F <sub>2t</sub>	353.2	334.8	80	0	Negativa
5-F <sub>2t</sub>	353.1	335.2	90	0	Negativa
6-keto-PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub>	369	245.1	160	24	Negativa
8- <i>epi</i> -8-F <sub>3t</sub>	350.6	127.2	90	0	Negativa
8-F <sub>3t</sub>	351.2	126.8	90	15	Negativa
8-iso-15-keto-PGE <sub>2</sub>	349	234.9	100	5	Negativa
8-iso-15-keto-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	351.1	315.1	100	0	Negativa
8-iso-PGE <sub>1</sub>	352.9	234.8	80	15	Negativa
8-iso-PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub>	355.1	311.1	90	15	Negativa
8-iso-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	353.2	193.1	125	21	Negativa
8-iso-PGF <sub>2<math>\beta</math></sub>	353.2	193.1	80	20	Negativa
<i>ent</i> -8-iso-15(S)-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	353.1	309.1	100	0	Negativa
<i>ent</i> -PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	353.1	309	90	0	Negativa
PGA <sub>2</sub>	333.2	271.2	80	5	Negativa
PGD <sub>2</sub>	350.9	315	80	5	Negativa
PGDM	327.1	309.1	90	0	Negativa
PGE <sub>1</sub>	353.2	317.2	80	5	Negativa

**Tabla 2 (continuación).** Características MRM para la determinación de eicosanoides en UHPLC-MS/MS

Nombre del compuesto	Ion Precursor	Ion Resultante	Energía de fragmentación	Energía de colisión	Polaridad
PGE <sub>2</sub>	351.2	333.1	100	0	Negativa
PGF <sub>1α</sub>	355.2	311	90	15	Negativa
PGH <sub>2</sub>	351.2	271.2	100	0	Negativa
Tetranor-PGAM	309	290.9	70	0	Negativa
Tetranor-PGDM	327.1	108.9	80	20	Negativa
Tetranor-PGDM-lactona	309.1	142.9	90	10	Negativa
Tetranor-PGEM	327	308.8	50	0	Negativa
Tetranor-PGFM	329.4	311.1	89	8	Negativa
Tetranor-PGJM	309	155	100	15	Negativa
U-44069	349.2	219.1	145	22	Negativa
U-46619	349.2	219.1	145	22	Negativa

## 5. ANÁLISIS DE NEUROPROSTANOS Y F<sub>2</sub>-DIHOMO-ISOPROSTANOS EN ORINA MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS

La cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas ha demostrado ser el método más específico y versátil para determinar biomarcadores provenientes de peroxidación lipídica (Vigor y col., 2014). Para analizarlos, tanto los NeuroPs como los F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs se separaron usando un sistema UHPLC acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo 6460 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania).

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna ACQUITY BEH C<sub>18</sub> (2.1 x 50 mm, 1.7µm) (Waters, MA, EE.UU.). Las temperaturas de la columna fueron 6 °C (izquierda) y 6 °C (derecha). El análisis de las muestras se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Medina y col. (2015). El modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) se realizó utilizando la ionización en el modo negativo (ESI). Las fases móviles A (agua) y B (metanol) contenían ambas un 0.01% de ácido acético (*v:v*). El flujo fue de 0.2 mL min<sup>-1</sup> usando un esquema de gradiente lineal (t;% fase B): (0.0; 60), (7; 70), (7.01; 90), (10; 90), (10; 60).



El volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$ . Las condiciones para los parámetros de MS fueron las siguientes: flujo de gas 8  $\mu\text{L min}^{-1}$ , nebulizador 30 psi, voltaje capilar 4.000 V, voltaje de boquilla de 1.000 V, temperatura del gas de 325  $^{\circ}\text{C}$ ; finalmente, el flujo de corriente en chorro de gas fue 12  $\mu\text{L min}^{-1}$ . El tiempo para un solo análisis fue de 10.01 min. El voltaje a la salida del capilar y la energía de colisión fueron optimizados para cada compuesto para generar los iones de productos más abundantes (Tabla 3). La adquisición y procesamiento de datos se realizó mediante el software MassHunter B.04.00 (Agilent Technologies, Walbronn, Alemania). La concentración se calculó mediante la relación del área de los iones de los compuestos con los correspondientes estándares comerciales (Medina y col., 2015).

**Tabla 3.** Características MRM para la determinación de neuroprostanos y F<sub>2</sub>-dihomoisoprostanos en UHPLC-MS/MS

Nombre del compuesto	Ion Precursor	Ion Resultante	Energía de fragmentación	Energía de colisión	Polaridad
10- <i>epi</i> -10-F <sub>4t</sub> -NeuroP	377	152.8	80	0	Negativa
10-F <sub>4t</sub> -NeuroP	377.1	152.9	90	15	Negativa
17- <i>epi</i> -17-F <sub>2t</sub> -DihomoIsoP	381.1	319.1	80	0	Negativa
17-F <sub>2t</sub> -DihomoIsoP	381.1	337.1	80	5	Negativa
4( <i>RS</i> )F <sub>4t</sub> -NeuroP	377.1	271.2	80	0	Negativa
4- <i>epi</i> -4-F <sub>3t</sub> -NeuroP	379	219	90	0	Negativa
4-F <sub>3t</sub> -NeuroP	379.1	101	80	0	Negativa
4-F <sub>4t</sub> -NeuroP	377.1	333.1	80	0	Negativa
<i>ent</i> -7( <i>RS</i> )-7-F <sub>2t</sub> -DihomoIsoP	381.1	363.2	80	0	Negativa
<i>ent</i> -7- <i>epi</i> -7-F <sub>2t</sub> -DihomoIsoP	381.1	362.9	80	0	Negativa

## 6. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE FITOPROSTANOS EN MUESTRAS DE VINO Y MOSTO MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS

Para el análisis de FitoPs, se realizó una extracción a los vinos y mostos siguiendo el método de extracción de fase sólida para aceite desarrollado por Collado-González y col. (2015). Los cartuchos empleados para la extracción en

fase sólida fueron Strata X-AW Strata X-AW (Phenomenex, 100 mg, 3 mL<sup>-1</sup>; California, EE.UU), acondicionados con 2 mL de metanol seguido de 2 mL de agua. Se empleó 1 mL de muestra, la cual también se pasó a través de los cartuchos. Posteriormente, se lavaron con metanol:agua (1:3, *v:v*) seguido de 2 mL de acetonitrilo. Por último, la elución se realizó con 1 mL de metanol. Las muestras se desecaron al vacío y se reconstituyeron con 200 µL de mezcla de fases de elución A:B (90:10, *v:v*) y se pasaron a través de un filtro de 0.45 µm (Millipore, MA, EE.UU).

La separación cromatográfica de los FitoPs se realizó mediante una columna BEH C<sub>18</sub> (2.1 x 50 mm, 1.7 µm) (Waters, Milford, M. A., EE.UU.), y un UHPLC acoplado a espectrómetro de masas con triple cuadrupolo con interfase “electrospray” (modelo 6460, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La determinación de los FitoPs se realizó por triplicado, siguiendo el método de Collado-González y col. (2015). Las fases móviles A (agua) y B (metanol) contenían ambas 0,01% de ácido acético (*v:v*). La elución se llevó a cabo bajo flujo de 0.2 mL min<sup>-1</sup>. El análisis se hizo mediante MRM, con ionización en modo negativo (Tabla 4). La cuantificación de los FitoPs en vinos y mostos se realizó mediante comparación con patrones auténticos de 9-F<sub>1t</sub>-FitoP, 9-*epi*-9-F<sub>1t</sub>-FitoP, 16-B<sub>1</sub>-FitoP, *ent*-16-B<sub>1</sub>-FitoP, 9-L<sub>1</sub>-FitoP y *ent*-9-L<sub>1</sub>-FitoP (Collado-González y col., 2015).

**Tabla 4.** Características MRM para la determinación de fitoprostanos en UHPLC-MS/MS

Nombre del compuesto	Ion Precursor	Ion Resultante	Energía de fragmentación	Energía de colisión	Polaridad
16-B <sub>1</sub> -FitoP	307.2	235.2	70	0	Negativa
9-E <sub>1t</sub> -FitoP	325.2	307.2	80	0	Negativa
9- <i>epi</i> -9-F <sub>1t</sub> -FitoP	327.2	171.2	80	0	Negativa
9-L <sub>1</sub> -FitoP	307.1	185.2	70	0	Negativa
<i>ent</i> -16-B <sub>1</sub> -FitoP	307.2	289.2	70	0	Negativa
<i>ent</i> -16- <i>epi</i> -16-F <sub>1t</sub> -FitoP	327.2	251.2	80	0	Negativa
<i>ent</i> -16-F <sub>1t</sub> -FitoP	327.2	251.2	80	0	Negativa
<i>ent</i> -9-L <sub>1</sub> -FitoP	307.1	185.2	70	0	Negativa

## 7. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE HPLC-DAD

Las muestras de vino y mosto únicamente se procesaron para extraer los estilbenos, mientras que los demás compuestos fenólicos se midieron sin hacer ninguna extracción previa. Para la extracción de estilbenos, se emplearon 5 mL de acetato de etilo y 5 mL de hidrogenocarbonato de sodio (5% en agua) a un volumen de muestra de 3 mL. La mezcla se dejó decantar hasta a separación de las fases, momento en el que se desechó la fase fenólica previa cuantificación de su volumen. La fase que quedó arriba se desecó en rotavapor a 40 °C y se reconstituyó con 2 mL de metanol.

Antes de su análisis, las muestras de vino y de mosto se filtraron a través un filtro de 0.45 µm Millex- HV13 (Millipore, EE.UU.). Tras el filtrado, se inyectaron 20 µL de muestra, usando una columna de fase reversa Lichrocart RP-18 (Merck, Darmstadt, Alemania) (25 x 0.4 cm, 5 µm). Para su análisis mediante HPLC-DAD, se empleó una bomba Merck-Hitachi L-6200 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Alemania) y un detector de diodos Shimadzu SPD-M6A UV (Shimadzu, Kyoto, Japón). Las fases móviles fueron, agua:ácido fórmico (95:5, *v:v*) como fase A, y metanol de grado HPLC como fase B; mientras que el flujo utilizado fue de 1 mL min<sup>-1</sup>. La elución se realizó con un gradiente partiendo de un 2% de fase B, llegando a 32% de fase B a los 30 min, 40% de fase B a los 40 min, y 95% de fase B a los 50 min.

Los diferentes compuestos fenólicos detectados en las muestras de vinos y mostos, fueron identificados mediante sus espectros UV-Vis y la comparación cromatográfica con sus patrones originales. Los antocianos se cuantificaron mediante comparación cromatográfica con cianidina-3-rutinósido a 510 nm, mientras que los flavonoles fueron cuantificados mediante comparación cromatográfica con rutina a 360 nm. Por otra parte, los estilbenos y los derivados del ácido hidroxicinámico se cuantificaron mediante comparación cromatográfica con resveratrol y ácido clorogénico a 320 nm respectivamente. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Por último, la identificación de los restantes compuestos fenólicos se realizó mediante comparación de los tiempos de retención con la literatura anterior usando el mismo método y equipo de análisis

(Guerrero y col., 2009; Mulero y col., 2010; Mulero y col., 2011; Zafrilla y col., 2003).

## 8. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE HIDROXITIROSO Y SUS METABOLITOS EN MUESTRAS DE VINO Y MOSTO MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS

Para la extracción de OHTyr y sus metabolitos, las muestras de vinos y mostos se diluyeron en proporción 1:4 (500  $\mu$ L de cada muestra en 2 mL de agua:ácido fórmico (98:2, *v:v*)). Se emplearon cartuchos Strata X-AW (Phenomenex, California, EE.UU) para la SPE, y se acondicionaron con 4 mL de agua:ácido fórmico (98:2, *v:v*). Después de la adición de 1 mL de muestra, los cartuchos se lavaron con 2 mL de agua:ácido fórmico (98:2, *v:v*). Finalmente, se empleó 1 mL de metanol:ácido fórmico (98:2, *v:v*) para la extracción de los compuestos de interés, el volumen resultante se llevó a sequedad en condiciones de vacío. Las muestras se reconstituyeron en 150  $\mu$ L de mezcla agua:ácido fórmico (99.9:0.1, *v:v*) y metanol, en proporción (90:10, *v:v*). Después de un tratamiento suave con ultrasonidos, durante 10 min a temperatura ambiente, las muestras se pasaron a través de un filtro de 0.45  $\mu$ m Millex- HV13 (Millipore, EE.UU.) (Domínguez-Perles R, 2015).

La determinación de OHTyr y sus metabolitos se consiguió mediante un UHPLC, acoplado a espectrometría de masas con triple cuadrupolo con fuente de ionización "electrospray" (modelo 6460, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Para la separación cromatográfica se empleó una columna Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (1.7  $\mu$ m 2.1x50mm). Como fases móviles se emplearon agua:ácido fórmico (99.9:0.1, *v:v*) como fase A, y metanol como fase B. El perfil de elución fue: 20% de fase B (0 min), 95% de fase B (6 min), 100% de de fase B (7 min) y 20% B de fase (10 min). El flujo fue de 10  $\mu$ L min<sup>-1</sup>, mientras que el volumen de inyección fue de 3  $\mu$ L. Las condiciones ESI-MS/MS fueron: temperatura de gas: 225, voltaje de la boquilla: 1000, capilares de tensión (+): 3000, flujo de gas: 11, flujo de nebulizador: 10/40 (Domínguez-Perles R, 2015). Las transiciones MRM para cada uno de los compuestos se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Características MRM para la determinación de melatonina y derivados, triptófano, e hidroxitirosol y metabolitos en UHPLC-MS/MS

Nombre del compuesto	Ion Precursor	Ion Resultante	Energía de fragmentación	Energía de colisión	Polaridad
OH-melatonina glucurónico	423	232.1	115	5	Negativa
OH-melatonina	247	232.1	115	5	Negativa
Melatonina	233	174.1	90	0	Positiva
Serotonina	177	159.9	90	0	Positiva
Hidroxitirosol acetato	195	135	75	0	Negativa
Ácido homovanílico	181	136.8	75	5	Negativa
Alcohol homovanílico	167	122.6	80	0	Negativa
Hidroxitirosol	153.1	123	80	0	Negativa
Tirosol	137	92.9	80	0	Negativa
Triptófano	375.2	171	120	0	Positiva

## 9. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE MELATONINA Y SEROTONINA EN MUESTRAS DE VINO Y MOSTO MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS

Para el análisis de melatonina y serotonina, la extracción de los vinos y mostos, se realizó siguiendo el método desarrollado por Mena y col. (2012); (Rodríguez-Naranjo y col., 2011; Rodríguez-Naranjo y col., 2011). Se emplearon cartuchos Oasis C<sub>18</sub> los cuales se acondicionaron previamente con 2 mL de metanol, seguidos de 2 mL de agua MiliQ (Millipore, MA, EEUU). Acto seguido, 500 µL de cada muestra se pasaron a través de los cartuchos, y se lavaron con 2 mL de metanol:agua (10:90, *v:v*). Posteriormente, se eluyó con 1 mL de metanol y se evaporó hasta sequedad, bajo condiciones de vacío. Los sedimentos se suspendieron en metanol:agua (1:1, *v:v*) hasta una concentración de 3:1 (*v:v*). Tras un tratamiento suave con ultrasonidos, durante 10 minutos a temperatura ambiente, las muestras se pasaron a través de un filtro de 0.45 µm Millex- HV13 (Millipore, MA, EE.UU.).

La determinación y cuantificación de melatonina y de serotonina, se llevó a cabo el método publicado por Rodríguez-Naranjo y col. (2011). La separación de melatonina y serotonina, se realizó mediante un UHPLC, acoplado a un

espectrómetro de masas con tecnología de triple cuadrupolo equipado con fuente de ionización “electrospray” (modelo 6460 Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), empleando una columna Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 1.7 μm 2.1x50mm (Tabla 5). El gradiente consistió en agua como fase A y metanol como fase B, ambos con ácido fórmico al 0.1% (*v:v*). El perfil de elución fue: 40% de fase B a los 2 min, 85% de fase B a los 6 min y 90% de fase B a los 10 min. Finalmente, el flujo fue de 10 μL min<sup>-1</sup> y el volumen de inyección fue de 3 μL.

## 10. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE TRIPTÓFANO EN MUESTRAS DE VINO Y MOSTO MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS

El contenido en triptófano se determinó utilizando el método descrito anteriormente por Salazar y col. (2012), con las modificaciones de Collado-González (2014). Para el procesado, 500 μL de cada muestra se diluyó en 1 mL de tampón metanol:agua (1:1, *v:v*). Posteriormente, se incubaron en hielo seco durante 5 minutos, se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante 1 minuto, y se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 rpm (centrífuga 5804 R, Hamburgo, Alemania). Los sobrenadantes se transfirieron a un vial, mientras que los precipitados se volvieron a extraer con 500 μL de tampón. El estándar original de triptófano fue preparado en Bis-Tris (pH=6.5). El protocolo experimental fue el siguiente: en un vial de 2 mL se añadieron 350 μL de tampón de borato (0.2 M de sodio, pH=8.8), 5 mM EDTA disódico de calcio, y 50 μL de muestra diluida. Esta solución se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente, seguida de una incubación en bloque térmico a 55 °C durante 10 minutos. Los sobrenadantes se desecharon, mientras que el precipitado se volvió a extraer con 500 μL de tampón de extracción, se homogeneizaron, se incubaron en hielo, y se centrifugaron de nuevo. Finalmente, todos los sobrenadantes se combinaron, y los extractos se derivatizaron inmediatamente. Para la derivatización se siguió el protocolo de (Collado-González, 2014). Se realizó una mezcla de 350 μL de tampón borato (borato sódico 0.2 M, pH 8.8, con 5 mM de EDTA), 50 μL del patrón de triptófano y 100 μL de 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) reconstituido (polvo seco de AQC, llevado a 10 mM en acetonitrilo). Finalmente,

la mezcla se agitó y se calentó en placa calefactora a 55 °C durante 10 minutos. Antes de su análisis en UHPLC, mediante el método desarrollado por Collado-González (2014), las muestras se pasaron a través de un filtro de 0.45 µm Millex-HV13 (Millipore, EE.UU.).

Para la separación cromatográfica, se empleó una columna AccQ BEH Ultra Tag (2.1x100 mm, 1.7 µm) (Waters, Irlanda). Se utilizaron dos tipos de eluyentes para la separación por gradiente, la fase móvil A consistió en 50 mL de solución acuosa (acetonitrilo, ácido fórmico y de amonio en acetato de agua 5 mM; 10:6:84, *v:v:v*) y 950 mL de agua; mientras que, la fase móvil B consistió en una mezcla de acetonitrilo y ácido fórmico (99.9:0.1, *v:v*). El volumen de inyección fue de 20 µL y el flujo de 0.5 mL min<sup>-1</sup>. La evolución del gradiente fue la siguiente: 99.9% de fase A hasta los 0.5 min, 90.9% de fase A hasta los 5.7 min, 78.8% de fase A hasta los 7.7 min, 40.4% de fase A hasta los 8-10 min, 10% de fase A hasta los 10.01 a 12 min y 99.9% de fase A hasta los 12.01-14 min. Las condiciones de MRM se muestran en la Tabla 5.

## **11. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE CATABOLITOS DE ADN EN MUESTRAS DE PLASMA MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS**

Como paso previo al análisis de las muestras de plasma, éstas se procesaron mediante SPE. La extracción de los catabolitos de ADN se realizó con cartuchos ISOLUTE (Env, 1 mL, 50 mg), siguiendo el protocolo de Lam y col. (2012) para 8-OH-2'-desoxiguanosina con algunas modificaciones para aumentar el número de compuestos a estudio. El plasma fue desproteínizado con sulfato de Zinc 495.2 mM y diluido en agua (1:1, *v:v*), los cartuchos se acondicionaron con 1 mL de metanol y se equilibraron con 1 mL de agua. Tras introducir las muestras en los cartuchos, se lavaron dos veces con 300 mL de agua. Finalmente, se extrajeron con 300 mL de acetonitrilo:metanol (20:80, *v:v*). Las muestras se llevaron hasta sequedad total bajo presión positiva y se reconstituyeron en 50 mL de fase B (2.5 nM ácido acético:acetato de amonio pH=3.9), para analizarlas en el UHPLC-QqQ-MS/MS.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo mediante UHPLC acoplado a espectrómetro de masas con triple cuadrupolo con fuente de ionización “electrospray” (modelo 6460, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La separación cromatográfica se realizó mediante una columna Kinetex HILIC (100x2.1 mm, 1.7  $\mu$ m). La temperatura de la columna se ajustó a 27 °C para ambos extremos. El método utilizado fue el desarrollado por Villaño y col. (2015). Las fases móviles empleadas fueron acetonitrilo como fase A y ácido acético:acetato de amonio 2.5 nM (pH=3.9), como fase B. El gradiente empezó con un 30% de fase B y a los dos minutos se incrementó hasta un 95% hasta los 6 minutos, con un post-run de 2 minutos. El flujo y el volumen de inyección fueron 0.2 mL min<sup>-1</sup> y 20  $\mu$ L, respectivamente. El análisis se realizó mediante UHPLC-QqQ-MS/MS con fuente de ionización “electrospray” en modo negativo y positivo, dependiendo del analito y usando MRM (Tabla 6).

**Tabla 6.** Características MRM para la determinación de catabolitos de DNA en UHPLC-MS/MS

Nombre del compuesto	Ion Precursor	Ion Resultante	Energía de fragmentación	Energía de colisión	Polaridad
8-NO <sub>2</sub> -cGMP	389	194.7	110	0	Negativa
cGMP	346	151.9	110	0	Positiva
8- NO <sub>2</sub> -guanosina	327.1	194.8	110	10	Negativa
8-OH-guanosina	298	207.7	80	0	Negativa
8-OH-2'-desoxiguanosina	284.3	167.8	110	0	Positiva
8- NO <sub>2</sub> -guanina	195.1	178	80	5	Negativa
8-OH-guanina	168.1	140.3	80	15	Positiva
8-feniltioadenosina	376.1	244	100	0	Positiva

## 12. PRUEBAS ESTADÍSTICAS REALIZADAS PARA COMPROBAR LA RELACIÓN ENTRE LA INGESTA DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS PRESENTES EN EL VINO Y LOS DIFERENTES MARCADORES ESTUDIADOS

Las diferentes pruebas estadísticas realizadas para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han ejecutado con el programa IMB statistics SPSS 21.



Con el fin de comprobar la variabilidad dentro de las diferencias observadas tras el desarrollo del estudio, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con todos los datos obtenidos.

Para determinar la implicación individual de los distintos compuestos bioactivos y el TPC en la excreción urinaria de los distintos marcadores, se realizó un análisis de regresión simple ( $R^2$ ). Este método estadístico, permite conocer la relación individual de cada uno de los compuestos bioactivos y el total de compuestos fenólicos (TPC) con los marcadores a estudio.

Sin embargo, y puesto que tanto los vinos como los mostos son matrices compuestas por diversos compuestos de interés, es imprescindible estudiar todas las relaciones de forma simultánea. Para ello, los resultados obtenidos tras la determinación de la regresión simple se contrastaron con un análisis de regresión múltiple por pasos sucesivos (stepwise). Esta prueba estadística, se basa en la inclusión de las distintas variables a estudio dentro de un modelo de regresión, condicionado por el valor de significancia ( $p$ ). En cada paso se introduce la variable independiente (MEL, OHTyr, HV-Acid, HV-Alc y TPC), que no se encuentre ya en la ecuación y que tenga la probabilidad para  $p$  más pequeña, si esa probabilidad es suficientemente pequeña ( $p \leq 0.05$ ). Las variables ya introducidas en la ecuación de regresión, se eliminan de ella si su probabilidad para  $p$  es mayor que las nuevas variables introducidas en la ecuación. El método termina cuando ya no hay más variables candidatas a ser incluidas o eliminadas.

Así pues, mediante la correlación múltiple por pasos sucesivos se pueden tratar todas las variables independientes de forma simultánea. De este modo se puede conocer el peso estadístico de cada una dentro la misma matriz mediante, el coeficiente de determinación ( $R^2$  para las variables dependientes seleccionadas). Este coeficiente de determinación indica la cantidad de cambio en puntuaciones típicas, que se producirá en la variable dependiente (los distintos marcadores a estudio) por cada cambio de una unidad en la variable independiente (MEL, OHTyr, HV-Acid, HV-Alc y TPC).

De forma práctica, el coeficiente de determinación indicará el porcentaje de cambio de los marcadores que se explica mediante la ingesta de los diferentes compuestos bioactivos y/o el TPC.



## **CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS MOSTOS Y VINOS EN BASE A SU CONTENIDO EN POLIFENOLES, MELATONINA E HIDROXITIROSOLO Y SUS METABOLITOS

### 1.1. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL MOSTO Y DE VINO

El análisis de los compuestos fenólicos presentes en los vinos y mostos analizados mostró cinco antocianinas (delfinidina-3-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-glucósido, petunidina-3-*O*-glucósido, peonidin-3-*O*-glucósido y malvidina-3-*O*-glucósido), cuatro derivados del ácido hidroxicinámico (ácido caftarico, ácido *p*-cumárico, ácido fertárico y ácido cutárico), seis flavonoles (miricetina-3-*O*-glucósido, quercetina-3-*O*-glucósido, quercetina-3-*O*-rutinosido, kaempferol-3-*O*-glucósido, miricetina y quercetina) y dos estilbenos (*trans*-piceido y *trans*-resveratrol). Las concentraciones encontradas de cada compuesto fenólico se muestran en la Tabla 7.

Las antocianinas (glucósidos de antocianos) son los compuestos fenólicos mayoritarios que se pueden encontrar en vinos y mostos. En conjunto, el mayor contenido total de antocianinas (TAC) se halló en CMW ( $p > 0.05$ ) seguido por AW, alcanzando  $361.7 \pm 11.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $174.5 \pm 5.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Sin embargo, el TAC encontrado en HEW fue significativamente menor, únicamente  $58.6 \pm 0.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En cuanto a los mostos, CMM y AM fueron los que mostraron el menor TAC,  $68.4 \pm 3.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $71.6 \pm 3.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. A su vez, HEM mostró un TAC casi dos veces mayor ( $p < 0.05$ ) ( $124.5 \pm 4.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que los dos mostos anteriores. HEM proviene de las uvas de cepas muy viejas (más de 50 años), que se encuentran expuestas a un estrés mayor que las cepas más jóvenes (Soleas y col., 1997), lo que puede explicar el mayor TAC en comparación con CMM y AM. Como puede apreciarse, el TAC encontrado en CMM y AM fue significativamente menor que el de sus dos vinos terminados (CMW y AW). Esto indica un incremento en el contenido de antocianinas durante el proceso de elaboración del vino, demostrando un cambio en el perfil de antocianinas durante la crianza de larga de duración (Boido y col., 2011; Flanzy, 2000).

**Tabla 7.** Contenido de polifenoles de las distintas muestras estudiadas

	CMW	CMM	AW	AM	HEW	HEM
Delfinidina-3-O-glucósido	55.9±2.1 <sup>a</sup>	12.1±0.5 <sup>cd</sup>	39.8±0.4 <sup>b</sup>	12.9±1.1 <sup>cd</sup>	11.3±0.7 <sup>d</sup>	14.6±1.4 <sup>c</sup>
Cianidina-3-O-glucósido	2.4±0.05 <sup>bc</sup>	4.0±0.1 <sup>b</sup>	3.4±0.09 <sup>bc</sup>	3.6±0.08 <sup>b</sup>	0.6±0.04 <sup>c</sup>	7.2±0.8 <sup>a</sup>
Petunidina-3-O-glucósido	54.7±1.2 <sup>a</sup>	9.1±0.5 <sup>d</sup>	30.2±0.2 <sup>b</sup>	9.1±0.9 <sup>d</sup>	8.1±0.0 <sup>d</sup>	13.8±0.5 <sup>c</sup>
Peonidina-3-O-glucósido	11.7±1.0 <sup>b</sup>	7.3±1.5 <sup>c</sup>	10.9±0.3 <sup>b</sup>	7.3±0.7 <sup>c</sup>	3.3±0.04 <sup>d</sup>	14.6±1.9 <sup>a</sup>
Malvidina-3-O-glucósido	236.8±10 <sup>a</sup>	35.8±2.3 <sup>d</sup>	90.1±5.1 <sup>b</sup>	38.5±20.0 <sup>d</sup>	35.1±0.1 <sup>c</sup>	74.1±3.9 <sup>d</sup>
TOTAL antocianinas	361.7±11.2 <sup>a</sup>	68.4±3.7 <sup>d</sup>	174.5±5.9 <sup>b</sup>	71.6±3.2 <sup>d</sup>	58.6±0.4 <sup>c</sup>	124.5±4.6 <sup>d</sup>
Ácido caftarico	45.1±4.5 <sup>bc</sup>	0.5±0.02 <sup>d</sup>	48.8±0.03 <sup>ab</sup>	0.3±0.02 <sup>d</sup>	55.7±4.7 <sup>a</sup>	2.3±0.2 <sup>d</sup>
Ácido <i>p</i> -coumárico	1.3±0.07 <sup>c</sup>	-	10.5±0.7 <sup>b</sup>	-	14.4±1.04 <sup>a</sup>	-
Ácido fertárico	0.7±0.04 <sup>c</sup>	-	2.4±0.08 <sup>b</sup>	-	5.2±0.3 <sup>a</sup>	-
Ácido cuotárico	40.8±1.7 <sup>a</sup>	0.3±0.06 <sup>d</sup>	13.6±0.3 <sup>c</sup>	0.2±0.02 <sup>d</sup>	20.5±0.7 <sup>b</sup>	1.1±0.0 <sup>d</sup>
TOTAL derivados ácido hidroxicinámico	87.9±6.3 <sup>a</sup>	0.9±0.08 <sup>c</sup>	75.5±1.1 <sup>b</sup>	0.5±0.04 <sup>c</sup>	95.8±6.7 <sup>a</sup>	3.4±0.2 <sup>c</sup>
Miricetina-3-O-glucósido	3.9±0.06 <sup>a</sup>	1.0±0.04 <sup>c</sup>	4.2±0.2 <sup>a</sup>	1.0±0.04 <sup>c</sup>	2.8±0.2 <sup>b</sup>	1.2±0.05 <sup>c</sup>
Quercetina-3-O-glucósido	2.3±0.2 <sup>c</sup>	0.6±0.1 <sup>d</sup>	3.3±0.1 <sup>b</sup>	0.6±0.09 <sup>d</sup>	6.8±0.2 <sup>a</sup>	0.7±0.1 <sup>d</sup>
Quercetina-3-O-rutinósido	33.3±1.8 <sup>b</sup>	2.1±0.1 <sup>d</sup>	24.9±3.3 <sup>c</sup>	2.0±0.1 <sup>d</sup>	49.7±5.2 <sup>a</sup>	2.4±0.1 <sup>d</sup>
Kaempferol-3-O-glucósido	10.1±1.2 <sup>b</sup>	2.5±0.1 <sup>d</sup>	6.4±0.3 <sup>c</sup>	2.3±0.1 <sup>d</sup>	18.8±1.2 <sup>a</sup>	2.9±0.1 <sup>d</sup>
Miricetina	5.1±0.1 <sup>a</sup>	1.8±0.1 <sup>d</sup>	2.3±0.1 <sup>c</sup>	1.7±0.1 <sup>d</sup>	3.7±0.1 <sup>b</sup>	2.1±0.1 <sup>cd</sup>
Quercetina	3.2±0.1 <sup>b</sup>	1.7±0.2 <sup>cd</sup>	1.2±0.03 <sup>d</sup>	1.6±0.2 <sup>cd</sup>	4.8±0.1 <sup>a</sup>	2.06±0.2 <sup>c</sup>
TOTAL flavonoles	58.1±1.3 <sup>b</sup>	10.0±0.3 <sup>c</sup>	42.5±4.1 <sup>b</sup>	9.4±0.3 <sup>c</sup>	86.8±4.2 <sup>a</sup>	11.5±0.6 <sup>c</sup>
<i>Trans</i> -piceido	0.2±0.02 <sup>b</sup>	0.1±0.01 <sup>c</sup>	0.2±0.01 <sup>b</sup>	0.08±0.01 <sup>c</sup>	0.5±0.04 <sup>a</sup>	0.2±0.03 <sup>b</sup>
<i>Trans</i> -resveratrol	4.8±1.0 <sup>a</sup>	0.8±0.06 <sup>d</sup>	2.1±0.1 <sup>c</sup>	0.7±0.1 <sup>d</sup>	3.3±0.2 <sup>b</sup>	0.8±0.06 <sup>d</sup>
TOTAL estilbenos	5.1±1.0 <sup>a</sup>	0.9±0.1 <sup>c</sup>	2.3±0.1 <sup>b</sup>	0.8±0.1 <sup>c</sup>	3.9±0.2 <sup>a</sup>	1.1±0.1 <sup>bc</sup>
Total fenoles (TPC)	513.0±20.0 <sup>a</sup>	80.3±4.1 <sup>cd</sup>	294.8±11.4 <sup>b</sup>	82.5±3.6 <sup>cd</sup>	245.3±12.0 <sup>b</sup>	140.7±5.2 <sup>c</sup>

Los resultados se expresan en  $\mu\text{g mL}^{-1}\pm\text{SD}$ . WR: Ron blanco; CMW/CMM: vino/mosto de maceración carbónica; AW/AM: vino/mosto crianza; HEW/HEM: vino/mosto de autor.

De los cinco glucósidos de antocianos, la principal antocianina tanto en vinos como en mostos, fue la malvidina-3-O-glucósido ( $p<0.05$ ). El contenido de malvidina-3-O-glucósido en CMW fue especialmente notable ( $236.8\pm 10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), lo que influye en el TAC mostrado por CMW en gran medida. Por otra parte, la delfinidina-3-O-glucósido y la petunidina-3-O-glucósido también destacaron con

respecto a las demás antocianinas, viéndose reflejado en los similares valores encontrados ( $55.9 \pm 2.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $54.7 \pm 1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente).

El contenido total de los derivados del ácido hidroxicinámico (THC) mostró unas diferencias muy marcadas entre las muestras, dando lugar a dos grupos diferenciados (Tabla 7). Los tres vinos contenían un THC muy elevado, destacando ( $p < 0.05$ ) CMW ( $87.9 \pm 6.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y HEW ( $95.8 \pm 6.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) más que AW ( $75.5 \pm 1.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Sin embargo, ninguno de los tres mostos mostró cantidades significativas de THC, mostrando valores comprendidos entre  $0.5 \pm 0.04 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $3.4 \pm 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . El contenido individual de los derivados del ácido hidroxicinámico, también se puede dividir en dos grupos diferenciados. El ácido caftárico y el ácido cutárico fueron los principales representantes de esta familia de polifenoles, y se encontraron principalmente en los vinos terminados. Sobre todo, el contenido de ácido caftárico fue mayor ( $p < 0.05$ ) en HEW ( $55.7 \pm 4.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), mientras que el mayor contenido de ácido cutárico ( $p < 0.05$ ) perteneció principalmente a CMW ( $40.8 \pm 1.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Por el contrario, el ácido *p*-cumárico y ácido fertárico, fueron compuestos con una importancia relativa en los vinos tintos, siendo indetectables en los mostos.

El contenido total de flavonoles (TFC), presentó una distribución similar a la observada previamente para el THC. Los tres vinos mostraron un mayor TFC en comparación con los mostos ( $p < 0.05$ ). El TFC más alto se encontró en HEW ( $40.8 \pm 1.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ( $p < 0.05$ ), seguido de CMW ( $58.1 \pm 1.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y AW ( $42.5 \pm 4.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A su vez, el TFC de los mostos, comprendió valores entre  $9.4 \pm 0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $11.5 \pm 0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Tras el análisis de los diferentes flavonoles identificados en las muestras de vino y mosto, se comprobó que la quercetina-3-*O*-rutinósido y el kaempferol-3-*O*-glucósido eran los flavonoles mayoritarios. Ambos compuestos se encontraron principalmente en HEW ( $49.7 \pm 5.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quercetina-3-*O*-rutinósido y  $18.8 \pm 1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de kaempferol-3-*O*-glucósido).

Por último, el contenido total de estilbenos (TEC) fue mayor ( $p < 0.05$ ) en CMW y en HEW, con  $5.1 \pm 1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $3.9 \pm 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Mientras tanto el TEC de AW fue  $2.3 \pm 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , muy similar al obtenido tras analizar HEM ( $1.1 \pm 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Finalmente, los menores valores de TEC se observaron en CMM ( $0.9 \pm 0.07 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y AM ( $0.8 \pm 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). El principal estilbeno, encontrado tanto en vinos como en mostos, fue el *trans*-resveratrol. El mayor contenido de *trans*-resveratrol se encontró tras el análisis de CMW ( $4.8 \pm 1.0$

$\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A pesar de que AW y HEW presentaron concentraciones de *trans*-resveratrol superiores a las encontradas en los mostos ( $p < 0.05$ ) ( $2.1 \pm 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  en AW y  $3.3 \pm 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  en HEW), estos valores fueron menores que los que presentó CMW ( $p < 0.05$ ). Finalmente, los valores de *trans*-resveratrol encontrados en los distintos mostos estuvieron comprendidos entre  $0.7 \pm 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $0.8 \pm 0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 1.2. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE MELATONINA Y SEROTONINA EN VINOS Y MOSTOS

El análisis por UHPLC-MS/MS, ha demostrado ser un método fiable y útil en la identificación de melatonina (MEL), en muestras de vino (Rodríguez-Naranjo y col., 2011; Rodríguez-Naranjo y col., 2011). Por ello fue utilizado durante el desarrollo de los análisis. El contenido de MEL fluctuó mucho de una muestra a otra, sin embargo ninguna muestra de vino o mosto presentó una concentración significativa de serotonina.

Tras el análisis de las muestras, la concentración de MEL se dividió claramente en dos grupos diferentes en base a su concentración en las muestras (Tabla 8). El análisis de los mostos, mostró una concentración de MEL muy similar entre ellos ( $p > 0.05$ ), además de resultar significativamente inferior a la encontrada en los vinos ( $p < 0.05$ ). La cantidad de MEL encontrada en CMM fue de  $0.4 \pm 0.03 \text{ ng mL}^{-1}$  y de  $1.2 \pm 0.1 \text{ ng mL}^{-1}$  en AM. Finalmente, se detectó  $0.03 \pm 0.004 \text{ ng mL}^{-1}$  en HEM. Los resultados contrastan con los obtenidos en los vinos, debido a la formación de MEL durante el proceso de fermentación del mosto a través del metabolismo de las levaduras (Rodríguez-Naranjo y col., 2011).

Así pues, la mayor cantidad de MEL ( $p < 0.05$ ) se observó en CMW ( $161.8 \pm 7.1 \text{ ng mL}^{-1}$ ), mientras que los restantes dos vinos presentaron una concentración de MEL significativamente menor ( $p < 0.05$ ). En AW se encontraron  $26.3 \pm 1.3 \text{ ng mL}^{-1}$  de MEL, así como  $19.6 \pm 1.1 \text{ ng mL}^{-1}$  en HEW.



### 1.3. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE HIDROXITIRO SOL Y SUS METABOLITOS EN VINOS Y MOSTOS

Una de las mayores fuentes de hidroxitirosol (OHTyr) en la dieta es el vino tinto (Fernández-Mar y col., 2012). El análisis de OHTyr y sus metabolitos, mostró cantidades significativas tanto de OHTyr como de sus dos metabolitos principales, el ácido homovanílico (HV-Acid) y el alcohol homovanílico (HV-Alc) (Tabla 8).

Los mostos aportaron una gran concentración de HV-Acid, aunque menor concentración de HV-Alc y una cantidad muy pequeña de OHTyr. La cantidad más alta de HV-Acid se encontró en CMM ( $130.7 \pm 1.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), seguido de AM y de HEM ( $112.4 \pm 3.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $101.0 \pm 2.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente). La cantidad de HV-Alc en mostos varió con respecto a la de HV-Acid. Así pues, la mayor concentración de HV-Alc se detectó en HEM ( $60.5 \pm 1.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); mientras que para CMM y AM se observó una cantidad inferior de HV-Alc ( $14.6 \pm 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $16.2 \pm 1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente).

Los vinos presentaron menor cantidad de HV-Acid que los mostos ( $p < 0.05$ ). La cantidad encontrada para cada vino fue de  $83.4 \pm 13.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para CMW,  $74.3 \pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$  para AW y de  $75.9 \pm 7.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  para HEW. El análisis de HV-Alc en vinos pareció seguir la tendencia contraria, aumentando su concentración tras la vinificación en el caso de CMW ( $189.2 \pm 8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y de AW ( $65.5 \pm 1.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Sin embargo, la cantidad de HV-Alc en HEW no fue superior ( $51.5 \pm 6.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a la de su mosto (HEM). El aumento de HV-Alc producido tras la vinificación en caso de CMW y AM, contrasta con la ligera bajada que se produjo tras la vinificación en caso de HEW.

La diferencia más importante en cuanto a las consecuencias de la vinificación está marcada por el incremento de OHTyr ( $p < 0.05$ ). Como resultado, HEW mostró la mayor cantidad de OHTyr de todas las muestras del estudio ( $35.1 \pm 2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), seguido de AW ( $29.6 \pm 0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y CMW ( $16.1 \pm 2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Las diferencias entre los distintos vinos fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Finalmente, ninguno de los mostos analizados mostraron concentraciones mayores a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 1.4. CUANTIFICACIÓN DE TRIPTÓFANO EN MOSTO Y VINO

El proceso de vinificación es clave en el contenido de triptófano (TRP) de los vinos terminados. De hecho, los mostos presentaron una cantidad de este compuesto significativamente superior a la observada para sus vinos terminados ( $p < 0.05$ ) (Tabla 8). Las concentraciones más altas de TRP se encontraron en HEM ( $573.1 \pm 38.0$  ng mL<sup>-1</sup>), seguido de CMM ( $155.7 \pm 14.6$  ng mL<sup>-1</sup>) y de AM ( $144.2 \pm 11.0$  ng mL<sup>-1</sup>). Puede observarse que la duración del proceso de crianza también parece ser un factor clave en el contenido total de TRP. En efecto, CMW (el cual no tiene proceso de crianza) mostró una cantidad superior de TRP ( $79.1 \pm 2.2$  ng mL<sup>-1</sup>) que los otros dos vinos, que sí incluían periodos de envejecimiento ( $2.7 \pm 0.3$  ng mL<sup>-1</sup> en AW y  $17.7 \pm 1.7$  ng mL<sup>-1</sup> en HEW).

**Tabla 8.** Caracterización de los vinos y los mostos en base a su contenido de compuestos bioactivos y triptófano

	TRP (ng mL <sup>-1</sup> )	MEL (ng mL <sup>-1</sup> )	Etanol (gr dosis*)	Hidroxitirosol y metabolitos (µg mL <sup>-1</sup> )		
				HV-Acid	HV-Alc	OHTyr
WR	-	-	4.14	-	-	-
CMW	$79.1 \pm 2.2^c$	$161.8 \pm 7.1^a$	4.14	$83.4 \pm 13.5^c$	$189.2 \pm 8.7^a$	$16.1 \pm 2.9^b$
CMM	$155.7 \pm 14.6^b$	$0.4 \pm 0.03^d$	-	$130.7 \pm 1.3^a$	$14.6 \pm 0.1^c$	$0.5 \pm 0.05^c$
AW	$2.7 \pm 0.3^e$	$26.3 \pm 1.3^b$	4.14	$74.3 \pm 0.6^c$	$65.5 \pm 1.3^b$	$29.6 \pm 0.4^a$
AM	$144.2 \pm 11.0^b$	$1.2 \pm 0.1^{c,d}$	-	$112.4 \pm 3.1^{a,b}$	$16.2 \pm 1.0^c$	$0.9 \pm 0.09^c$
HEW	$17.7 \pm 1.7^d$	$19.6 \pm 1.1^b$	4.14	$75.9 \pm 7.2^c$	$51.5 \pm 6.2^b$	$35.1 \pm 2.5^a$
HEM	$573.1 \pm 38.0^a$	$0.03 \pm 0.004^d$	-	$101.0 \pm 2.2^{a,b}$	$60.5 \pm 1.3^b$	$0.5 \pm 0.03^c$

TRP: Triptófano; MEL: Melatonina; HV-Acid: Ácido homovanílico; HV-Alc: Alcohol homovanílico; OHTyr: Hidroxitirosol; WR: Ron blanco; CMW/CMM: vino/mosto de maceración carbónica; AW/AM: vino/mosto crianza; HEW/HEM: vino/mosto de autor. \* Se considera como la dosis total ingerida durante 48 horas: 74 mL de ron blanco y 200 mL de vino y mosto.

### 1.5. EVOLUCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DURANTE LA VINIFICACIÓN

La evolución de los compuestos fenólicos, durante la elaboración del vino y los procesos de envejecimiento en barrica, se ve influida principalmente por dos tipos de mecanismos (Marín, 2003). El primero comprende una serie de reacciones bioquímicas, catalizadas por enzimas (polifenol oxidasa y *beta*-glucosidasas), producidas principalmente en las primeras etapas del proceso de elaboración del vino tinto. Mientras tanto, el segundo se refiere a las reacciones químicas (como reacciones de copigmentación o condensación) que tienen lugar durante la vinificación, y que se mantienen durante el proceso de crianza de los vinos. Estas reacciones conducen a la formación de nuevas moléculas por la ruptura de enlaces covalentes, e interacciones moleculares establecidas por enlaces débiles (Flanzy, 2000; Marín, 2003).

El estudio de la composición fenólica de los mostos analizados mostró valores de TPC comprendidos entre  $80.3 \pm 4.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $140.7 \pm 5.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Dichos valores aumentaron después del proceso de vinificación, como se puede apreciar tras el análisis de su vino finalizado, CMW. De hecho, CMW ( $513.0 \pm 20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) fue el vino que mostró mayores valores de TPC. Sin embargo, el proceso de envejecimiento al que se someten los vinos de crianza, deriva en una disminución muy acusada del TPC. Esto se puede apreciar al observar los valores de TPC de AW ( $294.8 \pm 11.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y HEW ( $245.3 \pm 12.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), los cuales fueron muy reducidos en comparación con los de CMW (sin proceso de crianza).

Por lo tanto, el proceso de vinificación deriva en el aumento de los valores de TPC de los tres vinos, comparados con sus mostos de origen (Mulero y col., 2010; Mulero y col., 2011; Zafrilla y col., 2003). Sin embargo, los periodos de envejecimiento empleados para la elaboración de AW y HEW, causan la disminución del TPC de estos vinos en comparación con CMW. No obstante, ambos vinos presentan un TPC más alto que sus mostos de origen AM y HEM. Como se mencionó anteriormente, durante la vinificación y el envejecimiento de los vinos de crianza se producen reacciones nucleófilas, además de interacciones electrostáticas entre los flavonoides (antocianinas y proantocianidinas) y otros componentes del vino (Flanzy, 2000; Marín, 2003). Por otra parte, la escisión enzimática del enlace glucosídico de algunos flavonoles y antocianinas produce la

liberación de compuestos más inestables y fácilmente degradables que sus compuestos de origen. Estos factores, conducen a un aumento inicial de la composición fenólica de vinos, seguido por los cambios en el perfil fenólico a lo largo del período de envejecimiento (Marín, 2003). Finalmente, en el proceso de envejecimiento con barricas de roble el vino está continuamente en contacto con el oxígeno ambiental. Esto deriva en la formación de especies pro-oxidantes, como radicales libres, lo que podría dar lugar a la degradación de los diferentes polifenoles (García-Falcón y col., 2007; Oliveira y col., 2011).

El TPC observado tras el análisis de los vinos y mostos de la presente Tesis Doctoral no fue relevante en comparación con otras variedades de uva (Cantos y col., 2000; García-Falcón y col., 2007; Zafrilla y col., 2003). De hecho un estudio llevado a cabo en uvas de la variedad "Tempranillo", demostró que esta variedad tenía un TPC menor que otras variedades de uva (Guerrero y col., 2009). Otros estudios, también han demostrado una mayor concentración de polifenoles totales en vinos de uva "Tempranillo" que la encontrada en las 3 muestras de vino analizadas (Cantos y col., 2003; Diago y col., 2012; Guerrero y col., 2009). Sin embargo, el perfil de polifenoles de los vinos y mostos fue similar al obtenido en los vinos de uvas de distintas variedades, entre las que se incluye "Tempranillo" (Cantos y col., 2000; García-Falcón y col., 2007; Zafrilla y col., 2003).

Como se ha comentado en apartados anteriores de esta Tesis, los efectos beneficiosos derivados del consumo moderado de vino tinto se han atribuido principalmente a los polifenoles (Renaud & De Lorgeril, 1992). Además de su capacidad antioxidante, los polifenoles son capaces de ejercer efectos vasodilatadores, anticancerígenos y neuroprotectores (gracias a la capacidad de los antocianos y del *trans*-resveratrol de atravesar la barrera hematoencefálica) (Artero y col., 2015; Schaffer & Halliwell, 2012). Aun teniendo en cuenta los efectos en la salud de los polifenoles en el organismo humano, la literatura científica demuestra una biodisponibilidad muy baja (Bouayed y col., 2012; Bouayed y col., 2011; Tagliazucchi y col., 2010). Por lo tanto, a pesar de la capacidad antioxidante de los polifenoles y su importancia en las matrices de vino y de la uva, su limitada absorción parece ser un factor limitante a la hora de considerar la ingesta de polifenoles como el factor clave en los efectos beneficiosos derivados de la ingesta de vino tinto. De este modo, queda pendiente de

demostrar si el contenido de MEL, OHTyr u otros compuestos bioactivos pudiera ser parcialmente responsable de dichos efectos.

A juzgar por los resultados, una mayor duración del proceso de envejecimiento produce un descenso del contenido de MEL. De hecho, el tiempo de crianza junto al tipo de levadura o la temperatura, puede condicionar el contenido total de MEL (Rodríguez-Naranjo y col., 2011; Rodríguez-Naranjo y col., 2011). En este sentido, HEW con una crianza de 22 meses de duración, presentó un menor contenido de MEL ( $19.6 \pm 1.1 \text{ ng mL}^{-1}$ ) que AW ( $26.3 \pm 1.3 \text{ ng mL}^{-1}$ ), con 14 meses de crianza. Mientras que CMW, sin ningún proceso de envejecimiento en barrica, mostró un contenido de MEL ( $161.8 \pm 7.1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) superior a los dos vinos envejecidos (AW y HEW). Estos resultados están en concordancia con investigaciones previas. En un estudio previo, Rodríguez-Naranjo y col. (2011) encontraron variaciones similares en vinos de la variedad "Tempranillo" tras la crianza. De este modo, los vinos sin tratamiento de crianza parecen ser más ricos en MEL que los vinos envejecidos en barricas de roble. Es importante comentar que éste hecho puede deberse a los compuestos prooxidantes generados por la madera de roble y a los que se producen durante la crianza del vino (al igual que ocurre con los polifenoles) (Jackson, 2008), los cuales podrían conllevar a una degradación o pérdida de la MEL. Además, la pre-fermentación que se produce en la producción de vinos de maceración carbónica como CMW, puede dar lugar a la formación de compuestos nitrogenados, susceptibles de ser usados por las levaduras (Rodríguez-Naranjo y col., 2011). De este modo, se podría potenciar la síntesis de MEL en CMW por procesos que no tienen lugar en la vinificación de AW o HEW.

Otros estudios, como el de Vitalini y col. (2013), muestran una concentración de MEL menor de  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ . Esto representa un contenido de MEL mucho menor que el encontrado para los vinos estudiados en la presente Tesis. Además, otras matrices alcohólicas procedentes de la fermentación de granada (Mena y col., 2012), zumo de naranja fermentado (Fernández-Pachón y col., 2014) o cerveza (Maldonado y col., 2009), también han demostrado menor contenido de MEL que los vinos tintos.

La disminución del contenido de MEL coincide con otros autores, Rodríguez-Naranjo y col. (2011) publicaron una disminución en el contenido de

MEL en vinos procedentes de uvas de la variedad “Tempranillo”, tras la estabilización de los mismos. En vino de granada, también se vio una disminución del contenido en MEL tras el almacenamiento del vino resultante (Mena y col., 2012). Atendiendo a la literatura científica se describen dos métodos por los cuales puede ocurrir este proceso. Por un lado, el metabolismo de la microbiota puede degradar MEL hasta otros compuestos. Por otro lado, los procesos oxidativos mencionados anteriormente pueden oxidar la molécula de MEL hasta N1-acetil-N2-formil-5-metoxikynuramina (AFMK) y N1-acetyl-5-metoxikynuramina (AMK) en última instancia, dos metabolitos de importancia en la salud humana.

La MEL, también podría formarse a través de la fermentación alcohólica del TRP, vía 5-hidroxitriptofano (Fernández-Pachón y col., 2014; Rodríguez-Naranjo y col., 2011; Sprenger y col., 1999). No obstante, los tres mostos presentaron un mayor contenido en TRP ( $155.7 \pm 14.6$  ng mL<sup>-1</sup> para CMM,  $144.2 \pm 11.0$  ng mL<sup>-1</sup> para AM y  $573.1 \pm 38.0$  ng mL<sup>-1</sup> para HEM), comparado con sus tres vinos terminados ( $79.1 \pm 2.2$  ng mL<sup>-1</sup> para CMW  $2.7 \pm 0.3$  ng mL<sup>-1</sup> para AW y  $17.7 \pm 1.7$  ng mL<sup>-1</sup> para HEW). Sin embargo, el rol del TRP en la producción de MEL por las levaduras es todavía incierto. De hecho, los datos de este estudio no sustentan la teoría de la producción de MEL mediante TRP, aun teniendo en cuenta la disminución en el contenido de TRP tras la vinificación de los tres vinos. Para comprobarlo se realizó una correlación de Pearson, la cual resultó no ser estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

Se ha publicado un aumento en la síntesis de MEL tras la fortificación de diferentes zumos con TRP durante de la fermentación (Mena y col., 2012; Rodríguez-Naranjo y col., 2011). Sin embargo, este incremento no se ha visto reflejado en la concentración final de MEL en el zumo fermentado alcohólicamente. En otro estudio se midió el contenido de MEL durante la fermentación de zumo de naranja, detectándose una disminución de TRP durante la fermentación alcohólica, inversamente proporcional al incremento de MEL (Fernández-Pachón y col., 2014).

En cuanto al contenido de OHTyr, los resultados muestran gran disparidad entre vinos y mostos. El contenido de OHTyr en vinos es muy superior al de los mostos de origen ( $p < 0.05$ ). De hecho, la formación de OHTyr a partir de tirosol en

mostos ha sido propuesto como el principal mecanismo para la producción de OHTyr en vinos (Di Tommaso y col., 1998). El contenido de OHTyr en vinos descrito en la mayoría de la literatura es menor ( $1.5-3.89 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que el rango obtenido en esta Tesis (Boselli y col., 2006; Di Tommaso y col., 1998; Dudley y col., 2008; Minuti y col., 2006). Sin embargo, los resultados son similares a los descritos por Proestos y col. (2005) en vinos griegos. Ellos publicaron un contenido de OHTyr cercano a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , que se encuentra dentro del rango de las concentraciones detectadas en este estudio.

Como se ha comentado previamente, tanto la MEL como el OHTyr son compuestos antioxidantes. Además, ambos compuestos han demostrado ser capaces de traspasar la barrera hematoencefálica (Fernández-Mar y col., 2012; Karbownik y col., 2001; Wu y col., 2009). Este hecho les capacita para actuar directamente donde se forman los radicales libres. De este modo, diversas enfermedades como la enfermedad de Parkinson o Alzheimer podrían verse beneficiadas por la acción fisiológica de OHTyr y MEL. Otro compuesto derivado de OHTyr, el HV-Alc, también ha demostrado carácter protector frente a estrés oxidativo. En un estudio, el tratamiento con OHTyr y HV-Alc redujo la peroxidación lipídica producida por peróxido de hidrógeno, a la vez que incrementó la capacidad antioxidante medida por la técnica del malondialdehído (MDA) (Deiana y col., 2008). Todas estas afirmaciones podrán ser evaluadas mediante los estudios planteados más adelante, a partir de los objetivos propuestos en esta Tesis.

#### 1.6. BIODISPONIBILIDAD DE MELATONINA E HIDROXITIRO SOL. ROL DEL ETANOL

La biodisponibilidad de MEL ha sido descrita por la comunidad científica, demostrando un porcentaje de absorción que llega hasta el 33%, tras su administración oral (Di y col., 1997; Fourtillan y col., 2000; Waldhauser y col., 1984). No obstante la eficacia de MEL es todavía incierta, y son necesarios más estudios que demuestran esta presunta buena disponibilidad.

Estudios recientes han demostrado que el vino es una fuente importante de OHTyr (De La Torre y col., 2006; Fernández-Mar y col., 2012; Schröder y col., 2009). Mediante estudios *in vivo*, De La Torre y col. (2006) y Schröder y col. (2009)

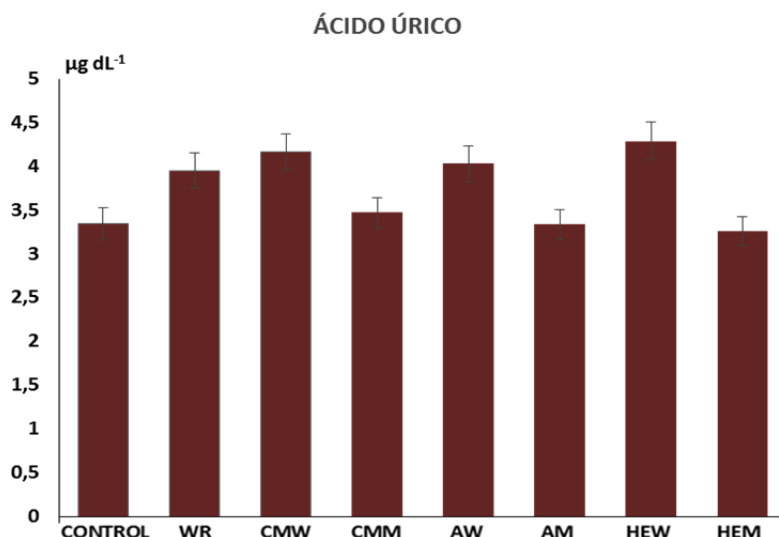
investigaron la biodisponibilidad del OHTyr comparando la ingesta de vino tinto y aceite de oliva. Ellos descubrieron que, la ingesta de 250 mL de vino tinto incrementó la concentración de OHTyr en plasma por encima de  $8 \text{ ng mL}^{-1}$ , lo que supone un incremento mayor que la ingesta de aceite oliva (0.35 mg de OHTyr con la ingesta de vino tinto y 1.7 mg con la ingesta de aceite de oliva). Estos autores propusieron la producción endógena de OHTyr a partir de etanol y dopamina, como respuesta a ese incremento. La tiramina ha sido propuesta como otra vía de formación de OHTyr, y podría ser en parte responsable del incremento de la concentración de OHTyr en el organismo tras la ingesta de vino tinto.

Por tanto, un contenido considerable de tiramina en vino tinto, podría derivar en un incremento de la formación endógena de OHTyr. Sin embargo, la cantidad de tiramina que contiene el vino tinto no es suficientemente grande como para explicar tal aumento de OHTyr endógeno (De La Torre y col., 2006). Por tanto, aunque el contenido de OHTyr en vino es menor que en aceite de oliva, la ingesta de vino tinto podría derivar en una concentración de OHTyr mayor que la ingesta de aceite de oliva, gracias a la formación endógena de OHTyr por el sistema dopaminérgico.

El impacto biológico de la ingesta de alcohol, sobrepasa a la teórica contribución en la formación de OHTyr. El urato puede actuar como antioxidante, incrementándose tras la ingesta de vino tinto y de etanol. La concentración de urato plasmático está relacionada con un incremento en la actividad antioxidante en plasma (De La Torre y col., 2006; Miro-Casas y col., 2003). La concentración de urato plasmático tras la ingesta de las distintas muestras durante el ensayo de la presente Tesis Doctoral se muestra en la Figura 12.

Como era de esperar, la ingesta de vino y de ron blanco ocasionó un incremento de urato plasmático con respecto al periodo de control y la ingesta de mostos ( $p < 0.05$ ). Tras un análisis de regresión simple, la concentración plasmática de urato ha mostrado una relación inversa con la cantidad de IsoPs en orina, aunque no de forma significativa ( $p > 0.05$ ). Boban & Modun (2010) destacaron un incremento de ácido úrico, tras el consumo de etanol y glicerol, lo cual coincide con resultados previos (Thieden, 1969), indicando que los nucleótidos de adenina se metabolizan hasta ácido úrico.





**Figura 12.** Contenido de ácido úrico plasmático. WR: Ron blanco  
CMW/CMM: vino/mosto con maceración carbónica; AW/AM:  
vino/mosto crianza; HEW/HEM: vino/mosto de autor.

Tal como se ha mencionado previamente, la biodisponibilidad de los polifenoles es muy baja (Guerrero y col., 2009; Mulero y col., 2011; Mushtaq & Wani, 2013). De modo que, otros compuestos bioactivos con mejor biodisponibilidad como MEL, y el compuesto fenólico OHTyr u otros compuestos derivados, pueden ser responsables de la capacidad antioxidante y de los efectos beneficiosos del vino tinto, en mayor medida que los polifenoles.



## 2. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO, FUNCIÓN VASCULAR E INFLAMACIÓN MEDIANTE EL ANÁLISIS DE ISOPROSTANOS Y PROSTAGLANDINAS EN ORINA

### 2.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE ISOPROSTANOS EN ORINA

El análisis de isoprostanos (IsoPs) mostró una variación notable durante las etapas de las que se compone el estudio. Los resultados se representan en la Tabla 9. La concentración urinaria de IsoPs ha sido establecida como el “gold standard” para la medida del estado redox del organismo (Kadiiska y col., 2005; Medina y col., 2012). Igualmente, ha sido incluida en las alegaciones de salud (“health claims”) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

**Tabla 9.** Concentración individual de isoprostanos encontrados en orina

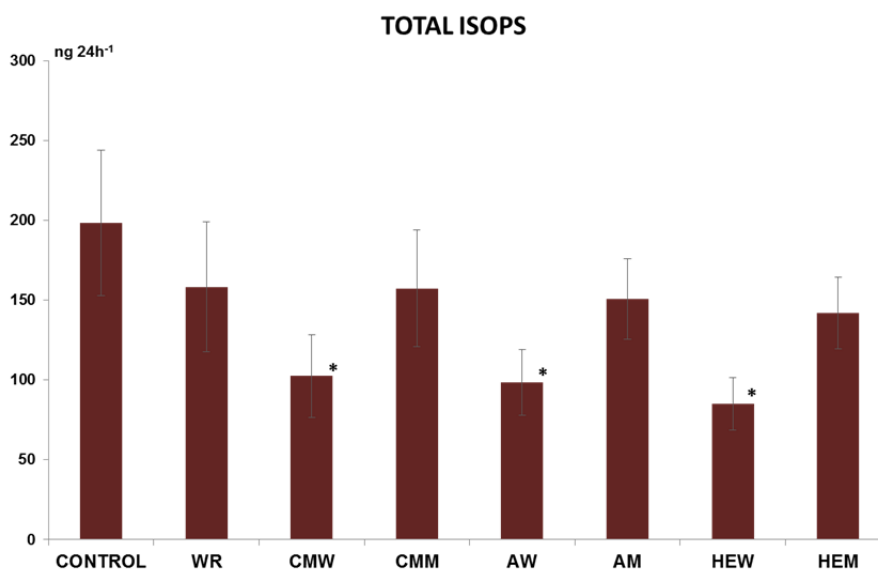
	CONTROL	WR	MCW	MCM	AW	AM	HEW	HEM
8-iso-PGF <sub>1α</sub>	0.7±0.1	0.7±0.2	0.3±0.1	0.5±0.1	0.2±0.0	0.6±0.1	0.3±0.9	0.6±0.0
8-iso-15(R)-PGF <sub>2t</sub>	4.8±1.7	4.3±1.1	2.3±0.6	4.7±1.0	2.4±0.6	5.3±0.8	2.1±0.4	4.3±0.9
8-iso-PGF <sub>2α</sub>	2.9±0.5	2.6±0.3	1.6±0.4	2.2±0.5	1.7±0.2	3.4±0.5	1.5±0.2	2.8±0.3
8-iso-PGF <sub>2β</sub>	6.9±1.5	5.9±1.8	4.0±1.1	6.3±0.8	2.0±0.3	4.1±0.7	2.2±0.4	3.4±0.5
5-F <sub>2t</sub>	14.8±3.1	13.1±3.8	9.6±2.5	13.7±3.2	15.6±2.1	15.1±2.6	9.3±2.6	14.6±2.2
5-epi-5-F <sub>2t</sub>	33.0±7.8	32.5±9.5	22.9±5.6	27.8±6.5	23.6±5.6	32.3±6.4	20.4±4.4	26.7±4.4
ent-8-iso-15s-PGF <sub>2α</sub>	21.9±5.2	17.7±5.2	10.6±2.8	17.3±3.3	7.8±1.7	14.3±2.2	7.5±1.6	14.5±2.7
ent-PGF <sub>2α</sub>	1.9±0.4	1.7±0.3	1.2±0.3	1.6±0.4	0.6±0.1	1.1±0.1	0.5±0.1	1.0±0.1
8-iso-PG <sub>E1</sub>	11.2±1.5	9.3±1.4	8.3±1.9	9.1±1.3	7.4±1.5	12.4±1.7	7.1±1.1	12.6±1.5
15-epi-15F <sub>2t</sub>	0.6±0.1	0.8±0.2	0.7±0.1	0.5±0.1	0.7±0.2	1.2±0.2	0.8±0.1	1.2±0.1
8-F <sub>3t</sub>	2.6±0.5	2.4±0.3	1.3±0.3	2.2±0.4	1.4±0.3	2.8±0.3	1.1±0.1	2.2±0.3
2,3-dinor-8-iso-PGF <sub>2α</sub>	27.4±6.2	17.3±4.3	8.2±2.1	12.2±3.4	14.5±1.2	14.5±1.8	14.5±1.4	14.5±2.2
2-3-dinor-15-F <sub>2t</sub>	61.4±14.5	41.9±9.8	27.5±6.8	52.3±13.4	37.7±5.5	37.7±6.4	37.7±3.1	37.7±5.7
2,3-dinor-15-epi-15F <sub>2t</sub>	7.7±1.8	7.3±2.1	3.4±0.8	6.4±1.5	5.1±0.7	5.1±0.8	5.1±0.4	5.1±0.7

Los resultados se expresan en ng 24h<sup>-1</sup>±SD. WR: Ron blanco; CMW/CMM: vino/mosto de maceración carbónica; AW/AM: vino/mosto crianza; HEW/HEM: vino/mosto de autor.

De los 16 IsoPs analizados, 14 fueron identificados en todas las muestras de orina tanto tras el consumo de mosto como de vino: 8-iso-PGF<sub>1α</sub>; 8-iso-15(R)-PGF<sub>2t</sub>; 8-iso-PGF<sub>2α</sub>; 8-iso-PGF<sub>2β</sub>; 5-F<sub>2t</sub>, 5-*epi*-5-F<sub>2t</sub>; *ent*-8-iso-15s-PGF<sub>2α</sub>; *ent*-PGF<sub>2α</sub>; 8-iso-PGE<sub>1</sub>; 15-*epi*-15-F<sub>2t</sub>; 8-F<sub>3t</sub>; 2,3-dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub>; 2,3-dinor-15-F<sub>2t</sub>; 2,3-dinor-15-*epi*-15-F<sub>2t</sub>. Estos marcadores permitirán comprender los efectos en el estado redox del organismo tras la ingesta de las distintas bebidas sometidas a estudio.

## 2.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ISOPROSTANOS EN ORINA

La concentración urinaria de IsoPs totales a lo largo de todas las etapas del estudio se representa en la Figura 13. Como se puede apreciar, en el periodo de control se encontró la mayor cantidad de IsoPs en orina en comparación con todas las etapas del estudio ( $198.4 \pm 45.4 \text{ ng } 24^{-1}$ ).



**Figura 13.** Isoprostanos encontrados en orina. Los resultados se expresan en  $\text{ng } 24\text{h}^{-1}$ . WR: Ron blanco; CMW/CMM: vino/mosto de maceración carbónica; AW/AM: vino/mosto crianza; HEW/HEM: vino/mosto de autor. Los asteriscos indican diferencias significativas.

La administración oral de etanol queda marcada por la ingesta de ron blanco (WR). Dicha ingesta ocasionó una disminución del contenido de IsoPs totales en orina, aunque de forma poco pronunciada. La disminución de la

excreción urinaria de IsoPs totales tras la ingesta de WR comparada con el periodo de control fue de un 21%, quedando en  $158.2 \pm 40.7 \text{ ng } 24^{-1}$  en orina. De este modo, aunque la ingesta de WR logró disminuir el contenido total de IsoPs en orina, esta disminución no fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

Es destacable que tras la ingesta de los tres tipos de vino se produjo una importante disminución en la cantidad total de IsoPs en orina ( $p < 0.05$ ). De este modo, la ingesta del vino de maceración carbónica (CMW) ocasionó un descenso en el contenido final del total de IsoPs de casi un 50%, bajando hasta los  $102.4 \pm 25.7 \text{ ng } 24\text{h}^{-1}$ . La ingesta del vino de crianza (AW) también redujo el contenido urinario del total de IsoPs. De hecho, la bajada fue ligeramente más pronunciada que tras la ingesta de CMW, originando una excreción de  $98.3 \pm 20.7 \text{ ng } 24\text{h}^{-1}$ . Finalmente, el último vino que se utilizó durante el estudio fue el vino de autor (HEW). La ingesta de este vino ocasionó una disminución del 58% del total de IsoPs urinarios, aún mayor que la observada tras la ingesta de CMW y AW. Así pues, el contenido total de IsoPs en orina tras la ingesta de HEW fue de  $85.2 \pm 16.4 \text{ ng } 24\text{h}^{-1}$ .

La ingesta de mosto mostró una tendencia similar a la de WR en cuanto a la excreción urinaria de IsoPs. El consumo de cada mosto ocasionó una disminución en la cantidad de IsoPs totales en orina. Sin embargo, en ningún caso esta disminución fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ). Tras la ingesta del mosto de origen del vino de maceración carbónica (CMM), la cantidad total de IsoPs urinarios fue de  $157.3 \pm 36.6 \text{ ng } 24\text{h}^{-1}$ , un 21% inferior. Además, la ingesta del mosto de origen del vino de crianza (AM) generó una excreción urinaria de  $150.81 \pm 25.36 \text{ ng } 24^{-1}$  del total de IsoPs, un 24% menor que tras la etapa de control. Finalmente, la ingesta del mosto de origen del vino de autor (HEM) dio lugar a una excreción urinaria de  $141.8 \pm 22.4 \text{ ng } 24^{-1}$  de IsoPs totales, que resultó ser un 28% menor que la encontrada tras la etapa de control.

Por tanto, la administración de WR y de los tres tipos de mosto, resultó en una disminución de la cantidad total de IsoPs en orina. Sin embargo, esta disminución tras la administración de los mostos y etanol fue menos acusada que la observada tras la ingesta de los tres tipos de vino.

El contenido de IsoPs individuales tras la ingesta de las distintas bebidas también fue objeto de estudio. Como se ha comentado anteriormente, se

identificaron un total de 14 IsoPs distintos en orina (Tabla 9). Los compuestos mayoritarios que se encontraron fueron: 5-*epi*-5-F<sub>2t</sub>, *ent*-8-iso-15-PGF<sub>2α</sub>, 2,3-dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub> y 2,3-dinor-15-F<sub>2t</sub>. Como era de esperar, la excreción de los distintos IsoPs que se encontraron siguió la misma tendencia que la marcada con la excreción total de IsoPs, previamente descrita.

El contenido de los distintos IsoPs encontrados fue claramente superior en la etapa de control, con respecto a las demás etapas del estudio. Sin embargo, hay diferentes tendencias que se han apreciado con respecto a ciertos IsoPs. Dos IsoPs, mantuvieron una concentración similar a lo largo de todas las etapas del estudio; tanto 5-F<sub>2t</sub> como 5-*epi*-5-F<sub>2t</sub>, no mostraron diferencias significativas tras la ingesta de ninguna de las bebidas a estudio ( $p > 0.05$ ). Otro compuesto, el 2,3-dinor-8-iso-PGF<sub>2α</sub>, del cual se detectaron  $27.4 \pm 6.2$  ng 24<sup>-1</sup> durante la etapa de control, se vio afectado de una manera similar tras cada uno de los tratamientos, detectándose una cantidad en orina significativamente inferior ( $p < 0.05$ ) tanto tras la ingesta de los vinos como de los mostos o el ron blanco.

Varios compuestos presentaron una excreción inferior tras la ingesta de los tres tipos de vino. Así pues, tras el periodo de control, la concentración urinaria de estos compuestos fue de: 8-iso-PGF<sub>1α</sub> ( $0.7 \pm 0.1$  ng 24h<sup>-1</sup>); *ent*-8-iso-15s-PGF<sub>2α</sub> ( $21.9 \pm 5.9$  ng 24h<sup>-1</sup>); 2,3-dinor-15-F<sub>2t</sub> ( $61.4 \pm 14.5$  ng 24h<sup>-1</sup>) y, por último, 2,3-dinor-15-*epi*-15-F<sub>2t</sub> ( $7.7 \pm 1.8$  ng 24h<sup>-1</sup>). Sin embargo, tras la ingesta de CMW, AW y HEW, la disminución del contenido de estos IsoPs en orina fue muy significativa ( $p < 0.01$ ) (Tabla 9). Otro IsoP, el 8-iso-PGF<sub>2β</sub> ( $6.9 \pm 1.5$  ng 24h<sup>-1</sup> durante el periodo de control) también se vio afectado por la ingesta de vino. Concretamente, la ingesta de AW y HEW provocó una disminución en la excreción de este IsoPs de manera contrastada ( $p < 0.05$ ).

La ingesta de los vinos provocó la disminución en la excreción urinaria de multitud de IsoPs. De hecho, la ingesta de mostos únicamente provocó la disminución significativa de la excreción urinaria de uno de los IsoPs. Así pues, el contenido en orina de 15-*epi*-15-F<sub>2t</sub> tras el periodo de control se vio afectado de manera significativa tras la ingesta de AM y HEM, disminuyendo ostensiblemente su presencia en la orina ( $p < 0.05$ ).

Las diferencias entre la ingesta de cada vino y su mosto de origen fueron evidentes. De este modo, la ingesta de AW provocó una disminución mucho más

acusada ( $p < 0.05$ ) de la excreción de algunos IsoPs que su mosto de origen (AM). Estos IsoPs fueron: 8-iso-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , 8-iso-15(R)-PGF<sub>2t</sub>, 8-iso-PGE<sub>1</sub>, 8-F<sub>3t</sub> y 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . La ingesta de otro vino, el HEW, también evidencia una disminución mayor del contenido urinario de otros IsoPs comparado con su mosto de origen (HEM). De hecho, tanto 8-iso-PGE<sub>1</sub>, como 8-F<sub>3t</sub> y 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , se detectaron en menor medida tras la ingesta de HEW comparado con la ingesta de HEM ( $p < 0.05$ ).

La administración de etanol, marcado por la ingesta de WR, derivó en una disminución en la excreción de un IsoP, concretamente el 2,3-dinor-8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . La ingesta de WR no provocó una disminución muy acusada de la excreción de IsoPs. De hecho, los resultados obtenidos tras la ingesta de vinos sobrepasan a los resultados obtenidos tras la ingesta de WR. Efectivamente, la ingesta de AW y HEW provocó una disminución superior del contenido de cuatro IsoPs en orina: 8-iso-PGF<sub>2 $\beta$</sub> , *ent*-8-iso-15-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , *ent*-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  y 2,3-dinor-8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Otro compuesto, el 8-iso-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , también se vio afectado tras la ingesta de vinos, esta vez por CMW y AW. La tendencia fue similar, de modo que la excreción urinaria de este IsoPs fue menor tras la ingesta de CMW y de AW que de WR. Finalmente, el consumo de CMW y de HEW provocó una disminución en el contenido urinario de 8-F<sub>3t</sub> mayor que la observada tras la ingesta de WR.

### 2.3. ANÁLISIS CUALITATIVO DE PROSTAGLANDINAS EN ORINA

Con el fin de comprender mejor el efecto de las prostaglandinas (PGs) en la salud, éstas fueron divididas en distintas familias dependiendo de la acción fisiológica que ejercen en el cuerpo humano; de acuerdo con las investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha y en base a los precursores de cada una de las series y sus correspondientes metabolitos. Las PGs quedaron finalmente divididas como se muestra en la Tabla 10. Las PGs individuales que se identificaron en las muestras de orina tanto tras el consumo de mosto como de vino fueron: 9,11-dideoxy-9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -methanoepoxy-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (U-46619), 9,11-dideoxy-9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -epoxymethano-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (U-44069), 11- $\beta$ -PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGDM, tetranor PGDM, 2,3-dinor-11- $\beta$ -PGF<sub>2</sub>, tetranor-PGDM lactona, tetranor PGJM, tetranor PGAM, tetranor PGEM, 20-OH-PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , PGE<sub>1</sub> y 17-*trans*-PGF<sub>3 $\alpha$</sub> .

**Tabla 10.** Prostaglandinas en orina después de los diferentes tratamientos

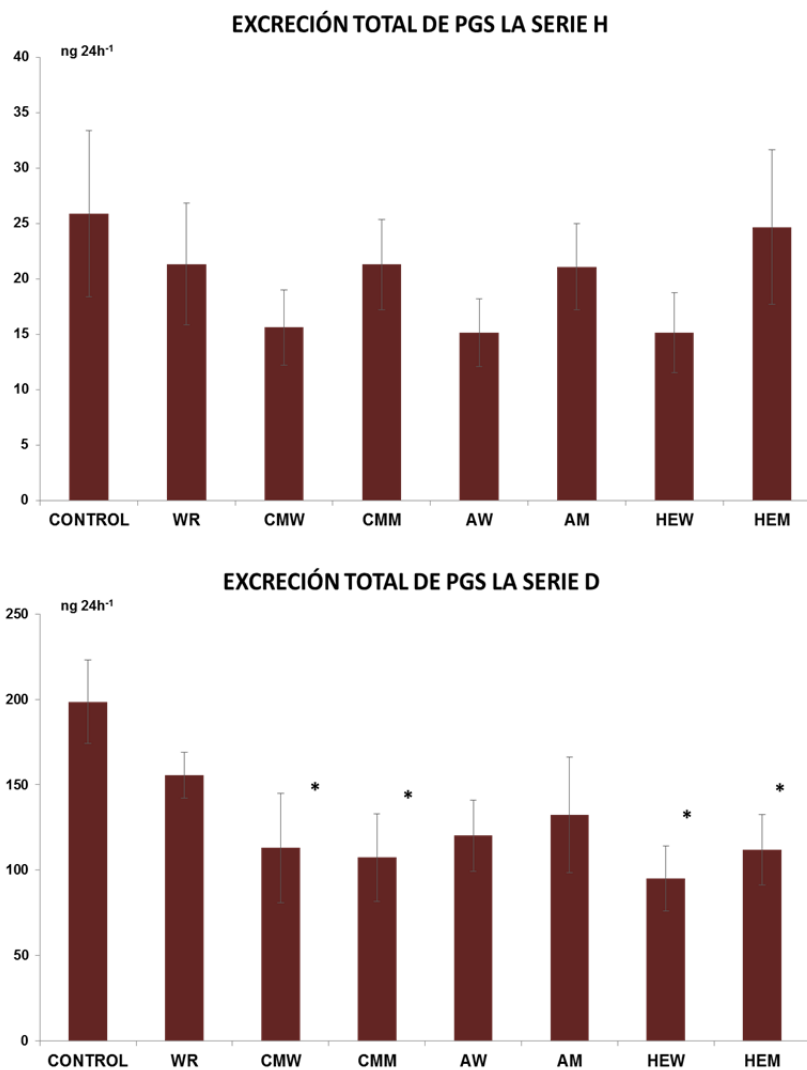
	CONTROL	WR	CMW	CMM	AW	AM	HEW	HEM
PGs SERIE H								
U-44619	15.1±4.1	13.1±3.1	8.6±1.7	12.2±2.1	8.7±1.4	10.9±1.4	8.9±2.1	14.9±4.3
U-44069	10.7±3.3	8.2±2.4	6.9±1.6	9.1±1.9	6.4±1.6	10.1±2.4	6.2±1.5	9.7±2.5
PGs SERIE D								
11-β-PGF <sub>2α</sub>	2.0±0.3	2.4±0.6	1.8±0.5	2.1±0.4	1.8±0.4	2.6±0.5	1.7±0.3	2.2±0.4
PGDM	7.8±2.1	8.3±2.3	8.6±2.4	6.6±1.7	8.3±1.7	10.7±1.6	6.1±1.5	8.4±2.3
TETRANOR PGDM	40.1±9.4	41.8±9.6	35.0±7.3	34.8±5.8	34.1±7.1	34.2±7.5	24.5±6.2	23.2±4.3
2,3-dinor-11-β-PGF <sub>2</sub>	100.9±22.1	56.4±10.2	32.9±6.7	37.1±5.7	39.6±7.2	44.2±8.6	26.5±3.8	29.2±7.0
Tetranor-PGDM lactona	46.1±11.8	45.1±12.5	33.6±8.5	25.8±7.0	39.6±7.4	39.4±6.8	35.2±6.5	47.8±10.1
Tetranor PGJM	0.8±0.1	1.4±0.3	0.8±0.1	0.9±0.1	0.6±0.1	1.1±0.2	0.7±0.1	0.8±0.1
PGs SERIE E								
Tetranor PGAM	5.6±1.1	5.0±0.7	4.6±1.2	6.8±1.6	4.5±0.9	7.0±1.4	4.4±0.8	6.7±0.7
Tetranor PGEM	9.0±2.5	8.5±2.1	10.1±1.8	8.8±2.4	16.1±3.3	23.1±4.1	7.7±1.8	10.2±0.1
20-OH-PGE <sub>2</sub>	10.5±1.7	14.2±3.6	14.5±3.8	11.1±2.6	11.2±2.3	12.4±4.0	11.5±2.5	13.3±3.6
PGE <sub>2</sub>	0.8±0.2	1.1±0.2	0.9±0.2	0.8±0.1	0.5±0.1	0.9±0.2	0.7±0.1	0.8±0.1
PGs SERIE F								
20-OH-PGF <sub>2α</sub>	36.9±10.1	26.4±3.6	44.2±16.6	52.9±15.4	27.1±7.8	41.1±15.5	27.4±8.6	40.2±11.2
19(R)-OH-PGF <sub>2α</sub>	54.6±11.8	45.7±7.6	57.9±13.2	48.1±2.2	55.4±10.8	68.0±16.8	45.1±8.6	44.5±7.4
Tetranor PGFM	9.0±2.3	8.2±2.1	7.6±2.0	7.3±1.8	8.5±2.1	9.2±1.5	7.7±2.0	7.8±2.0
PGs SERIE Ω3/6								
PGF <sub>1α</sub>	2.3±0.5	2.7±0.6	2.0±0.4	1.7±0.3	1.9±0.4	2.9±0.5	2.8±0.6	1.8±0.4
PGE <sub>1</sub>	0.2±0.1	0.7±0.2	2.1±0.5	0.7±0.1	1.9±0.4	0.7±0.1	1.4±0.5	0.7±0.1
17-trans-PGF <sub>3α</sub>	3.2±0.8	2.5±0.7	1.6±0.4	2.4±0.3	1.4±0.3	2.1±0.3	1.3±0.3	1.3±0.2

Los resultados se expresan en ng 24h<sup>-1</sup>±SD. WR: Ron blanco; CMW/CMM: vino/mosto de maceración carbónica; AW/AM: vino/mosto crianza; HEW/HEM: vino/mosto de autor.

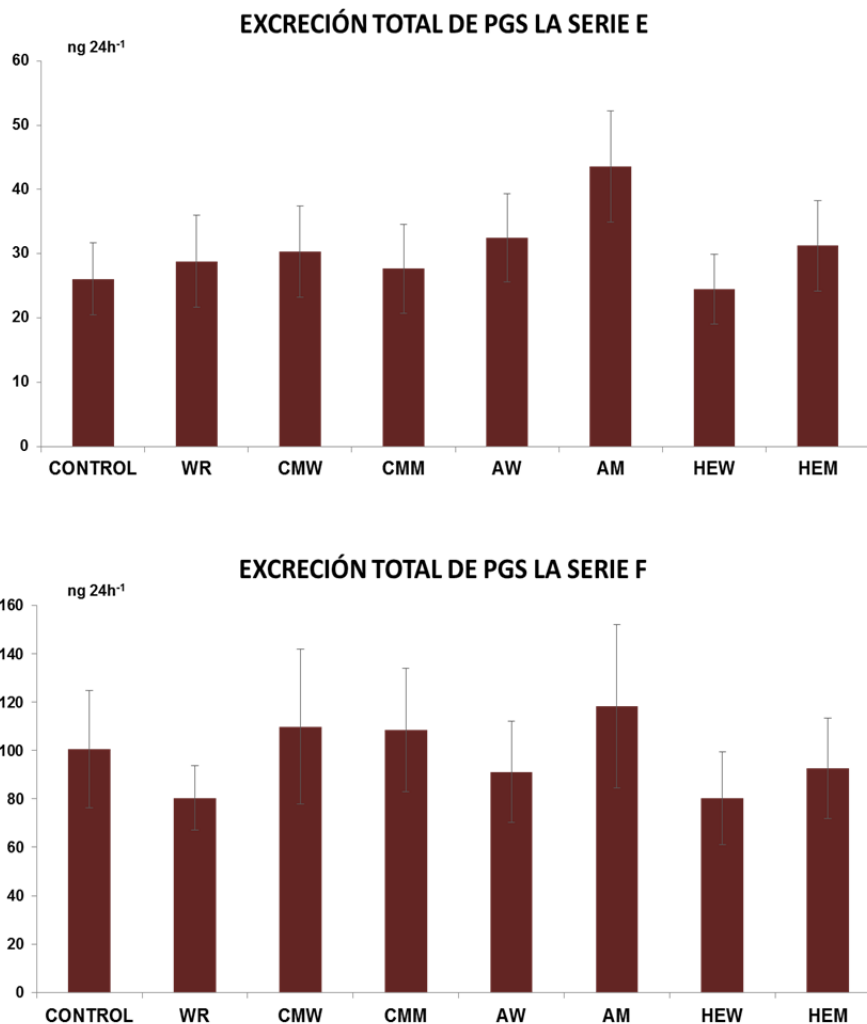


## 2.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE PROSTAGLANDINAS EN ORINA

Los resultados globales tras el análisis de las distintas familias de PGs a lo largo del estudio se representan en la Figura 14 (a, b, c).



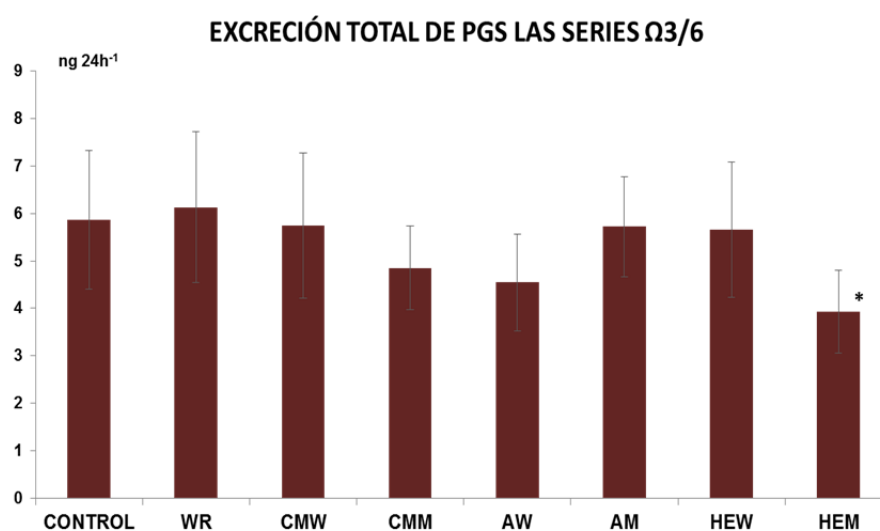
**Figura 14a.** Prostaglandinas totales de la serie H y D encontradas en orina. WR: Ron blanco; CMW/CMM: vino/mosto de maceración carbónica; AW/AM: vino/mosto crianza; HEW/HEM: vino/mosto de autor. Los resultados se expresan en ng mL<sup>-1</sup>. Los asteriscos indican diferencias significativas.



**Figura 14b.** Prostaglandinas totales de la serie E y F encontradas en orina. WR: Ron blanco; CMW/CMM: vino/mosto de maceración carbónica; AW/AM: vino/mosto crianza; HEW/HEM: vino/mosto de autor. Los resultados se expresan en ng mL<sup>-1</sup>.

El contenido total de PGs de las series PG-H y PG-D presentó un marcado descenso tras el tratamiento con cada una de las bebidas, en comparación con el periodo de control. Sin embargo, este descenso en la excreción urinaria de las series -H y -D no se generalizó a las demás series de PGs. Puede observarse que el contenido total de las series PG-E y PG-F no varió de forma uniforme a lo largo de las distintas etapas en las que se dividió el estudio (Figura 14a). Al contrario que

lo observado para las series PG-H y PG-D, el contenido en orina de las series PG-E y PG-F fue menor tras el periodo de control, que tras la ingesta de todas las bebidas a estudio, excepto tras la ingesta de HEW (Figura 14b). Por último, la serie PG- $\Omega$ 3/6 presentó un patrón estandarizado a lo largo de todas las etapas del estudio, sin que se observaran diferencias significativas en ningún caso excepto tras la ingesta de HEM ( $p < 0.05$ ) (Figura 14c).



**Figura 14c.** Prostaglandinas totales de la serie omega 3 y 6 encontradas en orina. WR: Ron blanco; CMW/CMM: vino/mosto de maceración carbónica; AW/AM: vino/mosto crianza; HEW/HEM: vino/mosto de autor. Los resultados se expresan en ng mL<sup>-1</sup>. Los asteriscos indican diferencias significativas.

La mayoría de las distintas series, presentaron diferencias entre las etapas del estudio; sin embargo, solo las diferencias observadas para la serie PG-D fueron estadísticamente significativas. De modo que tras la ingesta de los vinos CMW y HEW, además de la ingesta de los mostos CMM y HEM, el contenido total en orina de la serie PG-D fue marcadamente inferior que el observado tras el periodo de control ( $p < 0.05$ ).

El contenido de las PGs individuales en orina también fue objeto de estudio (Tabla 10). Sin embargo, la excreción urinaria de PGs no varió de forma generalizada a lo largo de las distintas etapas del estudio. De hecho, solo se

apreciaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la excreción de cuatro de las PGs: 2,3-dinor-11- $\beta$ -PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , tetranor PGEM, PGE<sub>1</sub> y 17-*trans*-PGF<sub>3 $\alpha$</sub> .

Uno de estos compuestos, la 2,3-dinor-11- $\beta$ -PGF<sub>2</sub>, mostró un contenido muy alto en orina tras el periodo de control (100.9 $\pm$ 22.1 ng 24h<sup>-1</sup>). Sin embargo, disminuyó su excreción ( $p < 0.05$ ) tras la ingesta de los tres mostos (CMM, AM y HEM), al igual que tras ingerir los tres vinos (CMW, AW y HEW).

La administración de CMM, derivó en un descenso de la excreción urinaria de 2,3-dinor-11- $\beta$ -PGF<sub>2</sub>, hasta 37.1 $\pm$ 5.7 ng 24h<sup>-1</sup>. Asimismo, la ingesta de AM redujo su contenido en orina hasta 44.2 $\pm$ 8.6 ng 24h<sup>-1</sup>.

Por último, la ingesta de HEM ocasionó que el contenido de 2,3-dinor-11- $\beta$ -PGF<sub>2</sub> se redujera hasta 29.2 $\pm$ 7.0 ng 24h<sup>-1</sup> en orina. El efecto derivado de la ingesta de los vinos siguió una tendencia similar, reduciendo la excreción de 2,3-dinor-11- $\beta$ -PGF<sub>2</sub> hasta 32.9 $\pm$ 6.7 ng 24h<sup>-1</sup> tras la ingesta de CMW; llegando a 35.6 $\pm$ 7.2 ng 24h<sup>-1</sup> tras ingerir AW. Finalmente, tras la administración de HEW el contenido de 2,3-dinor-11- $\beta$ -PGF<sub>2</sub> en orina se redujo hasta 2.5 $\pm$ 3.8 ng 24h<sup>-1</sup>.

La tetranor PGEM, una PG representante de la serie PG-E, también se vio afectada con respecto a la excreción urinaria tras la etapa de control (9.0 $\pm$ 2.5 ng 24h<sup>-1</sup>). La ingesta de AM aumentó de manera significativa el contenido en orina de tetranor PGEM, incrementando su excreción hasta los (23.1 $\pm$ 4.1 ng 24h<sup>-1</sup>).

Finalmente, hubo dos PGs procedentes de la serie PG- $\Omega$ 3/6 (PGE<sub>1</sub> y 17-*trans*-PGF<sub>3 $\alpha$</sub> ), que también se vieron afectadas por diversos tratamientos, variando su excreción de forma significativa. Tras la etapa de control, el contenido en orina de PGE<sub>1</sub> fue 0.2 $\pm$ 0.1 ng 24h<sup>-1</sup>; sin embargo, los tratamientos con los tres tipos de vino aumentaron de manera drástica esta concentración ( $p < 0.05$ ). Así pues, el contenido urinario de PGE<sub>1</sub> aumentó hasta 2.1 $\pm$ 0.5 ng 24h<sup>-1</sup> una vez se produjo la administración de CMW. La ingesta de AW también produjo un incremento en la excreción de PGE<sub>1</sub>, consiguiendo alcanzar los 1.2 $\pm$ 0.2 ng 24h<sup>-1</sup>. La ingesta de HEW resultó en un incremento similar a los observados tras la administración oral de CMW y AW, observándose un contenido urinario de 1.4 $\pm$ 0.5 ng 24h<sup>-1</sup> de PGE<sub>1</sub>. La otra PG de la serie PG- $\Omega$ 3/6, la 17-*trans*-PGF<sub>3 $\alpha$</sub> , mostró un contenido urinario de 3.2 $\pm$ 0.8 ng 24h<sup>-1</sup> tras la etapa de control. Sin embargo, la ingesta de HEW y su mosto de origen (HEM), disminuyeron su contenido en orina ( $p < 0.05$ ). De modo

que se encontraron  $1.3 \pm 0.2$  ng  $24h^{-1}$  en orina tras la ingesta de HEW, y un contenido urinario similar tras la ingesta de HEM ( $1.3 \pm 0.3$  ng  $24h^{-1}$ ).

La administración oral de etanol, marcada por la ingesta de WR, derivó en variaciones en el contenido urinario de algunas PGs. Sin embargo, no mostró variaciones significativas en la excreción urinaria de ninguna de las PGs estudiadas.

## 2.5. RELACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL VINO CON LA EXCRECIÓN DE ISOPROSTANOS Y PROSTAGLANDINAS EN ORINA

Como ya se ha indicado previamente, tanto el TPC, la MEL, el OHTyr o sus metabolitos son capaces de actuar como agentes antioxidantes a nivel sistémico. Mediante la caracterización de las muestras, se estableció la relación de los distintos compuestos y la responsabilidad que pudieran tener en los cambios producidos en la excreción de marcadores de estrés y función vascular e inflamación. La excreción total de IsoPs, se relacionó de forma individual con los distintos compuestos bioactivos de las muestras, tal como se muestra en la Tabla 11. El OHTyr ha demostrado su capacidad antioxidante, también en estudios *in vivo* (Fernández-Mar y col., 2012; Vilaplana-Pérez y col., 2014). De hecho, el análisis de regresión simple, mostró una relación inversa entre el contenido de OHTyr de los vinos y mostos, y la excreción urinaria de IsoPs. Así pues, fue responsable del 33.4% del cambio observado en la excreción de IsoPs. Al igual que con la ingesta de OHTyr, la administración de HV-Alc derivó en una relación significativamente inversa con la excreción urinaria de IsoPs (25.4% del efecto). Aunque de forma menos marcada, la ingesta del total de compuestos fenólicos (TPC) también mostró estar relacionado de forma inversa con la excreción de IsoPs, siendo responsable del 10.1% del cambio producido. Por último, la administración oral de MEL y de HV-Acid, también se relacionó de forma inversa con la excreción urinaria de IsoPs totales, siendo responsables del 6% y el 2.9% del cambio observado en la excreción de IsoPs, respectivamente.

Finalmente, el análisis de regresión múltiple mostró que un 42.4% del cambio producido en la excreción urinaria de IsoPs, se puede explicar mediante la ingesta conjunta de los distintos compuestos presentes en el vino y el mosto. Sin embargo (tal como puede observarse en la Tabla 11), al analizar los datos

simultáneamente, el contenido de OHTyr parece ser el más determinante a la hora de producir los cambios observados en la excreción de IsoPs; siendo responsable del 40.5% del cambio observado, cuando se compara simultáneamente con los demás compuestos.

El contenido urinario de IsoPs disminuyó tras la ingesta de los tres tipos de vino. No obstante, el vino tinto ha demostrado su capacidad antioxidante *in vivo*, atribuidos principalmente a su contenido en compuestos bioactivos y sus propiedades antioxidantes (Basli y col., 2012; Gómez-Serranillos y col., 2009; Rodríguez-Naranjo y col., 2011). No solo los vinos, sino también la ingesta de mostos, demostró ser capaz de reducir la excreción de IsoPs. De hecho, la cantidad de compuestos bioactivos de los mostos también resultó ser abundante. Finalmente, la administración oral de etanol -marcada por la ingesta de WR- también redujo la excreción urinaria de IsoPs, poniendo de manifiesto la capacidad antioxidante del etanol.

Sin embargo, la cantidad de compuestos bioactivos presentes en el vino es superior y más variada que la observada en sus mostos de origen. Conjuntamente, la ingesta de vino, acarrea una ingesta subyacente, de la misma cantidad de etanol que mediante la ingesta de WR. Los vinos tintos aportan una cantidad variada de compuestos bioactivos, de modo que la ingesta de CMW aporta una mayor cantidad de MEL, mientras que la ingesta de AW y HEW proporciona un mayor contenido de OHTyr. Dada la capacidad antioxidante de ambos compuestos, la ingesta de cualquiera de los vinos tintos conlleva un incremento en la capacidad antioxidante por la acumulación de compuestos antioxidantes. Dada la mayor cantidad de compuestos bioactivos y el contenido en etanol, la ingesta de vino tinto consigue disminuir la excreción de IsoPs en mayor medida que la ingesta de sus mostos de origen (sin etanol) y que la ingesta de WR (sin compuestos bioactivos).

En cuanto a las PGs, sus funciones se han estudiado extensamente y comprenden una amplia variedad, dependiendo de la familia estudiada (Ricciotti & Fitzgerald, 2011). Las funciones de una PG específica dependen de la familia a la que pertenezca. Así pues, la serie PG-H ejerce una potente vasoconstricción (Hamberg y col., 1974). La serie PG-D puede ejercer tanto efectos vasoconstrictores, como vasodilatadores (Funk, 2001; Gilroy y col., 1999; Lewis y col., 1982; Ricciotti & Fitzgerald, 2011; Smith y col., 2011; Urade y col., 1989). La

serie PG-I no pudo ser cuantificada en orina, al no ser detectada durante el presente estudio; sin embargo, es capaz de ejercer acción vasodilatadora y antiagregante plaquetario, con la consecuente prevención de accidentes cardiovasculares (Libby y col., 1988; Noda y col., 2007). Otra familia de PGs, la serie PG-E, ha demostrado capacidad neuroprotectora, amén de su efecto tanto antiinflamatorio como proinflamatorio (Moriyama y col., 2005; Thorén & Jakobsson, 2000; Trebino y col., 2003). Finalmente, la serie PG-F podría ser parcialmente responsable de los efectos proinflamatorios descritos para las PGs (Ricciotti & Fitzgerald, 2011).

Los efectos de las distintas familias de prostaglandinas pueden variar ampliamente, al igual que varía su excreción tras la ingesta de las distintas bebidas. La excreción urinaria de la familia PG-H disminuyó de forma significativa tras la ingesta de los tres tipos de vino (Figura 14a), derivado a su vez de la reducción en el contenido de U-44619 y U-44069. La acción biológica de U-44619 y U-44069 es similar a la del tromboxano A<sub>2</sub>, por lo que incrementan la agregación plaquetaria y ejercen efectos vasoconstrictores (Coleman y col., 1981; Pollock y col., 1984).

La excreción urinaria de la familia PG-D se vio afectada en mayor medida que la familia PG-H. Tanto la ingesta de los tres vinos como la ingesta de los tres mostos, ocasionó un descenso en la excreción de las PGs de la serie D (Figura 14a). Sin embargo, una PG en particular, 2,3-dinor-11-β-PGF<sub>2α</sub>, mostró un descenso mucho más pronunciado ( $p < 0.01$ ) dentro de la familia PG-D (Tabla 10). La actividad biológica de 2,3-dinor-11-β-PGF<sub>2α</sub> es muy similar a la de 11-β-PGF<sub>2α</sub>, aumenta la broncoconstricción e inhibe la diferenciación adiposa (Coleman & Sheldrick, 1989; Lepak & Serrero, 1993).

Los niveles en orina de la familia PG-E se mantuvieron estables a lo largo de todo el estudio, excepto tras la ingesta de AM (Figura 14b). La ingesta de este mosto derivó en un importante incremento de la excreción de la serie-E, siendo especialmente significativo en el caso de tetranor PGEM (Tabla 10). La acción biológica de tetranor PGEM no es muy conocida, pero es un marcador representativo de la síntesis de PGE<sub>1</sub> y PGE<sub>2</sub>. La PGE<sub>1</sub> tiene efectos vasodilatadores en el organismo, mientras que los efectos de la PGE<sub>2</sub> son variables. Dependiendo del receptor al que se una puede ejercer efectos vasoconstrictores o vasodilatadores, además de efectos broncoconstrictores o

broncodilatadores (Greenhough y col., 2009). De este modo, el incremento en la excreción de tetranor PGEM puede ser significativo de un efecto vasodilatador ejercido por PGE<sub>1</sub> y PGE<sub>2</sub>.

De las dos familias de PG restantes, PG-F mantuvo constantes ( $p>0.05$ ) sus niveles en orina a lo largo de todo el estudio (Figura 14b). Sin embargo, la excreción de la serie PG- $\Omega$ 3/6 sí presentó diferencias. Tras la ingesta de HEM, los niveles en orina de PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  y los de 17-*trans*-PGF<sub>3 $\alpha$</sub>  disminuyeron considerablemente. Sin embargo, no hay estudios que describan la acción biológica de estos dos compuestos, de modo que este incremento no puede ser valorado en detalle. Aún más llamativa es la variación en la excreción urinaria de PGE<sub>1</sub>, aumentado considerablemente tras la ingesta de los tres tipos de vino (Tabla 10). La actividad biológica de PGE<sub>1</sub> es clara, siendo importante como compuesto cardioprotector, debido a su ya mencionado efecto vasodilatador.

Los efectos de las PG como compuestos individuales pueden ser aún más diversos. Las distintas PG pueden actuar como anti- o pro-inflamatorias dependiendo del compuesto y del receptor al que se unan, además del tejido donde se produzca la acción (Ricciotti & Fitzgerald, 2011).

Así pues, la ingesta de los vinos tintos fue capaz de disminuir la excreción urinaria de prostaglandinas pro-inflamatorias (actuando como pro-agregantes plaquetarios y vasoconstrictores) tales como 2,3-dinor-11- $\beta$ -PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , U-44619 y U-44069. Mientras que, a su vez, incrementó la excreción de la PGE<sub>1</sub>. Estos resultados refuerzan las investigaciones sobre los efectos cardioprotectores de la ingesta de vino tinto en particular, y de la Dieta Mediterránea en general.

Atendiendo a estos resultados, se realizaron las comprobaciones estadísticas del mismo modo que el empleado para estudiar la relación de los distintos compuestos bioactivos, y el TPC con los IsoPs. De esta manera, se comprobó que la relación de las PG con los compuestos bioactivos es muy dispar, y no existe un patrón para definirla. Sin embargo, la relación estadística de la PGE<sub>1</sub> la cual, como se ha descrito anteriormente, posee efectos vasodilatadores y puede ejercer actividad cardioprotectora (Cole y col., 1981; Olley & Coceani, 1981; Rabbani y col., 2010), con los diferentes compuestos presentes en los vinos y mostos, sí que resultó llamativa (Tabla 11).



Al realizar el estudio de regresión simple, la excreción urinaria de PGE<sub>1</sub> resultó estar condicionada en un 53.8% por la ingesta de MEL, en un 13.9% por la de OHTyr, en un 6.2% por la de HV-Acid, en un 39% por la de HV-Alc y en un 40.7% por el ingesta de TPC. A su vez, el estudio de regresión múltiple demostró que las variaciones observadas en la excreción de PGE<sub>1</sub> están condicionadas en un 60.9% por el contenido total de los compuestos a estudio, abarcados de forma conjunta. Sin embargo, la ingesta de MEL y OHTyr resultó la más determinante en dicha excreción, siendo ambas responsables del 59.9% del incremento observado en la excreción de PGE<sub>1</sub>.

**Tabla 11.** Coeficientes de determinación derivados del estudio de regresión simple y de regresión múltiple.

	Total IsoPs	PGE <sub>1</sub>
<b>Regresión simple (R<sup>2</sup>)</b>		
MEL	0.060	0.538
OHTyr	0.334	0.139
HV-Acid	0.029	0.062
HV-Alc	0.254	0.390
TPC	0.101	0.407
<b>Regresión múltiple</b>		
R <sup>2</sup> Tot.	0.424	0.609
R <sup>2</sup> Sel.	0.405 (OHTyr)	0.599 (MEL, OHTyr)

MEL: Melatonina; HV-Acid: Ácido homovanílico; HV-Alc: Alcohol homovanílico; OHTyr: Hidroxitirosol; TPC: Compuestos fenólicos totales. R<sup>2</sup> Tot.: coeficiente de regresión múltiple que expresa la importancia estadística de todos los compuestos estudiados con respecto a cada marcador. R<sup>2</sup> Sel.: coeficiente de regresión múltiple de los compuestos seleccionados por su robustez estadística con el modelo.

La relación directa, encontrada entre la ingesta de compuestos bioactivos y la excreción de PGE<sub>1</sub> en orina, y teniendo en cuenta los efectos cardioprotectores de esta PG, puede ser un factor clave en la comprensión de los efectos cardioprotectores del vino tinto. Por otra parte, la ingesta de mostos y ron blanco (aun aportando compuestos bioactivos y etanol respectivamente) no son capaces de ejercer la misma acción cardioprotectora que la ingesta de vinos tintos (que aportan compuestos bioactivos y etanol).

Estos resultados refuerzan las publicaciones previas y exaltan el papel del vino tinto como uno de los pilares de la Dieta Mediterránea. Finalmente, es evidente que el contenido de OHTyr y MEL es un factor clave en la capacidad antioxidante de los vinos tintos; y que la capacidad cardioprotectora del vino tinto puede estar relacionada con el aumento de la PGE<sub>1</sub>.

### 3. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL MEDIANTE EL ANÁLISIS DE NEUROPROSTANOS Y F<sub>2</sub>-DIHOMO-ISOPROSTANOS

#### 3.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE NEUROPROSTANOS Y F<sub>2</sub>-DIHOMO-ISOPROSTANOS

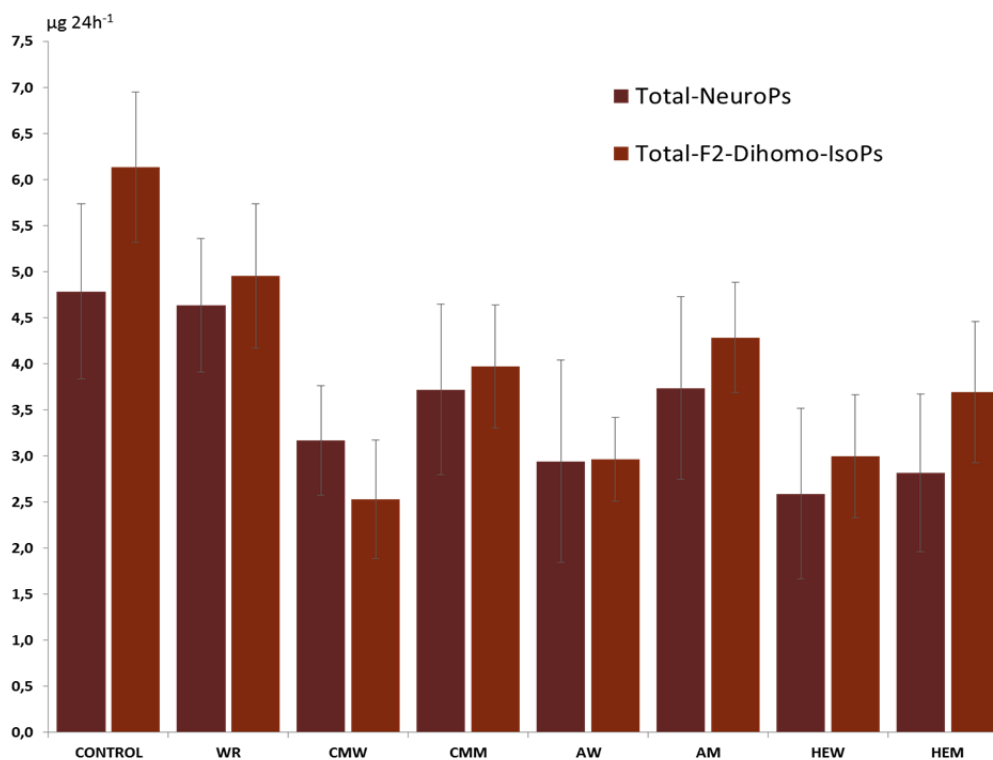
Se seleccionaron las series F<sub>4</sub> y F<sub>3</sub> de los NeuroPs para ser los marcadores oxidativos de referencia, debido a su gran abundancia *in vivo* y a que ya ha sido propuesta recientemente como marcador de patologías del sistema nervioso central, como Alzheimer y epilepsia (Medina y col., 2015; Yin y col., 2005). En relación a los F<sub>2</sub>-dihomo-isoprostanos, fueron las series 7 y 17 las que se seleccionaron como marcadores de estrés oxidativo, atendiendo a los mismos parámetros mencionados anteriormente (Medina y col., 2015; Vanrollins y col., 2008).

Los NeuroPs y F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs analizados se muestran en la Tabla 12. En cuanto a los NeuroPs, de los 9 compuestos analizados, se detectaron siete en orina: 4(*R*)-F<sub>4t</sub>-NeuroP; 10-*epi*-10-F<sub>4t</sub>-NeuroP; 10-F<sub>4t</sub>-NeuroP; 4-*epi*-4-F<sub>3t</sub>-NeuroP y 4-F<sub>3t</sub>-NeuroP. Los cuatro F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs analizados fueron detectados en orina: *ent*-7(*R*)-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP; *ent*-7-*epi*-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP; 17-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP y 17-*epi*-17-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP.

#### 3.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE NEUROPROSTANOS Y F<sub>2</sub>-DIHOMO-ISOPROSTANOS TOTALES ENCONTRADOS EN ORINA

La concentración urinaria de NeuroPs y F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales en las distintas etapas del estudio se muestran en la Figura 15. Durante el periodo de control la concentración total de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs fue de 6.1±0.5 µg 24h<sup>-1</sup>. Sin embargo, la excreción disminuyó de forma significativa tras la ingesta de los tres tipos de mosto ( $p < 0.01$ ). De este modo, tras la ingesta de los diferentes mostos, la concentración urinaria más alta del total de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs fue alcanzada tras la ingesta de AM, resultando en 4.2±0.5 µg 24h<sup>-1</sup>. Las concentraciones urinarias de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales tras la ingesta de los dos mostos restantes, fueron similares a las encontradas tras la ingesta de AM ( $p > 0.05$ ). Así pues, la excreción urinaria tras la ingesta de CMM fue de 3.6±0.7 µg 24h<sup>-1</sup>. La menor concentración

de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales fue alcanzada tras la ingesta de HEM, dando como resultado  $3.6 \pm 0.7 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales en orina.



**Figura 15.** Análisis cuantitativo del contenido total de NeuroPs y F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs encontrados en orina. WR: Ron blanco; CMW/CMM: vino/mosto con maceración carbónica; AW/AM: vino/mosto crianza; HEW/HEM: vino/mosto de autor. Los resultados se expresan como  $\mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$

El efecto sobre los F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales tras la ingesta de los vinos tintos presentó diferencias significativas. Mientras que durante el periodo de control la cantidad de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales fue de  $6.1 \pm 0.5 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ , la concentración de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales en orina fue significativamente inferior tras la ingesta de cada uno de los tres tipos de vinos ( $p < 0.01$ ). La ingesta de CMW dio lugar a una concentración de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales de  $2.5 \pm 0.6 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ . El proceso de crianza del vino tinto no influyó de forma significativa sobre la concentración urinaria de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales ( $p > 0.05$ ). De hecho, tras la ingesta de AW y HEW, se encontraron unas concentraciones de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales de  $2.9 \pm 0.4 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  y  $3.0 \pm 0.5 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  respectivamente.

Al igual que tras la ingesta de los vinos y los mostos, la ingesta de etanol (marcada por la ingesta de WR) también produjo un descenso en los niveles de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales ( $p < 0.05$ ). Recordemos que durante el periodo de control la concentración urinaria de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales fue de  $6.1 \pm 0.5 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ ; mientras que la ingesta de WR disminuyó la excreción, situándola en  $4.9 \pm 0.8 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ .

El estudio de la excreción total de NeuroPs aportó más disparidad que la observada para F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs. Durante el periodo de control la excreción total de NeuroPs fue de  $4.7 \pm 0.7 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ . Es destacable que tras las ingestas de HEM y HEW, los niveles de NeuroPs totales en orina ( $2.8 \pm 0.8 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  y  $3.1 \pm 0.5 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ , respectivamente) se redujeron de manera muy significativa ( $p < 0.01$ ). Esta reducción de la excreción en orina del total de NeuroPs también fue observada tras la ingesta de CMM y AM. La tendencia tras la ingesta de CMW y AW fue similar a la de sus mostos de origen, reduciendo la excreción de NeuroPs totales en orina. Sin embargo, ninguno de estos otros dos mostos y vinos consiguieron reducir la concentración de NeuroPs totales de manera significativa tras su ingesta ( $p > 0.05$ ). La concentración del total de NeuroPs tras ingesta de los mostos fue similar, por tanto las diferencias de concentración en orina fueron similares tras la ingesta de los tres mostos. En el mismo sentido, la ingesta de los tres vinos tintos tampoco aportó diferencias en la concentración final de NeuroPs totales ( $p > 0.05$ ).

Los efectos del etanol, marcados por la ingesta de WR, fueron diferentes a los observados tras ingesta de mosto y vino. De hecho, la concentración en orina de NeuroPs totales tras la ingesta de WR resultó muy similar ( $p > 0.05$ ) ( $4.6 \pm 0.5 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ ) a la observada durante el periodo de control ( $4.8 \pm 0.2 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ ).

Finalmente, ninguno de los vinos empleado, ejerció mayor protección antioxidante sobre el DHA que sus respectivos mostos de origen ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, tanto HEW como HEM ejercieron el mayor efecto antioxidante. Esto revela la importancia de los factores agronómicos en la actividad neuroprotectora, observada mediante la medición de NeuroPs urinarios. El proceso de vinificación, no parece influir en la actividad protectora de los vinos tintos a nivel de los NeuroPs urinarios.

### 3.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE NEUROPROSTANOS Y F<sub>2</sub>-DIHOMO-ISOPROSTANOS INDIVIDUALES

Las variaciones en la concentración de los distintos NeuroPs y F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs, tras la ingesta de las distintas bebidas, también ha sido estudiada (Tabla 12).

Abordando los F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs, las variaciones fueron bastante amplias, concerniente a la ingesta de los mostos. 17-*epi*-17-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP y 17-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP presentaron unas concentraciones bajas, durante el periodo de control ( $0.08 \pm 0.02 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  y  $0.70 \pm 0.10 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ , respectivamente). Aun siendo bajas, algunas bebidas lograron disminuir significativamente ( $p < 0.05$ ) aún más sus concentraciones. De hecho, la ingesta de CMM consiguió reducir la concentración de 17-*epi*-17-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP hasta ( $0.04 \pm 0.01 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ ), al igual que la de 17-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP ( $0.44 \pm 0.09 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ ). La ingesta de HEM también disminuyó la concentración en orina de ambos compuestos ( $0.04 \pm 0.012 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  para 17-*epi*-17-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP y  $0.25 \pm 0.09 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  en el caso de 17-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP). Finalmente, la ingesta de AM fue capaz de disminuir la concentración urinaria de 17-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP hasta  $0.05 \pm 0.02 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ .

Las concentraciones de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs más altas correspondieron a *ent*-7(R)-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP ( $3.1 \pm 0.3 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ ) y a *ent*-7-*epi*-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP ( $2.2 \pm 0.3 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ ), durante el periodo de control. La ingesta de cada mosto ocasionó una disminución similar y significativa ( $p < 0.05$ ) de ambos compuestos, en los tres casos. De hecho, la ingesta de CMM derivó en la excreción de  $1.8 \pm 0.3 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  para *ent*-7(R)-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP, y una excreción de  $1.6 \pm 0.2 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  para *ent*-7-*epi*-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP. Tanto AM ( $1.9 \pm 0.1 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  para *ent*-7(R)-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP y  $1.7 \pm 0.2 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  para *ent*-7-*epi*-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP), como HEM ( $2.0 \pm 0.4 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  para *ent*-7(R)-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP y  $1.3 \pm 0.2 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  para *ent*-7-*epi*-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP), siguieron la misma tendencia.

Al igual que se observó con los mostos, los vinos también disminuyeron de manera significativa ( $p < 0.05$ ) la excreción de *ent*-7(R)-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP y de *ent*-7-*epi*-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP tras su ingesta. Los valores de *ent*-7(RS)-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP fueron  $1.3 \pm 0.3 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  para CMW,  $1.6 \pm 0.2 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  para AW y  $1.4 \pm 0.2 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  para HEW. A su vez, los valores obtenidos de *ent*-7-*epi*-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP en orina

fueron  $0.8 \pm 0.1 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ ,  $1.0 \pm 0.1 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  y  $1.2 \pm 0.1 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ ; como consecuencia de la ingesta de CMW, AW y HEW, respectivamente.

La ingesta de etanol, marcada por WR, fue capaz de disminuir la concentración urinaria de *ent-7(R)-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoP* comparada con el periodo de control ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se encontró ninguna otra variación significativa de cualquier otro F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs tras dicha ingesta ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 12.** Análisis cuantitativo del contenido en orina de NeuroPs y F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs

	CONTROL	WR	CMW	CMM	AW	AM	HEW	HEM
<b>NeuroPs</b>								
4(R)-F <sub>4t</sub>	2.4±0.1	1.9±0.2	1.2±0.2	1.9±0.2	1.2±0.4	1.6±0.3	1.0±0.1	1.2±0.2
4- <i>epi</i> -4-F <sub>3t</sub>	0.67±0.13	0.51±0.11	0.41±0.07	0.52±0.19	0.48±0.13	0.62±0.21	0.37±0.09	0.46±0.08
4-F <sub>3t</sub>	0.26±0.06	0.21±0.05	0.18±0.04	0.18±0.04	0.19±0.07	0.20±0.07	0.19±0.04	0.19±0.06
10- <i>epi</i> -10-F <sub>4t</sub>	0.95±0.24	1.12±0.25	0.89±0.18	0.73±0.16	0.64±0.28	0.86±0.19	0.60±0.17	0.56±0.21
10-F <sub>4t</sub>	0.51±0.11	0.85±0.32	0.42±0.09	0.36±0.10	0.36±0.20	0.39±0.17	0.41±0.17	0.37±0.24
<b>F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs</b>								
17- <i>epi</i> -17-F <sub>2t</sub>	0.08±0.02	0.05±0.01	0.04±0.02	0.04±0.01	0.03±0.01	0.05±0.02	0.04±0.04	0.04±0.02
17-F <sub>2t</sub>	0.70±0.10	0.39±0.09	0.31±0.13	0.44±0.09	0.25±0.10	0.46±0.08	0.28±0.12	0.25±0.09
<i>ent-7(R)-7-F<sub>2t</sub></i>	3.1±0.3	2.5±0.3	1.3±0.3	1.8±0.3	1.6±0.2	1.9±0.1	1.4±0.2	2.03±0.4
<i>ent-7-epi-7-F<sub>2t</sub></i>	2.2±0.3	1.9±0.3	0.8±0.1	1.6±0.2	1.0±0.1	1.7±0.3	1.2±0.1	1.3±0.2

Los resultados se expresan en  $\mu\text{g } 24^{-1} \pm \text{SD}$ . WR: Ron blanco; CMW/CMM: vino/mosto con maceración carbónica; AW/AM: vino/mosto crianza; HEW/HEM: vino/mosto de autor

Como se puede apreciar, la excreción de la mayoría de los NeuroPs individuales no varió de forma significativa ( $p > 0.05$ ). Efectivamente, 4-*epi*-4-F<sub>3t</sub>-NeuroP, 4-F<sub>3t</sub>-NeuroP, 10-*epi*-10-F<sub>4t</sub>-NeuroP y 10-F<sub>4t</sub>-NeuroP, no demostraron diferente excreción urinaria tras la ingesta de ningún vino o mosto ( $p > 0.05$ ). No obstante, hay algunos puntos destacables.

El NeuroP más abundante en orina fue 4(R)-F<sub>4t</sub>-NeuroP ( $2.4 \pm 0.1 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ ). Tras la ingesta de los mostos, la concentración urinaria de 4(R)-F<sub>4t</sub>-NeuroP fue menor que la observada en el grupo control ( $1.9 \pm 0.2 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ ,  $1.6 \pm 0.3$  y  $1.2 \pm 0.2 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$ ).

24h<sup>-1</sup> para CMM, AM y HEM respectivamente). Como puede observarse, esa concentración fue significativamente inferior tras la ingesta de AM y HEM ( $p < 0.05$ ). Tras la ingesta de los vinos, la concentración de 4(R)-F<sub>4t</sub>-NeuroP fue significativamente inferior en los tres casos. Los valores más bajos fueron los encontrados tras la ingesta de HEW (1.0±0.1 µg 24h<sup>-1</sup>). Curiosamente, tras la ingesta de AW y CMW se encontraron concentraciones muy similares en orina (1.2±0.4 µg 24h<sup>-1</sup> y 1.2±0.2 µg 24h<sup>-1</sup> respectivamente tras ambos tratamientos).

Al analizar los efectos de la ingesta de WR se detectaron concentraciones más altas de dos NeuroPs. Concretamente, 4(R)-F<sub>4t</sub>-NeuroP y 10-F<sub>4t</sub>-NeuroP presentaron superiores concentraciones en orina, comparado con la ingesta de vinos y mostos respectivamente. De este modo, tras la ingesta de los tres vinos se encontró una excreción de 4(R)-F<sub>4t</sub>-NeuroP significativamente menor ( $p < 0.05$ ) que tras la ingesta de WR. Finalmente, la concentración urinaria de 10-F<sub>4t</sub>-NeuroP también disminuyó tras la ingesta de los tres mostos de origen.

A juzgar por la similitud de los resultados obtenidos tras la ingesta de vinos y sus correspondientes mostos, los procesos de vinificación no parecen afectar la capacidad neuroprotectora de los vinos cuando se mide mediante la excreción urinaria de NeuroPs. Contrariamente, la excreción de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs, sí parece variar tras la ingesta de un mosto y su correspondiente vino terminado. Tanto *ent-7(R)-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoPs* como *ent-7-epi-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoPs* variaron su excreción en algunos casos. De hecho, *ent-7(R)-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoPs* presentó mayor concentración ( $p < 0.05$ ) tras la ingesta de MCM (1.8±0.3 µg 24h<sup>-1</sup>) que tras la ingesta de MCW (1.3±0.3 µg 24h<sup>-1</sup>). La ingesta de AW también puso de manifiesto la importancia del proceso de vinificación, ya que tras su ingesta se vio reducida la excreción de *ent-7-epi-7-F<sub>2t</sub>-Dihomo-IsoPs* (1.0±0.1 µg 24h<sup>-1</sup>) en mayor medida que tras la ingesta de AM (1.7±0.3 µg 24h<sup>-1</sup>), su mosto de origen.

### 3.4. RELACIÓN ENTRE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL VINO Y LOS MARCADORES DE ESTRÉS DEL SNC

El vino tinto ha demostrado ejercer neuroprotección *in vivo*, atribuido principalmente a su contenido en compuestos bioactivos y sus propiedades antioxidantes (Basli y col., 2012; Gómez-Serranillos y col., 2009; Rodríguez-Naranjo y col., 2011). Como ya se ha indicado previamente, tanto MEL como



OHTyr son capaces de actuar como agentes antioxidantes a nivel local, gracias a su capacidad para traspasar la barrera hematoencefálica (Fernández-Mar y col., 2012; Rodríguez-Naranjo y col., 2011). Los resultados del estudio de regresión realizado para la excreción urinaria de NeuroPs y F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs se reflejan en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Coeficientes de determinación derivados del estudio de regresión simple y de regresión múltiple de la excreción urinaria de NeuroPs y F<sub>2</sub>-Dihomo-Isops.

	Total NeuroPs	Total F <sub>2</sub> -Dihomo-IsoPs
<b>Regresión simple (R<sup>2</sup>)</b>		
MEL	0.135	0.439
OHTyr	0.155	0.207
HV-Acid	0.003	0.080
HV-Alc	0.072	0.331
TPC	0.044	0.327
<b>Regresión múltiple</b>		
R <sup>2</sup> Tot.	0.236	0.441
R <sup>2</sup> Sel.	0.165 (OHTyr)	0.439 (MEL)

MEL: Melatonina; HV-Acid: Ácido homovanílico; HV-Alc: Alcohol homovanílico; OHTyr: Hidroxitiroso; TPC: Compuestos fenólicos totales. R<sup>2</sup> Tot.: coeficiente de regresión múltiple que expresa la importancia estadística de todos los compuestos estudiados con respecto a cada marcador. R<sup>2</sup> Sel.: coeficiente de regresión múltiple de los compuestos seleccionados por su robustez estadística con el modelo.

Como puede observarse, el estudio de regresión simple muestra que la excreción de NeuroPs está condicionada principalmente por la ingesta de OHTyr (en un 15.5%). Mientras tanto, la ingesta de MEL, HV-Acid, HV-Alc y del TPC fueron responsables del 13.5%, 0.3%, 7.2% y 4.4% del cambio observado en la excreción de NeuroPs en orina, respectivamente. Finalmente, el análisis de regresión múltiple siguió la misma tendencia que se observó tras la regresión simple, mostrando un escaso peso estadístico para el conjunto de compuestos presentes en los mostros y vinos. Únicamente el 23.6% del cambio observado en la excreción de NeuroPs se puede explicar mediante el modelo estadístico. Este mismo modelo, mostró que la ingesta de OHTyr explica el 16.5% del cambio

observado en la variación de NeuroPs, teniendo en cuenta todos los compuestos incluidos en las bebidas del estudio.

Es evidente pues, que la excreción de NeuroPs debe estar influida por diversos factores que no pueden ser determinados en este estudio. Sin embargo, la ingesta de los diversos compuestos (especialmente OHTyr), podría ser parcialmente responsable de la disminución en la excreción de NeuroPs observada en orina.

El estudio de regresión en relación a la excreción de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs, mostró una mayor influencia de los distintos compuestos contenidos en las bebidas que la comentada anteriormente para la excreción urinaria de NeuroPs. Al realizar el estudio de regresión simple, la excreción urinaria de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs resultó estar condicionada en un 43.9% por la ingesta de MEL, en un 20.7% por la de OHTyr, en un 8% por la de HV-Acid, en un 33.1% por la de HV-Alc y en un 32.7% por la ingesta del TPC. Por otra parte, el estudio de regresión múltiple demostró que las variaciones observadas en la excreción de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs están condicionadas en un 44.1% por el contenido total de los compuestos a estudio simultáneamente. Sin embargo, la ingesta de MEL resultó la más determinante en dicha excreción, siendo responsable del 43.9% del descenso observado en la excreción de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs.

Por tanto, todos los compuestos bioactivos anteriores, junto al TPC parecen ejercer neuroprotección. Por un lado, MEL parece ejercer su efecto neuroprotector mediante la protección oxidativa del AdA, medida por la formación F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs urinarios. Mientras que OHTyr ha demostrado ser responsable de la protección del DHA y EPA contra especies oxidativas, medida por la producción total de NeuroPs en orina.

Las diferencias observadas, entre los tratamientos de los distintos vinos y mostos, podrían estar relacionadas con su contenido en MEL. De hecho, la ingesta de CMW, que contiene la cantidad más alta de este compuesto ( $161.8 \pm 7.1$  ng mL<sup>-1</sup>), ejerció una disminución significativamente mayor en la excreción urinaria de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales en comparación con la ingesta de CMM, su mosto de origen ( $p=0.015$ ).

Teniendo en cuenta estos resultados y el hecho de que MEL puede actuar como un compuesto antioxidante, además de su capacidad para traspasar la barrera hematoencefálica, es evidente que este compuesto en la matriz de vinos terminados debe reflejarse como un activo neuroprotector frente a la oxidación de AdA (Fernández-Mar y col., 2012). Especialmente, la disminución en la concentración de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales en orina en comparación con el periodo de control, es representativo de la protección oxidativa del tejido blanco neuronal (Durand y col., 2013).

Los efectos del vino en la peroxidación de lípidos ya se han descrito anteriormente. La ingesta de vino conduce a una disminución en la producción de compuestos resultantes de la oxidación lipídica (Pignatelli y col., 2006; Schrieks y col., 2013). No obstante, hasta donde nosotros sabemos no se han encontrado informes previos sobre la relación entre MEL u OHTyr y NeuroPs o F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs. Por tanto, ésta es la primera vez que se describe la relación *in vivo* de estas moléculas bioactivas en la matriz de vino tinto, ligadas a la protección oxidativa de AdA, EPA y DHA.

Como era de esperar, los procesos de vinificación, refuerzan el efecto neuroprotector de los mostos, relacionados con la formación de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales (Rodríguez-Naranjo y col., 2011). En general, aunque no de forma estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), el consumo de vino tinto ocasionó una disminución mayor en la concentración urinaria de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales que la ingesta de mostos.

Es evidente la estrecha correlación entre la ingesta de OHTyr y la excreción urinaria de NeuroPs totales. Esta correlación inversa también se puede apreciar entre la ingesta de MEL con la excreción urinaria de F<sub>2</sub>-Dihomo-IsoPs totales. Los mostos han demostrado cantidades consistentes tanto de HV-Acid como de HV-Alc, sin embargo no contienen cantidades apreciables de MEL ni de OHTyr. Por el contrario, los vinos contienen una cantidad considerable de todos los compuestos bioactivos sometidos a estudio, siendo CMW el vino que mayor contenido relativo tiene de todos los compuestos (Tabla 8). Por tanto el consumo de CMW podría derivar en un mayor efecto neuroprotector, debido a su alto contenido de todos los compuestos bioactivos de este estudio.

#### 4. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO MEDIANTE EL ANÁLISIS DE CATABOLITOS DE OXIDACIÓN DE ADN. MARCADORES DE MUTAGÉNESIS

##### 4.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE CATABOLITOS DE OXIDACIÓN DE ADN

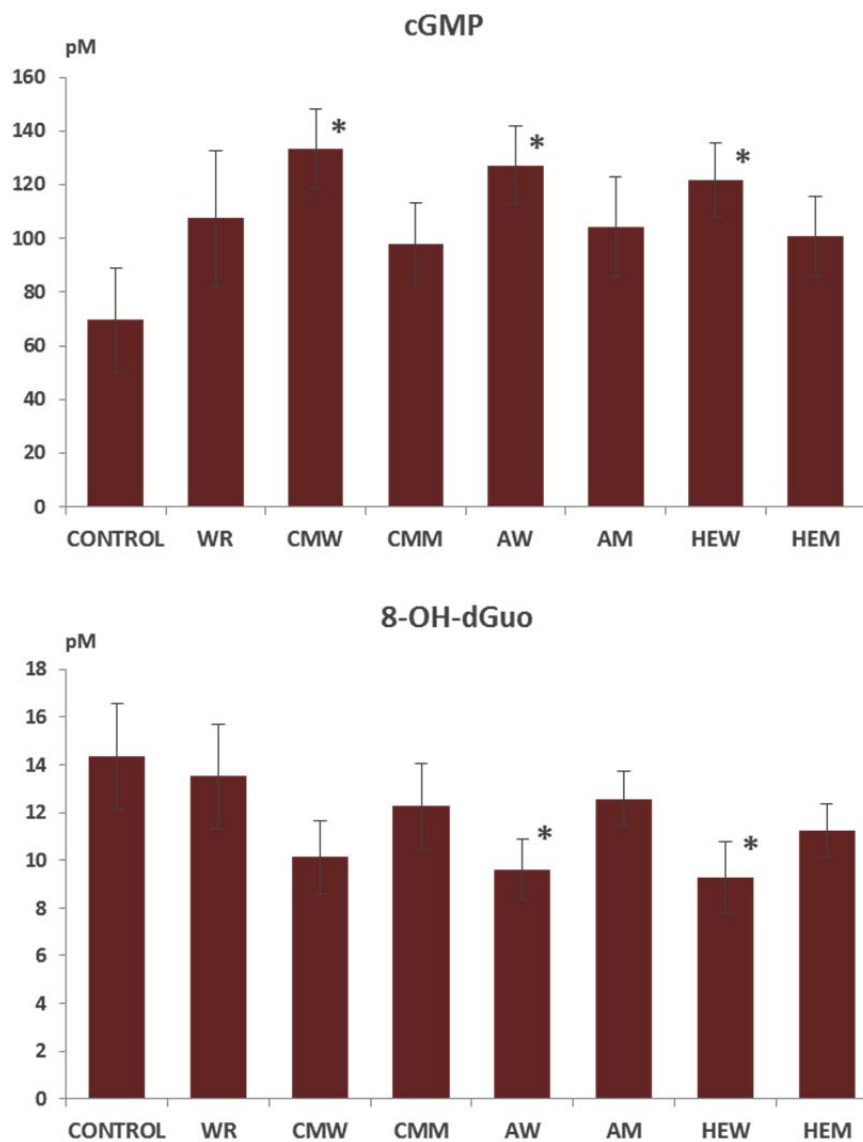
De los siete metabolitos optimizados, sólo cuatro fueron identificados en todas y cada una de las muestras de plasma de los voluntarios: cGMP, 8-OH-2'-desoxiguanosina, 8-OH-guanina y 8-NO<sub>2</sub>-guanosina. Sin embargo, los otros tres catabolitos (8-OH-guanosina, 8-NO<sub>2</sub>-cGMP, y 8-NO<sub>2</sub>-guanina) no se detectaron en ninguna de las muestras de plasma analizadas.

##### 4.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE CATABOLITOS DE OXIDACIÓN DE ADN

Los catabolitos individuales identificados en las muestras de plasma de las distintas etapas del estudio se muestran en las Figuras 16a y 16b. Las variaciones en el contenido plasmático de los catabolitos de DNA difieren entre los distintos metabolitos, y su efecto fisiológico es diferente uno de otro, de modo que su análisis se realizó de forma individual.

La concentración en plasma de cGMP tras la etapa de control fue  $69.7 \pm 19.4$  pM, muy inferior a la concentración observada tras las siguientes etapas del estudio. En primer lugar, tras la ingesta de WR se observó un incremento de la concentración de cGMP, llegando a  $107.5 \pm 25.4$  pM. Este incremento en la concentración de cGMP también se observó tras la ingesta de los tres tipos de mosto. Así pues, la concentración plasmática de cGMP tras la ingesta de CMM ( $97.8 \pm 15.6$  pM), de AM ( $104.2 \pm 18.7$  pM) y de HEM ( $101.1 \pm 14.8$  pM), fue muy similar ( $p > 0.05$ ) a la observada tras la ingesta de WR. Cabe destacar que el aumento aproximado en la concentración plasmática de cGMP tras la ingesta de WR y de los tres mostos, aun siendo de un 30% aproximadamente, no fue estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, tras la ingesta de los tres diferentes vinos sí se observó un incremento estadísticamente significativo en la concentración plasmática de cGMP. Tras la ingesta de CMW, la concentración de cGMP ascendió ( $p < 0.01$ ) hasta  $133.4 \pm 15.0$  pM, mientras que tras la ingesta de AW

y HEW la concentración plasmática de cGMP se incrementó ( $p<0.05$ ) hasta  $127.2\pm 14.7$  pM y  $121.9\pm 13.9$  pM respectivamente.



**Figura 16a.** Concentración plasmática de guanósil monofosfato cíclica (GMP) y 8-OH-2'-desoxiguanosina (8-OH-dGuo). Los valores se expresan en  $\mu\text{M}$ . Los asteriscos indican diferencias significativas.

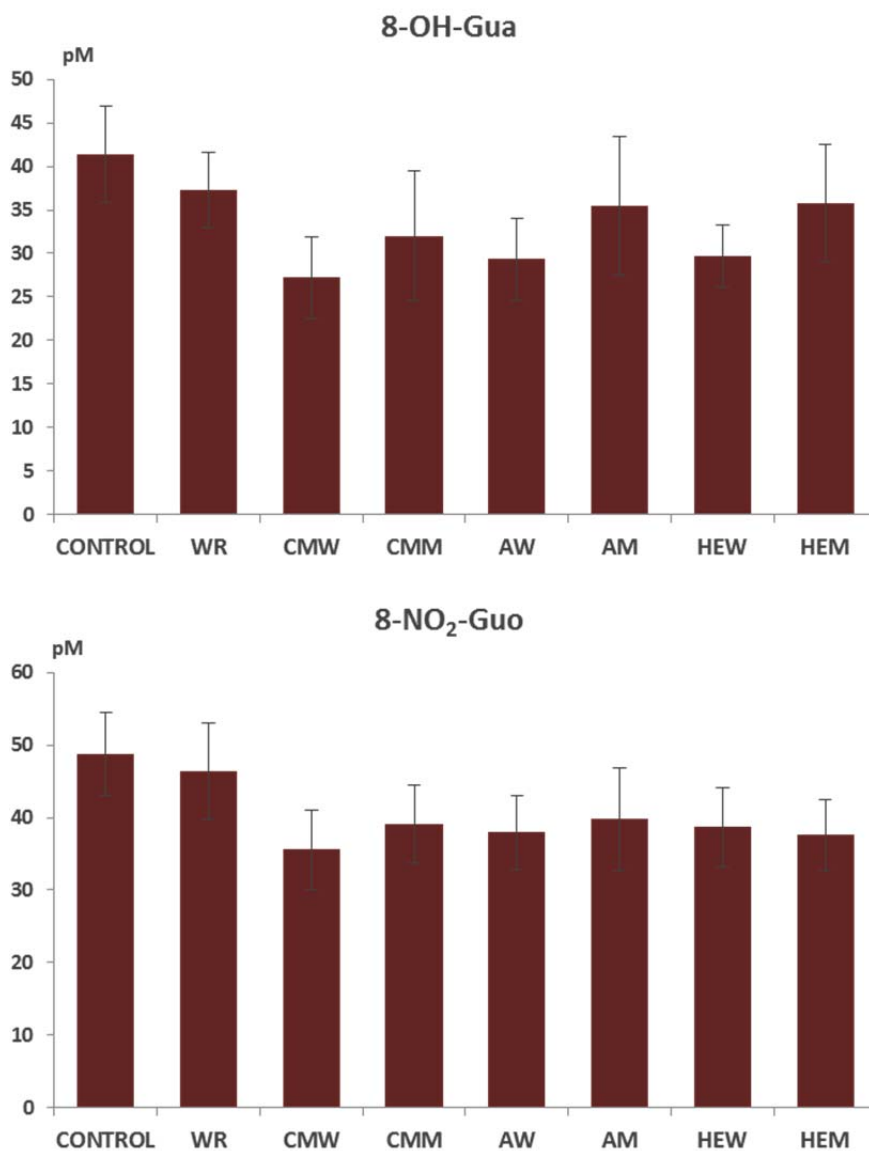
A la hora de abordar la concentración plasmática de 8-OH-2'-desoxiguanosina, también se observaron variaciones tras la ingesta de las diferentes bebidas del estudio. Tras la etapa de control, la concentración

plasmática fue  $14.3 \pm 2.2$  pM, sin embargo descendió tras cada una de las etapas del estudio. La disminución menos acusada se observó tras la ingesta de WR. De hecho, la concentración de 8-OH-2'-desoxiguanosina descendió de forma poco significativa ( $p > 0.05$ ) hasta  $13.5 \pm 2.2$  pM. El descenso tras la ingesta de los tres tipos de mosto resultó ligeramente más pronunciado. Sin embargo, ninguno de los tres mostos logró disminuir de forma significativa ( $p > 0.05$ ) la concentración plasmática de 8-OH-2'-desoxiguanosina. De modo que su concentración disminuyó hasta  $12.2 \pm 1.8$  pM y  $12.6 \pm 1.1$  pM tras la ingesta de CMM y AM respectivamente. A su vez, tras la ingesta de HEM, la concentración se redujo hasta  $11.2 \pm 1.1$  pM. Finalmente, los cambios más pronunciados en la concentración plasmática de 8-OH-2'-desoxiguanosina, se observaron tras la ingesta de los tres tipos de vino. No obstante, la ingesta de CMW no derivó en un descenso estadísticamente más pronunciado que la ingesta de los mostos ( $p > 0.05$ ), encontrándose una concentración plasmática de  $10.1 \pm 1.5$  pM. Sin embargo, tras la ingesta de AW y HEW se observó una disminución mucho más acusada. Así pues, la concentración plasmática de 8-OH-2'-desoxiguanosina se redujo de forma significativa ( $p < 0.05$ ) hasta  $9.6 \pm 1.3$  pM y  $9.2 \pm 1.5$  pM, respectivamente.

La concentración plasmática de 8-OH-guanina y 8-NO<sub>2</sub>-guanosina, no sufrió variaciones significativas a lo largo de ninguna de las etapas del estudio *in vivo*. De este modo, tras el periodo de control se observaron concentraciones de  $41.4 \pm 5.5$  pM y  $48.7 \pm 5.7$  pM para 8-OH-guanina y 8-NO<sub>2</sub>-guanosina respectivamente. Sin embargo, aunque no de forma significativa ( $p > 0.05$ ) sí se observó una disminución en la mayoría de los casos. En primer lugar, tras la ingesta de WR la concentración de 8-OH-guanina y 8-NO<sub>2</sub>-guanosina se mantuvo prácticamente igual ( $37.2 \pm 4.3$  pM y  $46.4 \pm 6.6$  pM respectivamente) que al finalizar el periodo de control ( $p > 0.05$ ). Tras las siguientes etapas del estudio, las concentraciones plasmáticas de 8-OH-guanina y 8-NO<sub>2</sub>-guanosina fueron más dispares.

Tras la ingesta de los tres tipos de mosto, la concentración de 8-OH-guanina se redujo hasta  $35.4 \pm 7.9$  pM en el caso de AW, y hasta  $35.7 \pm 6.7$  tras la ingesta de HEW, siendo ligeramente inferior ( $p > 0.05$ ) tras el periodo de ingesta de CMW ( $32.0 \pm 5.3$  pM). Posteriormente, la ingesta de los tres tipos de vino consiguió reducir la concentración de 8-OH-guanina de forma más efectiva que los mostos.

Así pues, la concentración se vio reducida ( $p < 0.05$ ) hasta  $27.2 \pm 4.6$  pM,  $28.4 \pm 5.1$  pM y  $29.7 \pm 3.5$  pM tras la ingesta de CMW, AW y HEW, respectivamente.



**Figura 16b.** Concentración plasmática de 8-OH-guanina (8-OH-Gua) y 8-NO<sub>2</sub>-guanosina (NO<sub>2</sub>-Guo). Los valores se expresan en  $\mu$ M.

Finalmente, la concentración plasmática de 8-NO<sub>2</sub>-Guanosina tras la ingesta de los tres mostos y los tres vinos, fue muy similar ( $p > 0.05$ ) a la encontrada tras la ingesta de WR y el periodo de control. De este modo, su concentración tras la

ingesta de CMM, AM y HEM fue  $39.1 \pm 5.3$  pM,  $39.8 \pm 7.1$  pM y  $37.6 \pm 4.8$  pM respectivamente. Asimismo, se encontraron concentraciones de  $35.5 \pm 5.4$  pM,  $38.0 \pm 5.1$  pM y  $38.6 \pm 5.4$  pM tras la ingesta de CMW, AW y HEW respectivamente.

#### 4.3. EFECTOS DE LA INGESTA DE VINO Y MOSTO EN RELACIÓN CON LA OXIDACIÓN NO ENZIMÁTICA DE ADN.

Todos los metabolitos a estudio son producidos a partir de nucleótidos y nucleósidos de ADN y ARN. Sin embargo, su acción biológica y su uso como marcadores patogénicos, difieren entre los distintos compuestos analizados. Así pues, la acción biológica de cGMP es completamente diferente de 8-OH-2'-desoxiguanosina, 8-OH-Guanina y 8-NO<sub>2</sub>-Guanosina; así como su uso como marcador biológico.

Como se ha comentado previamente, algunos estudios indican que el vino tinto mejora la función y la expresión de eNOS en un proceso dependiente de los antioxidantes propios de la matriz del vino, con marcadas diferencias de actividad entre ellos (Hellsten y col., 2012). No solo los antioxidantes del vino son mediadores del incremento de NO, el etanol también ha demostrado capacidad para ejercer vasodilatación mediada por la activación de eNOS (Venkov y col., 1999).

Efectivamente, la ingesta de las distintas bebidas del presente estudio derivó en un incremento de la concentración plasmática de cGMP. Tanto la ingesta de etanol (marcada por la toma de WR), como la ingesta única de antioxidantes (marcada por la toma de los tres tipos de mosto) incrementaron la concentración plasmática de cGMP sobre un 30%, aunque este incremento resultó no ser estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, la ingesta conjunta de etanol y antioxidantes (marcada por la ingesta de los tres tipos de vino) ocasionó un incremento mayor que la ingesta de cada uno por separado (mediante la toma de WR o de mostos). Este incremento fue de un 49% tras la ingesta de CMW, y de aproximadamente un 44% tras la ingesta de AW y HEW. En los tres casos este incremento fue estadísticamente significativo ( $p < 0.01$  (CMW) y  $p < 0.05$  (AW y HEW)). Por lo tanto, el efecto sinérgico del etanol junto al de los distintos compuestos bioactivos, refuerza los efectos cardioprotectores derivados de la ingesta de vino tinto.



La acción y el uso como marcadores biológicos de 8-OH-2'-desoxiguanosina (Valavanidis y col., 2013), 8-OH-guanina y de 8-NO<sub>2</sub>-guanosina difiere completamente de lo comentado anteriormente para cGMP. Si bien cada uno con sus particularidades, un aumento en la concentración plasmática de estos metabolitos es fiel reflejo de patología carcinogénica y aumento del estrés oxidativo. El incremento de sustancias oxidantes ha demostrado ejercer un papel en la iniciación y la progresión de las distintas etapas de los procesos carcinogénicos. Lesiones oxidativas como la formación de 8-OH-2'-desoxiguanosina, 8-OH-guanina y 8-NO<sub>2</sub>-guanosina junto a su potencial mutagénico, les coloca como marcadores intermedios en la progresión de enfermedades como el cáncer. Sin embargo, parece ser que estos metabolitos están más estrechamente relacionados con la iniciación, que con la propagación de las lesiones en el cáncer (Toyokuni y col., 1995).

En la presente Tesis, la concentración plasmática de 8-OH-2'-desoxiguanosina fue diferente a lo largo de las distintas etapas del estudio. Tras la ingesta de etanol mediante la toma de WR, la concentración de 8-OH-2'-desoxiguanosina apenas sufrió variación alguna ( $p>0.05$ ). En la misma línea, tras la ingesta de los tres tipos de mosto, se observó una ligera disminución en la concentración plasmática de este metabolito, que no resultó estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ). Finalmente, tras la ingesta de los tres tipos de vino, se observaron diferencias significativas con respecto al periodo de control. Así pues, mientras que la ingesta de CMW ocasionó una disminución de la concentración del 29% (que no fue estadísticamente significativa ( $p>0.05$ )), la concentración plasmática de 8-OH-2'-desoxiguanosina disminuyó de forma significativa ( $p<0.05$ ) (un 32% aproximadamente), tras la ingesta de AW y HEW. Otro metabolito, como 8-oxo-2'-desoxiguanosina ya ha sido estudiado *in vivo* en plasma tras la ingesta de vino tinto, viendo reducida su concentración su ingesta por voluntarios sanos (Urquiaga y col., 2010). Sin embargo, el efecto *in vivo* de la ingesta de vino sobre la concentración plasmática de 8-OH-2'-desoxiguanosina, todavía no se había estudiado previamente. Por lo tanto, la capacidad antioxidante de los distintos compuestos bioactivos se pone de manifiesto al derivar en un descenso de la concentración plasmática de 8-OH-2'-desoxiguanosina. Este hecho ha sido demostrado por primera vez tras la ingesta de vino o mosto en la presente Tesis Doctoral.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral muestran un descenso en la concentración plasmática de 8-OH-guanina tras la ingesta de las bebidas a estudio. Aunque de forma poco significativa ( $p > 0.05$ ), se observaron diferencias respecto a la ingesta de cada bebida. La concentración se redujo un 10% tras ingerir RW, entre un 22% y un 13% tras la ingesta de los mostos y, finalmente, entre un 35% y un 27% tras ingerir los tres vinos. La importancia de la 8-OH-guanina, reside en su implicación en el proceso de reparación de ADN (Cheng y col., 1992). Debido al potencial mutagénico de 8-OH-guanina, este proceso es de gran importancia, ya que un error en el proceso podría dar lugar a una transcripción errónea de Guanina-Citosina a Timina-Adenina, si la reparación de la base dañada no se produce antes de la replicación del ADN (Cheng y col., 1992). Por tanto, al ser un producto de escisión derivado del proceso de reparación enzimática de ADN, el descenso observado tras la ingesta de las bebidas a estudio, es representativo de una menor reparación de 8-OH-guanina oxidada, ocasionado a su vez por una mejora del estado redox del organismo tras la ingesta de los distintos vinos tintos.

Un marcador de daño oxidativo dependiente de nitrógeno es 8-NO<sub>2</sub>-guanosina, generado tras el daño oxidativo a ADN por peroxinitrito (Akuta y col., 2006). En la presente Tesis, la concentración plasmática de 8-NO<sub>2</sub>-guanosina no varió de forma estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) tras la ingesta de ninguna de las distintas bebidas. Sin embargo, se apreciaron algunas diferencias destacables. Así pues, la ingesta de WR no mostró un efecto considerable sobre la concentración plasmática de 8-NO<sub>2</sub>-guanosina, observándose una concentración muy similar al periodo de control. Sin embargo, sí se observó una disminución ligeramente más acusada tras la ingesta del resto de las bebidas a estudio. Sobre todo tras la ingesta de CMW (observándose una disminución del 27%) mientras que, la ingesta de las demás bebidas ocasionó una disminución de un 22% aproximadamente. La 8-NO<sub>2</sub>-guanosina tiene un papel fisiológico en la respuesta protectora frente a procesos inflamatorios y patológicos, como compuesto mutagénico. De hecho pueden encontrarse estudios publicados sobre niveles elevados de 8-NO<sub>2</sub>-guanosina en células y tejidos tumorales (Kaneko y col., 2008). Aunque no de forma muy pronunciada, el descenso en la concentración plasmática de 8-NO<sub>2</sub>-guanosina tras la ingesta del vino y del mosto indica la

capacidad antioxidante de todos los compuestos estudiados en la presente Tesis Doctoral.

El incremento de la concentración de cGMP (marcador de vasodilatación mediado por la liberación de NO) y la disminución de la concentración de 8-OH-desoxiguanosina, 8-OH-guanina y de 8-NO<sub>2</sub>-guanosina (marcadores de estrés oxidativo y compuestos carcinogénicos *per se*) refuerzan estudios previos sobre los efectos beneficiosos de la ingesta de vino tinto en dosis moderadas y de etanol, en menor medida, así como su importancia como exponente clave de la dieta mediterránea. Queda patente pues el posible papel del vino tinto como agente protector contra el ataque de radicales libres, a la vez que su implicación en la mejora y prevención de patologías inflamatorias o el cáncer.

#### 4.4. RELACIÓN ENTRE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y LOS MARCADORES DE OXIDACIÓN Y MUTAGÉNESIS DE ADN.

Al igual que para los marcadores de peroxidación lipídica, se realizó un análisis de regresión con el fin de determinar el peso estadístico que cada uno de los compuestos de las distintas bebidas pudiera tener en la concentración plasmática de los distintos marcadores. Los resultados obtenidos reflejan una sólida correlación entre 8-OH-2'-desoxiguanosina, cGMP y los compuestos bioactivos del vino (Tabla 14).

En general, la ingesta de cada uno de estos compuestos a través del vino y el mosto parece relacionarse de forma inversamente proporcional con la concentración plasmática de los marcadores de estrés oxidativo y mutagénicos (8-OH-2'-desoxiguanosina en mayor medida). Sin embargo, esta relación es directamente proporcional cuando se aborda el estudio de regresión para cGMP.

**Tabla 14.** Coeficientes de determinación derivados del estudio de regresión simple y de regresión múltiple de la concentración plasmática de cGMP, 8-OH-2'-desoxiguanosina (8-OH-dGuo), 8-OH-guanina (8-OH-Gua) y 8-NO<sub>2</sub>-guanosina (8-NO<sub>2</sub>-Guo)

	cGMP	8-OH-dGuo	8-OH-Gua	8-NO <sub>2</sub> -Guo
<b>Regresión simple (R<sup>2</sup>)</b>				
MEL	0.321	0.093	0.113	0.006
OHTyr	0.232	0.248	0.099	0.005
HV-Acid	0.162	0.090	0.048	0.000
HV-Alc	0.443	0.301	0.171	0.001
TPC	0.438	0.228	0.157	0.000
<b>Regresión múltiple</b>				
R <sup>2</sup> Tot.	0.490	0.331	0.193	0.026
R <sup>2</sup> Sel.	0.485 (MEL, HV-Alc)	0.301 (HV-Alc)	0.171 (HV-Alc)	Ninguna variable

MEL: Melatonina; HV-Acid: Ácido homovanílico; HV-Alc: Alcohol homovanílico; OHTyr: Hidroxitirosol; TPC: Compuestos fenólicos totales. R<sup>2</sup> Tot.: coeficiente de regresión múltiple que expresa la importancia estadística de todos los compuestos estudiados con respecto a cada marcador. R<sup>2</sup> Sel.: coeficiente de regresión múltiple de los compuestos seleccionados por su robustez estadística con el modelo.

Así pues, se acaba de hacer mención a la relación observada entre la ingesta de los compuestos bioactivos y la concentración plasmática de cGMP. El estudio de regresión simple, mostró que la concentración plasmática de cGMP está condicionada en un 32.1% por la ingesta de MEL, en un 23.2% por la de OHTyr, en un 16.2% por la de HV-Acid, en un 44.3% por la de HV-Alc y en un 43.8% por la ingesta del TPC. Por su parte, el análisis de regresión múltiple determinó que, la ingesta de todos los compuestos a estudio, influye sobre la concentración plasmática de cGMP en un amplio 49%. Es de destacar que casi toda esa influencia, está determinada por la ingesta de MEL y HV-Acid, siendo responsables del 48.5% de los cambios observados en la concentración de cGMP.

Al contrario que para cGMP, la relación entre los compuestos bioactivos y la concentración plasmática de 8-OH-2'-desoxiguanosina, 8-OH-guanina y 8-NO<sub>2</sub>-guanosina resultó ser inversamente proporcional. Los cambios observados en la concentración plasmática de 8-OH-2'-desoxiguanosina se explican en un 9.3% por la ingesta de MEL, en un 24.8% por la de OHTyr, en un 9% por la de HV-Acid, en

un 30.1% por la de HV-Alc y en un 22.8% por el ingesta del TPC, cuando se estudia cada compuesto por separado mediante un estudio de regresión simple. No obstante, al analizar el peso estadístico de todas las variables simultáneamente mediante el estudio de regresión múltiple, se observa una influencia del 33.1% en los cambios producidos en la concentración de 8-OH-2'-desoxiguanosina. El HV-Acid fue el compuesto que más peso estadístico mostró en esta relación, explicando el 30.1% de estos cambios observados.

Finalmente, el análisis de regresión para 8-OH-guanina y para 8-NO<sub>2</sub>-guanosina mostró unos resultados menos significativos que para los dos marcadores anteriores. De hecho, como se ha mencionado al estudiar las variaciones en la concentración de 8-OH-guanina y 8-NO<sub>2</sub>-guanosina durante el transcurso del estudio, ninguna de las bebidas a estudio fue capaz de reducir la concentración de 8-OH-guanina o de 8-NO<sub>2</sub>-guanosina de manera significativa (Figuras 16a y 16b). Así pues, tras el análisis de regresión simple, quien mostró mayor influencia de forma individual sobre la concentración plasmática de 8-OH-guanina y 8-NO<sub>2</sub>-guanosina fue el TPC (apenas un 15.7% de influencia) y MEL (con una escasa influencia del 0.6%). El análisis de regresión múltiple, teniendo en cuenta todos los compuestos de forma simultánea, no mejoró en gran medida esta influencia. Como resultado, los distintos compuestos en conjunto mostraron una influencia del 19.35% (siendo HV-Alc el más determinante, con una influencia del 17.1% en los cambios observados) para la concentración de 8-OH-guanina. Mientras, la concentración de 8-NO<sub>2</sub>-guanosina apenas se vio influida en un 2.6% por el total de compuestos, lo que derivó en que ninguno de los distintos compuestos fuera capaz de explicar la pequeña variación observada en su concentración.

A juzgar por los resultados obtenidos, todos los compuestos bioactivos propios de los vinos y los mostos se relacionan con el contenido plasmático de los distintos marcadores, de forma positiva para el mantenimiento de la salud.

MEL se encuentra casi exclusivamente en los tres vinos terminados, y no se puede incorporar al organismo en grandes cantidades mediante la ingesta de mosto. Además, ha demostrado ser capaz de explicar, en gran medida junto a HV-Alc, la gran variación observada en la concentración de cGMP; el cual, tal como se ha visto previamente, es beneficioso por el efecto vasodilatador mediado por la acción del NO. No solo con cGMP, la ingesta de HV-Alc también ha

mostrado ser responsable de los cambios observados en la concentración plasmática de 8-OH-2'-desoxiguanosina.

Así pues, esta relación directamente proporcional con cGMP, refuerza aún más los estudios previos sobre la capacidad cardioprotectora del vino tinto, y su importancia dentro de una dieta equilibrada y de la Dieta Mediterránea (Renaud & De Lorgeril, 1992; Willett y col., 1995). Asimismo, la relación inversamente proporcional con los demás marcadores de la oxidación del ADN (sobre todo 8-OH-2'-desoxiguanosina), evidencia la capacidad antioxidante del vino tinto, así como su importancia en la prevención del cáncer (Giacosa y col., 2013; Havas, 1994).

## 5. NUEVOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA. FITOPROSTANOS

### 5.1. ANÁLISIS CUALITATIVO DE FITOPROSTANOS EN VINO Y MOSTO

Los fitoprostanos (FitoPs) individuales encontrados en las muestras de vino y mosto se expresan en la Tabla 15, un total de seis. Tras analizar los resultados, se apreció una considerable variación dentro las distintos tipos de muestras desde el punto de vista cualitativo. La serie E- y la serie L- únicamente se encontraron en CMW y HEM, en cantidades muy pequeñas ( $p < 0.05$ ).

De todos los FitoPs, hubo cuatro que se encontraron en todas las muestras analizadas, 9-F<sub>1t</sub>-FitoP, *ent*-16-*epi*-16-F<sub>1t</sub>-FitoP + *ent*-16-F<sub>1t</sub>-FitoP, 9-*epi*-9-D<sub>1t</sub>-FitoP y, por último, 9-D<sub>1t</sub>-FitoP.

**Tabla 15.** Contenido de fitoprostanos en muestras de vino y mosto

FITOPROSTANOS	CMW	AW	HEW	CMM	AM	HEM
9-F <sub>1t</sub> -FitoP	90.0±0.9	77.0±0.7	73.6±2.5	32.7±1.8	13.5±0.1	149.9±1.8
<i>ent</i> -16- <i>epi</i> -16-F <sub>1t</sub> -FitoP + <i>ent</i> -16-F <sub>1t</sub> -FitoP	19.9±0.4	133.9±2.3	124.9±1.8	6.7±0.3	4.5±0.08	50.1±0.08
9- <i>epi</i> -9-D <sub>1t</sub> -FitoP	0.48±0.02	0.11±0.02	0.09±0.005	0.68±0.03	0.17±0.06	21.5±2.2
9-D <sub>1t</sub> -FitoP	17.1±0.76	2.2±0.01	1.2±0.01	8.8±0.5	2.4±0.6	200.4±11.2
16-B <sub>1</sub> -FitoP + <i>ent</i> -16-B <sub>1</sub> -FitoP	0.31±0.001	-	-	-	-	2.5±0.1
9-L <sub>1</sub> -FitoP + <i>ent</i> -9-L <sub>1</sub> -FitoP	3.9±0.2	-	-	-	-	6.5±0.3

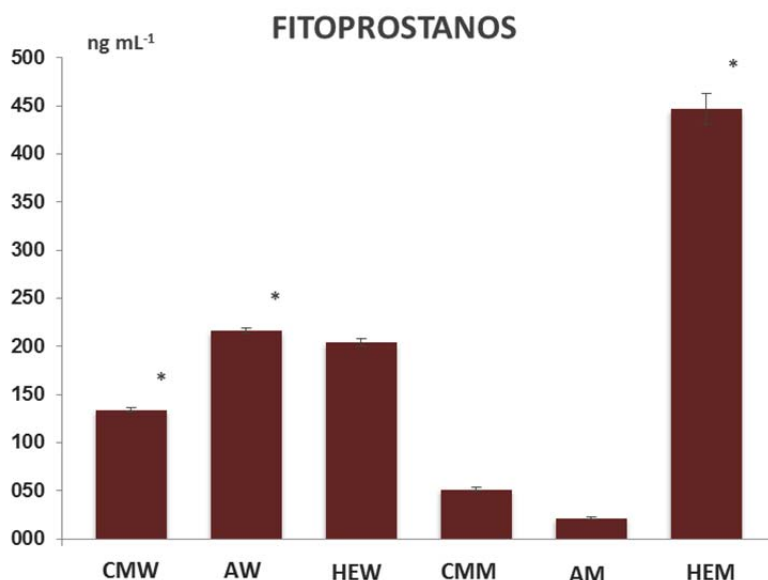
Los resultados se expresan en ng mL<sup>-1</sup>. CMW/CMM: vino/mosto de maceración carbónica; AW/AM: vino/mosto crianza; HEW/HEM: vino/mosto de autor.

### 5.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FITOPROSTANOS EN VINO Y MOSTO

La concentración de FitoPs totales de cada muestra está detallada en la Figura 17. La concentración total de FitoPs es muy variada entre los tres mostos de partida. De hecho, la cantidad de estos compuestos entre el mosto de origen del vino de maceración carbónica (CMM) (48.9±2.6 ng mL<sup>-1</sup>) y el mosto de origen del vino de crianza (AM) (20.5±0.9 ng mL<sup>-1</sup>), no fue estadísticamente significativa

( $p>0.05$ ). Sin embargo, el análisis de HEM mostró una cantidad de FitoPs muy superior ( $p<0.01$ ) a los otros dos mostos ( $430.9\pm 15.7$  ng mL<sup>-1</sup>).

HEM proviene de las uvas de cepas muy viejas (más de 50 años), que se encuentran expuestas a un estrés mayor que las cepas más jóvenes (Soleas y col., 1997). Esto puede ocasionar un incremento de la formación de especies prooxidantes, y la consecuente formación de peróxidos lipídicos como los FitoPs a partir de ALA. Por tanto, las diferencias agronómicas de las viñas pueden ser un factor muy importante en la formación final de FitoPs.



**Figura 17.** Contenido de fitoprostanos totales. CMW/CMM: vino/mosto con maceración carbónica; AW/AM: vino/mosto crianza; HEW/HEM: vino/mosto de autor. Los resultados se expresan en ng mL<sup>-1</sup>. Los asteriscos indican diferencias significativas entre vino y mosto.

En los vinos, la concentración total de FitoPs también fue dispar. Si bien la cantidad de FitoPs encontrada en el vino de crianza (AW) y en el vino de autor (HEW) fue similar ( $p>0.05$ ) ( $213.2\pm 3.1$  ng mL<sup>-1</sup> y  $199.8\pm 4.3$  ng mL<sup>-1</sup> respectivamente). La cantidad encontrada para CMW ( $131.7\pm 2.3$  ng mL<sup>-1</sup>), fue significativamente menor que para AW y HEW ( $p<0.05$ ).

La cantidad de FitoPs encontrada para las distintas series fue muy diferente entre los vinos y los mostos. La serie más abundante de FitoPs para todas las



muestras fue la F<sub>1</sub>-FitoPs ( $p < 0.05$ ). Dentro de esta serie, 9-F<sub>11</sub>-FitoP fue el compuesto más abundante ( $436.6 \pm 7.9$  ng mL<sup>-1</sup>). Para CMM, AM, HEM y CMW, la concentración de 9-F<sub>11</sub>-FitoP fue superior ( $p < 0.05$ ) ( $32.7 \pm 1.8$  ng mL<sup>-1</sup>;  $13.5 \pm 0.1$  ng mL<sup>-1</sup>;  $149.9 \pm 1.8$  ng mL<sup>-1</sup> y  $90.04 \pm 0.94$  ng mL<sup>-1</sup> respectivamente) que la concentración de la suma de *ent*-16-*epi*-16-F<sub>11</sub>-FitoP + *ent*-16-F<sub>11</sub>-FitoP ( $6.7 \pm 0.3$  ng mL<sup>-1</sup>;  $4.5 \pm 0.08$  ng mL<sup>-1</sup>;  $50.1 \pm 0.08$  ng mL<sup>-1</sup> y  $19.9 \pm 0.4$  ng mL<sup>-1</sup> respectivamente). Sin embargo, se detectó un cambio en la proporción dentro de la serie F<sub>1</sub>-FitoPs en las muestras AW y HEW. De este modo se encontraron cantidades mayores de la suma de *ent*-16-*epi*-16-F<sub>11</sub>-FitoP + *ent*-16-F<sub>11</sub>-FitoP ( $133.9 \pm 2.3$  ng mL<sup>-1</sup> para AW, y  $124.9 \pm 1.8$  ng mL<sup>-1</sup> para HEW), que de 9-F<sub>11</sub>-FitoP ( $76.9 \pm 0.7$  ng mL<sup>-1</sup> para AW y  $73.6 \pm 2.5$  ng mL<sup>-1</sup> para HEW). Por tanto, durante el proceso de vinificación podría producirse una translocación que invirtiera la proporción dentro de la serie F<sub>1</sub>-FitoPs.

La serie D<sub>1</sub>-FitoPs se encontró principalmente en HEM. Los dos compuestos de dicha serie se hallaron en gran cantidad tras el análisis de HEM. 9-*epi*-9-D<sub>11</sub>-FitoP ( $21.5 \pm 2.2$  ng mL<sup>-1</sup>), pero sobre todo ( $p < 0.05$ ) 9-D<sub>11</sub>-FitoP ( $200.4 \pm 11.2$  ng mL<sup>-1</sup>), mostraron concentraciones considerablemente altas. 9-D<sub>11</sub>-FitoP también se encontró en cantidades considerables ( $p < 0.05$ ) en CMM ( $17.1 \pm 0.8$  ng mL<sup>-1</sup>), que incluso son comparables a las encontradas en los aceites vegetales (Collado-González y col., 2015). Sin embargo, la cantidad de 9-*epi*-9-D<sub>11</sub>-FitoP encontrada en el resto de las muestras no excedió de  $0.68 \pm 0.03$  ng mL<sup>-1</sup>.

A diferencia de las prostaglandinas, los FitoPs se forman tras oxidación no enzimática, formando mezclas de regio- y estereoisómeros (Collado-González y col., 2015). De este modo, las condiciones analíticas empleadas durante el estudio, no permitieron la separación de los posibles enantiómeros de los segundos. Por tanto, los enantiómeros de las series L<sub>1</sub>- y B<sub>1</sub>- se cuantificaron de forma conjunta (Collado-González y col., 2015). Así pues, los FitoPs pertenecientes a estas dos series se cuantificaron como la suma de 16-B<sub>1</sub>-FitoP + *ent*-16-B<sub>1</sub>-FitoP y la suma de 9-L<sub>1</sub>-FitoP + *ent*-9-L<sub>1</sub>-FitoP. Tras el análisis de las muestras, no se encontraron cantidades significativas ( $p > 0.05$ ) para estas dos series. Únicamente CMW y HEM, mostraron concentraciones susceptibles de ser cuantificadas en base al límite de cuantificación, establecido en el método empleado para el análisis (Collado-González y col., 2015). De hecho, la suma de las concentraciones de 16-B<sub>1</sub>-FitoP +

*ent-16-B<sub>1</sub>-FitoP* y de 9-L<sub>1</sub>-FitoP + *ent-9-L<sub>1</sub>-FitoP* encontradas en CMW y HEM no fueron significativas comparadas con otras series de FitoPs ( $p < 0.05$ ).

### 5.3. INFLUENCIA DE LA VINIFICACIÓN EN EL CONTENIDO DE FITOPROSTANOS

El proceso de vinificación modifica el contenido inicial de FitoPs existente en los mostos. El contenido en FitoPs totales de CMW y AW es mayor que el existente en CMM y AM, sus mostos de origen. De este modo encontramos que CMM presentó un contenido de FitoPs totales de  $48.7 \pm 2.5$  ng mL<sup>-1</sup>; mientras que, tras la vinificación, la cantidad de FitoPs totales aumentó hasta los  $131.8 \pm 2.1$  ng mL<sup>-1</sup> en CMW. La misma tendencia se observó tras la vinificación de AM ( $20.5 \pm 0.7$  ng mL<sup>-1</sup> de FitoPs totales) hasta AW, el cual mostró una cantidad de FitoPs totales de  $213.1 \pm 2.9$  ng mL<sup>-1</sup>.

Las diferencias entre los mostos y sus vinos terminados, y las diferencias entre los distintos vinos puede deberse a varios factores. En caso de CMW, debido a su proceso de fermentación carbónica aplicado a su mosto de origen (CMM), puede aumentar el contenido de ROS, y el consecuente aumento en la peroxidación lipídica (Tesniere & Flanzy, 2011), además de la fermentación alcohólica y maloláctica llevada a cabo en tanques de acero inoxidable. En el caso de AW, su vinificación puede ser incluso más oxidativa que la descrita anteriormente. Esto es debido a las barricas de roble empleadas durante el proceso de fermentación y durante la posterior crianza. La madera de roble puede liberar compuestos pro-oxidantes al mosto, además de favorecer un contacto más prolongado del vino con el oxígeno exterior de la barrica, debido a la porosidad de la madera (Jackson, 2008). En el vino, la acumulación de ROS puede producirse debido a la reducción de metales de transición. Esto origina un aumento en la concentración de anión superóxido, radical hidropéroxido o de peróxido de hidrógeno, lo que puede ocasionar un aumento en la oxidación de ALA (Oliveira y col., 2011).

Por tanto, complementario al proceso de vinificación, la crianza del vino también parece influir en el contenido total de FitoPs. De hecho, tanto CMM como AM presentaron un contenido similar ( $p > 0.05$ ) de FitoPs totales. Pero, una vez

terminado el proceso de vinificación y de crianza de los vinos, el contenido de AW es superior ( $p < 0.05$ ) al contenido de CMW.

Contrariamente a lo ocurrido tras la vinificación de CMM y AM, al abordar el estudio de la vinificación de HEM, se observó una disminución del contenido total de FitoPs totales. Tras la vinificación, la cantidad total de FitoPs de HEW ( $199.8 \pm 4.3 \text{ ng mL}^{-1}$ ) fue dos veces menor ( $p < 0.05$ ) que la cantidad de FitoPs totales encontrada para HEM ( $430.9 \pm 15.7 \text{ ng mL}^{-1}$ ). La explicación puede encontrarse en los fenómenos que ocurren durante la vinificación. Los compuestos y las condiciones pro-oxidantes que están presentes durante la vinificación y la crianza del vino hacen que la estabilidad de los FitoPs intermedios quede en entredicho (Durand y col., 2009; Durand y col., 2011). Como se puede observar en la Figura 10, las diferentes series de FitoPs se producen a partir de la serie H-FitoPs. De ahí, pueden formarse las series D-FitoPs, E-FitoPs y F-FitoPs. Así pues, mientras que la serie F- puede considerarse como terminal, la serie D puede derivar en las series J-FitoPs y dJ-FitoPs. No es de extrañar, por tanto, que la concentración de FitoPs de la serie F<sub>1</sub>-FitoPs sea la mayoritaria en las muestras con mayor exposición a compuestos pro-oxidantes, como los vinos; ya que es un producto terminal de la degradación de ALA.

Por tanto, esta distinción entre FitoPs intermedios y terminales, puede servir para explicar las diferentes concentraciones de FitoPs totales entre HEW y HEM. Como se puede observar en la Tabla 15, la concentración de D<sub>1</sub>-FitoPs en HEW es prácticamente nula. Sin embargo, la concentración de la serie D<sub>1</sub>-FitoPs en HEM es relevante. De hecho, la cantidad de 9-D<sub>1</sub>-FitoPs ( $200.4 \pm 11.2 \text{ ng mL}^{-1}$ ) y de 9-*epi*-9-D<sub>1</sub>-FitoP ( $21.5 \pm 2.1 \text{ ng mL}^{-1}$ ) en HEM es prácticamente la mitad del total de FitoPs ( $430.9 \pm 15.7 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Si se considera a la serie D<sub>1</sub>-FitoPs como intermedia, la explicación de la disminución en la concentración en HEW con respecto a HEM podría deberse a la oxidación de la serie D<sub>1</sub>-FitoPs hasta las series J<sub>1</sub>-FitoPs y/o dJ<sub>1</sub>-FitoPs debido al aumento de los compuestos pro-oxidantes producidos durante la vinificación y crianza de HEM (Jackson, 2008).

#### 5.4. POSIBLES EFECTOS DE LA INGESTA DE VINOS Y MOSTOS EN BASE A SU CONTENIDO EN FITOPROSTANOS

La literatura científica ha resaltado la importancia de los FitoPs como lípidos bioactivos, no solo en matrices vegetales sino también en mamíferos (Minghetti y col., 2014). Aunque proceden de oxidación no enzimática, debido a la similitud estructural que guardan con las prostaglandinas e isoprostanos (prostanoides), los FitoPs pueden ejercer acciones beneficiosas en el organismo o en algún caso perniciosas, aunque el conocimiento en este aspecto es muy escaso hasta la fecha (Durand y col., 2011; Karg y col., 2007; Minghetti y col., 2014).

En los análisis realizados a los vinos y mostos se ha demostrado la alta concentración de F<sub>1</sub>-FitoPs en todas las muestras (436.6±7.9 ng mL<sup>-1</sup> para 9-F<sub>1</sub>-FitoP y 340.2±4.8 ng mL<sup>-1</sup> para la suma de *ent*-16-*epi*-16-F<sub>1</sub>-FitoP + *ent*-16-F<sub>1</sub>-FitoP). Según la literatura, la serie F<sub>1</sub>-FitoPs ha demostrado regular la respuesta inflamatoria en células dendríticas (Gilles y col., 2009). Karg y col. (2007) describieron que las series A<sub>1</sub>-FitoPs y B<sub>1</sub>-FitoPs son capaces de inhibir la liberación de NO en macrófagos RAW264. Así pues, diversas patologías como las enfermedades cardiovasculares podrían verse beneficiadas por los efectos de los FitoPs en el organismo. De hecho, Barden y col. (2009) estudiaron la actividad reguladora de la serie F<sub>1</sub>-FitoPs, y descubrieron posibles efectos cardioprotectores derivados de su acción vasodilatadora.

La importancia de los FitoPs puede estar relacionada también con efectos neuroprotectores. Minghetti y col. (2014) demostraron en modelos experimentales de células inmaduras del sistema nervioso central que los B<sub>1</sub>-FitoP son biológicamente activos, ya que fueron capaces de reducir el daño oxidativo ocasionado por peróxido de hidrógeno, a la vez de favorecer la síntesis de mielina en las vainas neuronales.

La absorción de FitoPs ha sido demostrada en voluntarios sanos *in vivo*. Barden y col. (2009) examinaron los efectos de un aceite con AA en la concentración de F<sub>1</sub>-FitoP y F<sub>2</sub>-IsoPs en orina y plasma. Ambos fluidos confirmaron la absorción de FitoPs a nivel intestinal, presentando una elevación de FitoPs esterificados y no esterificados superior en plasma que en orina. Así

pues, ello nos asegura la presencia de estos compuestos a nivel sistémico y su posible acción biológica en el organismo humano.

La considerable concentración de F<sub>1</sub>-PitoP encontrada en vinos y los efectos beneficiosos que se le otorgan a los FitoPs, pueden ser un factor importante en los efectos beneficiosos de la Dieta Mediterránea, debido al consumo de vino generalizado y los posibles efectos antiinflamatorios que se les atribuyen a los FitoPs. Sin embargo, son necesarios más estudios para comprender el rol biológico de los FitoPs en general y el de los F<sub>1</sub>-FitoP en particular, además de su relación con distintas enfermedades y su influencia en el desarrollo de enfermedades coronarias.

Por lo tanto, este último capítulo de la presente Tesis Doctoral sirve de apertura de una nueva línea de investigación sobre los efectos biológicos de estos nuevos compuestos en el vino y mosto, amén de su relación con otros compuestos eicosanoides detectados en humanos como son los isoprostanos, las prostaglandinas y los tromboxanos así como con los neuroprostanos y F<sub>2</sub>-dihomo-isoprostanos.



## **CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES GENERALES**





Los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente estudio dieron lugar a las siguientes conclusiones generales:

1. Tanto la melatonina como el hidroxitirosol están presentes en altas cantidades en vinos tintos, pero no se encuentran en mostos, por lo que su formación se debe principalmente al proceso de vinificación. Además del proceso de vinificación, el proceso de crianza también modifica el contenido de melatonina e hidroxitirosol, disminuyendo el contenido del primero y aumentando el del segundo. Tanto los mostos como los vinos tintos poseen otros dos compuestos bioactivos, el ácido homovanílico se encuentra mayoritariamente en vinos tintos mientras que el alcohol homovanílico es el principal compuesto bioactivo presente en los mostos. Finalmente, los diferentes polifenoles se encuentran en una cantidad reducida, siendo más relevante el contenido total de compuestos fenólicos, que la diferenciación individual de cada uno. Al igual que la melatonina, éstos aumentan con la vinificación y disminuyen con la crianza de los vinos estabilizados.

2. La ingesta de vino tinto reduce el estrés oxidativo del organismo, medido por la excreción de isoprostanos en orina, en mayor medida que la ingesta de mosto y etanol. Este descenso se debe principalmente al contenido en hidroxitirosol. Asimismo, la ingesta de vino tinto ejerce un efecto cardioprotector al reducir la excreción urinaria de las prostaglandinas pro-inflamatorias (2,3-dinor-11- $\beta$ -PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , U-44619 y U-44069) y aumentar la de prostaglandinas vasodilatadoras (PGE<sub>1</sub>), mediada por su contenido en melatonina e hidroxitirosol.

3. La ingesta de vino tinto reduce el estrés oxidativo del sistema nervioso central, medido por la excreción de neuroprostanos y F<sub>2</sub>-dihomo-isoprostanos en orina, en mayor medida que la ingesta de mosto y etanol. El contenido en melatonina parece ser el responsable de la disminución en la formación de F<sub>2</sub>-dihomo-isoprostanos y su posterior excreción urinaria. De la misma manera, la ingesta de hidroxitirosol es la culpable de la disminución en la excreción urinaria de neuroprostanos.

4. La gran concentración de fitoprostanos observada en los vinos y mostos podría ser un factor importante en los efectos cardioprotectores o cerebrovasculares del vino tinto y la dieta mediterránea debido a sus posibles efectos anti-inflamatorios. Sin embargo, son necesarios más ensayos clínicos con seres humanos y con modelos animales para dilucidar cómo los fitoprostanos podrían mejorar el sistema cardiovascular o ejercer efectos neuroprotectores y, por tanto, su importancia para la salud humana.

5. La ingesta de vino tinto, y mosto en menor medida, reduce el estrés oxidativo y la oncogénesis ligada al daño al DNA gracias a su contenido en ácido homovanílico, medido por la disminución en la concentración plasmática de 8-OH-2'-desoxiguanosina, 8-OH-guanina principalmente. Asimismo la ingesta de vinos parece ejercer efecto vasodilatador mediado por la acción del óxido nítrico, gracias a su contenido en melatonina y ácido homovanílico, y su influencia en el incremento plasmático de cGMP.

## **CAPÍTULO 6. REFERENCIAS**



Abramson JL, Williams SA, Krumholz HM & Vaccarino V. Moderate alcohol consumption and risk of heart failure among older persons. *Journal of the American Medical Association*. 2001; 285(15):1971-7.

Agewall S, Wright S, Doughty RN, Whalley GA, Duxbury M & Sharpe N. Does a glass of red wine improve endothelial function? *European Heart Journal*. 2000; 21(1):74-8.

Akuta T, Zaki MH, Yoshitake J, Okamoto T & Akaike T. Nitrate stress through formation of 8-nitroguanosine: insights into microbial pathogenesis. *Nitric Oxide*. 2006; 14(2):101-8.

Albert CM, Manson JE, Cook NR, Ajani UA, Gaziano JM & Hennekens CH. Moderate alcohol consumption and the risk of sudden cardiac death among US male physicians. *Circulation*. 1999; 100(9):944-50.

Altomare R, Cacciabaudo F, Damiano G, Palumbo VD, Gioviale MC, Bellavia M, Tomasello G & Lo Monte AI. The mediterranean diet: A history of health. *Iranian Journal of Public Health*. 2013; 42(5):449-57.

Andriambeloson E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC & Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *British Journal of Pharmacology*. 1997; 120(6):1053-8.

Artero A, Artero A, Tarín JJ & Cano A. The impact of moderate wine consumption on health. *Maturitas*. 2015; 80(1):3-13.

Asombang AW, Kayamba V, Mwanza-Lisulo M, Colditz G, Mudenda V, Yarasheski K, Chott R, Rubin DC, Gyawali CP, Sinkala E, Mwanamakondo S, Anderson-Spearie C & Kelly P. Gastric cancer in Zambian adults: A prospective case-control study that assessed dietary intake and antioxidant status by using urinary isoprostane excretion. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2013; 97(5):1029-35.

Austin SC & Funk CD. Insight into prostaglandin, leukotriene, and other eicosanoid functions using mice with targeted gene disruptions. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 1999; 58(5-6):231-52.

Avellone G, Di Garbo V, Campisi D, De Simone R, Raneli G, Scaglione R & Licata G. Effects of moderate Sicilian red wine consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2006; 60(1):41-7.

Awad JA, Morrow JD, Takahashi K & Roberts LJ. Identification of non-cyclooxygenase-derived prostanoid (F2-isoprostane) metabolites in human urine and plasma. *Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268(6):4161-9.

Ayala-Peña S. Role of oxidative DNA damage in mitochondrial dysfunction and Huntington's disease pathogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013; 62:102-10.

Badía E, Sacanella E, Fernández-Solá J, Nicolás JM, Antúnez E, Rotilio D, de Gaetano G, Urbano-Márquez A & Estruch R. Decreased tumor necrosis factor-induced adhesion of human monocytes to endothelial cells after moderate alcohol consumption. *The American journal of clinical nutrition*. 2004; 80(1):225-30.

Barden AE, Corcoran TB, Mas E, Durand T, Galano JM, Roberts LJ, Paech M, Muchatuta NA, Phillips M & Mori TA. Is there a role for isofurans and neuroprostanes in pre-eclampsia and normal pregnancy? *Antioxidants and Redox Signaling*. 2012; 16(2):165-9.

Barden AE, Croft KD, Durand T, Guy A, Mueller MJ & Mori TA. Flaxseed oil supplementation increases plasma F1-phytoprostanes in healthy men. *Journal of Nutrition*. 2009; 139(10):1890-5.

Barocas DA, Motley S, Cookson MS, Chang SS, Penson DF, Dai Q, Milne G, Roberts LJ, Morrow J, Concepcion RS, Smith Jr JA & Fowke JH. Oxidative stress measured by urine F2-isoprostane level is associated with prostate cancer. *Journal of Urology*. 2011; 185(6):2102-7.

Basli A, Soulet S, Chaher N, Mérillon JM, Chibane M, Monti JP & Richard T. Wine polyphenols: Potential agents in neuroprotection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012;14.

Basu S. Bioactive eicosanoids: Role of prostaglandin F2 $\alpha$  and F2-isoprostanes in inflammation and oxidative stress related pathology. *Molecules and Cells*. 2010; 30(5):383-91.

Bauer J, Ripperger A, Frantz S, Ergün S, Schwedhelm E & Benndorf RA. Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: Implications of isoprostane-mediated thromboxane A2 receptor activation. *British Journal of Pharmacology*. 2014; 171(13):3115-31.

Bazan NG, Colangelo V & Lukiw WJ. Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 2002; 68-69:197-210.

Bazoti FN, Bergquist J, Markides KE & Tsarbopoulos A. Noncovalent interaction between amyloid- $\beta$ -peptide (1-40) and oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2006; 17(4):568-75.

Beamish RE, Das PK, Karmazyn M & Dhalla NS. Prostaglandins and heart disease. *Canadian Journal of Cardiology*. 1985; 1(1):66-74.

Belfrage P, Berg B, Hagerstrand I, Nilsson-Ehle P, Tornqvist H & Wiebe T. Alterations of lipid metabolism in healthy volunteers during long term ethanol intake. *European Journal of Clinical Investigation*. 1977; 7(2):127-31.

Bertelli AAA & Das DK. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2009; 54(6):468-76.

Boban M & Modun D. Uric acid and antioxidant effects of wine. *Croatian medical journal*. 2010; 51(1):16-22.

Boido E, García-Marino M, Dellacassa E, Carrau F, Rivas-Gonzalo JC & Escribano-Bailón MT. Characterisation and evolution of grape polyphenol

profiles of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat during ripening and vinification. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2011; 17(3):383-93.

Boselli E, Minardi M, Giomo A & Frega NG. Phenolic composition and quality of white d.o.c. wines from Marche (Italy). *Analytica Chimica Acta*. 2006; 563(1-2 SPEC. ISS.):93-100.

Bouayed J, Deußer H, Hoffmann L & Bohn T. Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*. 2012; 131(4):1466-72.

Bouayed J, Hoffmann L & Bohn T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*. 2011; 128(1):14-21.

Brooks JD, Milne GL, Yin H, Sanchez SC, Porter NA & Morrow JD. Formation of highly reactive cyclopentenone isoprostane compounds (A 3/J3-isoprostanes) in vivo from eicosapentaenoic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(18):12043-55.

Brys M, Morel A, Forma E, Krzeslak A, Wilkosz J, Rozanski W & Olas B. Relationship of urinary isoprostanes to prostate cancer occurrence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2013; 372(1-2):149-53.

Cantos E, Espín JC, Fernández MJ, Oliva J & Tomás-Barberán FA. Postharvest UV-C-irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(5):1208-14.

Cantos E, Garcia-Viguera C, De Pascual-Teresa S & Tomas-Barberan FA. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48(10):4606-12.

Catella F, Healy D, Lawson JA & FitzGerald GA. 11-Dehydrothromboxane B2: A quantitative index of thromboxane A2 formation in the human circulation.



Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1986; 83(16):5861-5.

Clarke DL, Belvisi MG, Hardaker E, Newton R & Giembycz MA. E-ring 8-isoprostanes are agonists at EP 2- and EP 4- prostanoid receptors on human airway smooth muscle cells and regulate the release of colony-stimulating factors by activating cAMP-dependent protein kinase. *Molecular Pharmacology*. 2005; 67(2):383-93.

Clarke DL, Giembycz MA, Patel HJ & Belvisi MG. E-Ring 8-isoprostanes inhibit ACh release from parasympathetic nerves innervating guinea-pig trachea through agonism of prostanoid receptors of the EP3-subtype. *British Journal of Pharmacology*. 2004; 141(4):600-9.

Cole RB, Abman S & Aziz KU. Prolonged prostaglandin E1 infusion: Histologic effects on the patent ductus arteriosus. *Pediatrics*. 1981; 67(6):816-9.

Coleman RA, Humphrey PPA, Kennedy I, Levy GP & Lumley P. Comparison of the actions of U-46619, a prostaglandin H2-analogue, with those of prostaglandin H2 and thromboxane A2 on some isolated smooth muscle preparations. *British Journal of Pharmacology*. 1981; 73(3):773-8.

Coleman RA & Sheldrick RLG. Prostanoid-induced contraction of human bronchial smooth muscle is mediated by TP-receptors. *British Journal of Pharmacology*. 1989; 96(3):688-92.

Collado-González J, Medina S, Durand T, Guy A, Galano J-M, Torrecillas A, Ferreres F & Gil-Izquierdo A. New UHPLC-QqQ-MS/MS method for quantitative and qualitative determination of free phytoprostanes in foodstuffs of commercial olive and sunflower oils. *Food Chemistry*. 2015; 178(0):212-20.

Collado-González J, Pérez-López D, Memmi H, Gijón MC, Medina S, Durand T, Guy A, Galano JM, Ferreres F, Torrecillas A & Gil-Izquierdo A. Water Deficit during Pit Hardening Enhances Phytoprostanes Content, a Plant Biomarker of Oxidative Stress, in Extra Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015; 63(14):3784-92.

Collado-González JC, Z.N.; Rodríguez, P.; Galindo, A.; Ferreres, F.; Medina, S.; Romojaro, F.; Egea, I.; Torrecillas, A.; Gil-Izquierdo, A. Effects of water deficit during maturation on amino acids and jujube fruit eating quality. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2014; 33:105-19.

Comporti M, Signorini C, Arezzini B, Vecchio D, Monaco B & Gardi C. F2-isoprostanes are not just markers of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008; 44(3):247-56.

Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Buonocore G, Rossi V & Ciccoli L. Plasma F2-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004; 37(5):724-32.

Cooke MS. Special issue on DNA oxidation: Mechanisms, measurement and consequences. *Free Radical Research*. 2012; 46(4):365-6.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M & Lunec J. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal*. 2003; 17(10):1195-214.

Cornwell DG & Ma J. Nutritional benefit of olive oil: The biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56(19):8774-86.

Crozier A, Jaganath IB & Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural product reports*. 2009; 26(8):1001-43.

Chan PS & Cervoni P. Prostaglandins, prostacyclin, and thromboxane in cardiovascular diseases. *Drug Development Research*. 1986; 7(4):341-59.

Chen J-X, O'Mara PW, Poole SD, Brown N, Ehinger NJ, Slaughter JC, Paria BC, Aschner JL & Reese J. Isoprostanes as physiological mediators of transition to newborn life: novel mechanisms regulating patency of the term and preterm ductus arteriosus. *Pediatr Res*. 2012; 72(2):122-8.

Chen XS & Funk CD. The N-terminal " $\beta$ -barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(1):811-8.

Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S & Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267(1):166-72.

Chrzan J. Alcohol: Social drinking in cultural context; 2013. 1-188.

D'Amico E, Factor-Litvak P, Santella RM & Mitsumoto H. Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013; 65:509-27.

Dai Q, Gao YT, Shu XO, Yang G, Milne G, Cai Q, Wen W, Rothman N, Cai H, Li H, Xiang Y, Chow WH & Zheng W. Oxidative stress, obesity, and breast cancer risk: Results from the Shanghai women's health study. *Journal of Clinical Oncology*. 2009; 27(15):2482-8.

Damianaki A, Bakogeorgou E, Kampa M, Notas G, Hatzoglou A, Panagiotou S, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin PM & Castanas E. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2000; 78(3):429-41.

De Felice C, Signorini C, Durand T, Oger C, Guy A, Bultel-Poncé V, Galano JM, Ciccoli L, Leoncini S, D'Esposito M, Filosa S, Pecorelli A, Valacchi G & Hayek J. F2-dihomo-isoprostanes as potential early biomarkers of lipid oxidative damage in Rett syndrome. *Journal of Lipid Research*. 2011; 52(12):2287-97.

De Gaetano G, Di Castelnuovo A, Donati MB & Iacoviello L. The Mediterranean lecture: Wine and thrombosis - From epidemiology to physiology and back. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2003; 33(5-6):466-71.

De la Puerta C, Carrascosa-Salmoral MP, García-Luna PP, Lardone PJ, Herrera JL, Fernández-Montesinos R, Guerrero JM & Pozo D. Melatonin is a phytochemical in olive oil. *Food Chemistry*. 2007; 104(2):609-12.

De La Torre R, Covas MI, Pujadas MA, Fitó M & Farré M. Is dopamine behind the health benefits of red wine? *European Journal of Nutrition*. 2006; 45(5):307-10.

Deiana M, Incani A, Rosa A, Corona G, Atzeri A, Loru D, Paola Melis M & Assunta Dessì M. Protective effect of hydroxytyrosol and its metabolite homovanillic alcohol on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced lipid peroxidation in renal tubular epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46(9):2984-90.

Delaney S, Jarem DA, Volle CB & Yennie CJ. Chemical and biological consequences of oxidatively damaged guanine in DNA. *Free Radical Research*. 2012; 46(4):420-41.

Dell'Agli M, Buscialà A & Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research*. 2004; 63(4):593-602.

Demers LM. Prostaglandins in human disease. *Clinics in Laboratory Medicine*. 1984; 4(4):787-801.

Di Tommaso D, Calabrese R & Rotilio D. Identification and quantitation of hydroxytyrosol in Italian wines. *HRC Journal of High Resolution Chromatography*. 1998; 21(10):549-53.

Di WL, Kadva A, Johnston A & Silman R. Variable bioavailability of oral melatonin. *New England Journal of Medicine*. 1997; 336(14):1028-9.

Diago MP, Ayestarán B, Guadalupe Z, Garrido Á & Tardaguila J. Phenolic composition of Tempranillo wines following early defoliation of the vines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012; 92(4):925-34.

Dilis V, Katsoulis M, Lagiou P, Trichopoulos D, Naska A & Trichopoulou A. Mediterranean diet and CHD: The Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *British Journal of Nutrition*. 2012; 108(4):699-709.

Dizdaroglu M & Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*. 2012; 46(4):382-419.

Djoussé L, Himali JJ, Beiser A, Kelly-Hayes M & Wolf PA. Apolipoprotein E, Alcohol Consumption, and Risk of Ischemic Stroke: The Framingham Heart Study Revisited. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2009; 18(5):384-8.

Domínguez-Perles R A, D, Ferreres F, Gil-Izquierdo A Gender Differences on Plasma and Urine metabolites from Sprague-dawley Rats after Oral Administration of Normal and High Dose of Hydroxytyrosol, Hydroxytyrosol Acetate, and DOPAC. *European Journal of Nutrition*. 2015:1-10.

Dudley JI, Lekli I, Mukherjee S, Das M, Bertelli AAA & Das DK. Does white wine qualify for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: Resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56(20):9362-73.

Durand T, Bultel-Poncé V, Guy A, Berger S, Mueller MJ & Galano JM. New bioactive oxylipins formed by non-enzymatic free-radical-catalyzed pathways: The phytoprostanes. *Lipids*. 2009; 44(10):875-88.

Durand T, Bultel-Poncé V, Guy A, El Fangour S, Rossi JC & Galano JM. Isoprostanes and phytoprostanes: Bioactive lipids. *Biochimie*. 2011; 93(1):52-60.

Durand T, De Felice C, Signorini C, Oger C, Bultel-Poncé V, Guy A, Galano JM, Leoncini S, Ciccoli L, Pecorelli A, Valacchi G & Hayek J. F2-Dihomo-isoprostanes and brain white matter damage in stage 1 Rett syndrome. *Biochimie*. 2013; 95(1):86-90.

Elmhurst JL, Betti PA & Rangachari PK. Intestinal effects of isoprostanes: Evidence for the involvement of prostanoid EP and TP receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1997; 282(3):1198-205.

Epplein M, Franke AA, Cooney RV, Morris JS, Wilkens LR, Goodman MT, Murphy SP, Henderson BE, Kolonel LN & Le Marchand L. Association of plasma micronutrient levels and urinary isoprostane with risk of lung cancer: The multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2009; 18(7):1962-70.

Estruch R, Sacanella E, Badia E, Antúnez E, Nicolás JM, Fernández-Solá J, Rotilio D, De Gaetano G, Rubin E & Urbano-Márquez A. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: A

prospective randomized crossover trial: Effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis*. 2004; 175(1):117-23.

Evans JH, Spencer DM, Zweifach A & Leslie CC. Intracellular Calcium Signals Regulating Cytosolic Phospholipase A 2 Translocation to Internal Membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(32):30150-60.

Farooqui T & Farooqui AA. Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinson's Disease*. 2011.

Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B & Cantos-Villar E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*. 2012; 130(4):797-813.

Fernández-Pachón MS, Medina S, Herrero-Martín G, Cerrillo I, Berná G, Escudero-López B, Ferreres F, Martín F, García-Parrilla MC & Gil-Izquierdo A. Alcoholic fermentation induces melatonin synthesis in orange juice. *Journal of Pineal Research*. 2014; 56(1):31-8.

Fessel JP, Hulette C, Powell S, Roberts LJ & Zhang J. Isofurans, but not F2-isoprostanes, are increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease and with dementia with Lewy body disease. *Journal of Neurochemistry*. 2003; 85(3):645-50.

Flanzy C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Mundi Prensa Libros SA; 2000.

Fourtillan JB, Brisson AM, Gobin P, Ingrand I, Decourt JP & Girault J. Bioavailability of melatonin in humans after day-time administration of D7 melatonin. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*. 2000; 21(1):15-22.

Frankel EN, Waterhouse AL & Teissedre PL. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995; 43(4):890-4.

Freedman JE, Parker Iii C, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, Deak LR, Iafrati MD & Folts JD. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*. 2001; 103(23):2792-8.

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001; 294(5548):1871-5.

García-Falcón M, Pérez-Lamela C, Martínez-Carballo E & Simal-Gándara J. Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry*. 2007; 105(1):248-59.

Gaziano JM, Buring JE, Breslow JL, Goldhaber SZ, Rosner B, VanDenburgh M, Willett W & Hennekens CH. Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*. 1993; 329(25):1829-34.

Ghiselli A, Nardini M, Baldi A & Scaccini C. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998; 46(2):359-67.

Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Gatenby P, Gerbi V, Janssens J, Johnston B, Kas K, La Vecchia C, Mainguet P, Morazzoni P, Negri E, Pelucchi C, Pezzotti M & Rondanelli M. Cancer prevention in Europe: The Mediterranean diet as a protective choice. *European Journal of Cancer Prevention*. 2013; 22(1):90-5.

Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ & Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature Medicine*. 1999; 5(6):698-701.

Gilles S, Mariani V, Bryce M, Mueller MJ, Ring J, Jakob T, Pastore S, Behrendt H & Traidl-Hoffmann C. Pollen-driven E1-pytoprostanes signal via PPAR- $\gamma$  and NF- $\kappa$ B-dependent mechanisms. *Journal of Immunology*. 2009; 182(11):6653-8.

Gómez-Serranillos MP, Martín S, Ortega T, Palomino OM, Prodanov M, Vacas V, Hernández T, Estrella I & Carretero ME. Study of red wine

neuroprotection on astrocytes. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2009; 64(4):238-43.

Gong M, Wilson M, Kelly T, Su W, Dressman J, Kincer J, Matveev SV, Guo L, Guerin T, Li XA, Zhu W, Uittenbogaard A & Smart EJ. HDL-associated estradiol stimulates endothelial NO synthase and vasodilation in an SR-BI-dependent manner. *Journal of Clinical Investigation*. 2003; 111(10):1579-87.

González-Correa JA, Navas MD, Lopez-Villodres JA, Trujillo M, Espartero JL & De La Cruz JP. Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Neuroscience Letters*. 2008; 446(2-3):143-6.

Goya L, Mateos R & Bravo L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells: Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *European Journal of Nutrition*. 2007; 46(2):70-8.

Greco A, Minghetti L & Levi G. Isoprostanes, Novel Markers of Oxidative Injury, Help Understanding the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Neurochemical Research*. 2000; 25(9-10):1357-64.

Green RH & Pavord ID. Leukotriene antagonists and symptom control in chronic persistent asthma. *Lancet*. 2001; 357(9273):1991-2.

Greenfield JR, Samaras K, Hayward CS, Chisholm DJ & Campbell LV. Beneficial postprandial effect of a small amount of alcohol on diabetes and cardiovascular risk factors: Modification by insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005; 90(2):661-72.

Greenhough A, Smartt HJM, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C & Kaidi A. The COX-2/PGE2 pathway: Key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*. 2009; 30(3):377-86.

Gris EF, Mattivi F, Ferreira EA, Vrhovsek U, Pedrosa RC & Bordignon-Luiz MT. Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitis vinifera* red wines. *Food Chemistry*. 2011; 126(1):213-20.



Guenther AL, Schmidt SI, Laatsch H, Fotso S, Ness H, Ressmeyer AR, Poeggeler B & Hardeland R. Reactions of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: Formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *Journal of Pineal Research*. 2005; 39(3):251-60.

Guerrero RF, García-Parrilla MC, Puertas B & Cantos-Villar E. Wine, resveratrol and health: A review. *Natural Product Communications*. 2009; 4(5):635-58.

Guerrero RF, Liazid A, Palma M, Puertas B, González-Barrio R, Gil-Izquierdo A, García-Barroso C & Cantos-Villar E. Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*. 2009; 112(4):949-55.

Gutermuth J, Bewersdorff M, Traidl-Hoffmann C, Ring J, Mueller MJ, Behrendt H & Jakob T. Immunomodulatory effects of aqueous birch pollen extracts and phytoprostanes on primary immune responses in vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007; 120(2):293-9.

Gutteridge JMC & Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*. 1990; 15(4):129-35.

Halliwell B GJ. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. ed. Oxford: Oxford university press; 2007.

Hamberg M, Svensson J, Wakabayashi T & Samuelsson B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974; 71(2):345-9.

Hammarberg T, Provost P, Persson B & Rådmark O. The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(49):38787-93.

Hannuksela ML, Rantala M, Kesäniemi YA & Savolainen MJ. Ethanol-induced redistribution of cholesteryl ester transfer protein (CETP) between

lipoproteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1996; 16(2):213-21.

Hardeland R & Pandi-Perumal SR. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutrition and Metabolism*. 2005; 2(1):22.

Hardeland R, Pandi-Perumal SR & Cardinali DP. Melatonin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2006; 38(3):313-6.

Havas SH, J.; Reynolds, K.; Baranowski, T.; Nicklas, T. A.; Bishop, D.; Buller, D.; Sorensen, G.; Beresford, S. A. A.; Cowan, A.; Damron, D. 5 a day for better health: A new research initiative. *Journal of the American Dietetic Association*. 1994; 94:4.

Hellsten Y, Nyberg M, Jensen LG & Mortensen SP. Vasodilator interactions in skeletal muscle blood flow regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2012; 590(24):6297-305.

Herraiz T & Galisteo J. Endogenous and dietary indoles: A class of antioxidants and radical scavengers in the ABTS assay. *Free Radical Research*. 2004; 38(3):323-31.

Hoffmeister H, Schelp FP, Mensink GBM, Dietz E & Böhning D. The relationship between alcohol consumption, health indicators and mortality in the German population. *International Journal of Epidemiology*. 1999; 28(6):1066-72.

Honda H, Fukawa K & Sawabe T. Influence of adjuvant arthritis on main urinary metabolites of prostaglandin F and E in rats. *Prostaglandins*. 1980; 19(2):259-69.

Ihara H, Sawa T, Nakabeppu Y & Akaike T. Nucleotides function as endogenous chemical sensors for oxidative stress signaling. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2011; 48(1):33-9.

Imbusch R & Mueller MJ. Formation of isoprostane F2-like compounds (phytoprostanes F1) from  $\alpha$ -linolenic acid in plants. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000; 28(5):720-6.

Iriti M, Rossoni M, Borgo M & Faoro F. Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52(14):4406-13.

Jackson R. *Wine Science*. 3 rd ed. Burlington, MA, USA; 2008.

Janssen LJ & Tazzeo T. Involvement of TP and EP3 receptors in vasoconstrictor responses to isoprostanes in pulmonary vasculature. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002; 301(3):1060-6.

Joy AP & Cowley EA. 8-iso-PGE2 Stimulates Anion Efflux from Airway Epithelial Cells via the EP4 Prostanoid Receptor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2008; 38(2):143-52.

Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, Nyska A, Wachsman JT, Ames BN, Basu S, Brot N, FitzGerald GA, Floyd RA, George M, Heinecke JW, Hatch GE, Hensley K, Lawson JA, Marnett LJ, Morrow JD, Murray DM, Plastaras J, Roberts LJ, Rokach J, Shigenaga MK, Sohal RS, Sun J, Tice RR, Van Thiel DH, Wellner D, Walter PB, Tomer KB, Mason RP & Barrett JC. Biomarkers of Oxidative Stress Study II: Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl4 poisoning? *Free Radical Biology and Medicine*. 2005; 38(6):698-710.

Kampa M, Hatzoglou A, Notas G, Damianaki A, Bakogeorgou E, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin P-M & Castanas E. Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutrition and cancer*. 2000; 37(2):223-33.

Kaneko K, Akuta T, Sawa T, Kim HW, Fujii S, Okamoto T, Nakayama H, Ohigashi H, Murakami A & Akaike T. Mutagenicity of 8-nitroguanosine, a

product of nitrative nucleoside modification by reactive nitrogen oxides, in mammalian cells. *Cancer letters*. 2008; 262(2):239-47.

Karbownik M, Lewinski A & Reiter RJ. Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: Comparison with other antioxidants. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2001; 33(8):735-53.

Karg K, Dirsch VM, Vollmar AM, Cracowski JL, Laporte F & Mueller MJ. Biologically active oxidized lipids (phytoprostanes) in the plant diet and parenteral lipid nutrition. *Free Radical Research*. 2007; 41(1):25-37.

Kawashima S. The two faces of endothelial nitric oxide synthase in the pathophysiology of atherosclerosis. *Endothelium: Journal of Endothelial Cell Research*. 2004; 11(2):99-107.

Key TJ, Schatzkin A, Willett WC, Allen NE, Spencer EA & Travis RC. Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutrition*. 2004; 7(1 A):187-200.

Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS & Fidanza F. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *American Journal of Epidemiology*. 1986; 124(6):903-15.

Klatsky AL. Alcohol and hypertension. *Clinica Chimica Acta*. 1996; 246(1-2):91-105.

Klatsky AL. Alcohol, coronary disease, and hypertension. *Annual Review of Medicine* 1996. 149-60.

Klatsky AL, Friedman GD, Armstrong MA & Kipp H. Wine, liquor, beer, and mortality. *American Journal of Epidemiology*. 2003; 158(6):585-95.

Lam PMW, Mistry V, Marczylo TH, Konje JC, Evans MD & Cooke MS. Rapid measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in human biological matrices using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012; 52(10):2057-63.

Langer RD, Criqui MH & Reed DM. Lipoproteins and blood pressure as biological pathways for effect of moderate alcohol consumption on coronary heart disease. *Circulation*. 1992; 85(3):910-5.

Larrauri JA, Sánchez-Moreno C, Rupérez P & Saura-Calixto F. Free radical scavenging capacity in the aging of selected red spanish wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999; 47(4):1603-6.

Laug WE. Ethyl alcohol enhances plasminogen activator secretion by endothelial cells. *Journal of the American Medical Association*. 1983; 250(6):772-6.

Leger St AS, Cochrane AL & Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*. 1979; 1(8124):1017-20.

Leighton F, Miranda-Rottmann S & Urquiaga I. A central role of eNOS in the protective effect of wine against metabolic syndrome. *Cell Biochemistry and Function*. 2006; 24(4):291-8.

Leigton F UI. Los componentes del vino y sus efectos beneficiosos para la salud humana. VII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. 1999.

Leopoldini M, Russo N & Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 2011; 125(2):288-306.

Lepak NM & Serrero G. Inhibition of adipose differentiation by  $9\alpha$ ,  $11\beta$ -prostaglandin  $F2\alpha$ . *Prostaglandins*. 1993; 46(6):511-7.

Lewis RA, Soter NA & Diamond PT. Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *Journal of Immunology*. 1982; 129(4):1627-31.

Li H, Lawson JA, Reilly M, Adiyaman M, Hwang SW, Rokach J & FitzGerald GA. Quantitative high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of the four classes of F2-isoprostanes in human urine.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999; 96(23):13381-6.

Libby P, Warner SJC & Friedman GB. Interleukin 1: A mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. *Journal of Clinical Investigation*. 1988; 81(2):487-98.

Linn S, Carroll M, Johnson C, Fulwood R, Kalsbeek W & Briefel R. High-density lipoprotein cholesterol and alcohol consumption in US White and Black adults: Data from NHANES II. *American Journal of Public Health*. 1993; 83(6):811-6.

Loeffler C, Berger S, Guy A, Durand T, Bringmann G, Dreyer M, Von Rad U, Durner J & Mueller MJ. B1-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiology*. 2005; 137(1):328-40.

Maldonado MD, Moreno H & Calvo JR. Melatonin present in beer contributes to increase the levels of melatonin and antioxidant capacity of the human serum. *Clinical Nutrition*. 2009; 28(2):188-91.

Mariani V, Gilles S, Jakob T, Thiel M, Mueller MJ, Ring J, Behrendt H & Traidl-Hoffmann C. Immunomodulatory mediators from pollen enhance the migratory capacity of dendritic cells and license them for Th2 attraction. *Journal of Immunology*. 2007; 178(12):7623-31.

Marín FZ. *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. AMV Ediciones; 2003.

Martin MA, Ramos S, Granado-Serrano AB, Rodriguez-Ramiro I, Trujillo M, Bravo L & Goya L. Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxifiant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/ protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2010; 54(7):956-66.

Martin S, Andriambelason E, Takeda K & Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: A basis to

elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *British Journal of Pharmacology*. 2002; 135(6):1579-87.

Martinez-Gonzalez MA & Bes-Rastrollo M. Dietary patterns, Mediterranean diet, and cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology*. 2014; 25(1):20-6.

Martinez P. *Salud y placer a través de una copa de vino*. Real academia de medicina y cirugía de Murcia: Murcia; 2010.

Mateos R & Bravo L. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *Journal of Separation Science*. 2007; 30(2):175-91.

Mateos R, Espartero JL, Trujillo M, Ríos JJ, León-Camacho M, Alcudia F & Cert A. Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49(5):2185-92.

Medina S, De Miguel-Elizaga I, Oger C, Galano J-M, Durand T, Martínez-Villanueva M, Gil-Del Castillo ML, Villegas-Martínez I, Ferreres F, Martínez-Hernández P & Gil-Izquierdo Á. Dihomo-isoprostanes –non-enzymatic metabolites of AdA- are higher in epileptic patients compared to healthy individuals by a new UHPLC-QqQ-MS/MS method. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015; 79:154-63.

Medina S, Domínguez-Perles R, Cejuela-Anta R, Villaño D, Martínez-Sanz JM, Gil P, García-Viguera C, Ferreres F, Gil JI & Gil-Izquierdo A. Assessment of oxidative stress markers and prostaglandins after chronic training of triathletes. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 2012; 99(3-4):79-86.

Medina S, Domínguez-Perles R, Gil JI, Ferreres F, García-Viguera C, Martínez-Sanz JM & Gil-Izquierdo A. A ultra-pressure liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry method for the analysis of 13 eicosanoids in human urine and quantitative 24 hour values in

healthy volunteers in a controlled constant diet. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2012; 26(10):1249-57.

Melo A, Monteiro L, Lima RMF, De Oliveira DM, De Cerqueira MD & El-Bachá RS. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2011.

Mena P, Gil-Izquierdo Á, Moreno DA, Martí N & García-Viguera C. Assessment of the melatonin production in pomegranate wines. *LWT - Food Science and Technology*. 2012; 47(1):13-8.

Mercolini L, Saracino MA, Bugamelli F, Ferranti A, Malaguti M, Hrelia S & Raggi MA. HPLC-F analysis of melatonin and resveratrol isomers in wine using an SPE procedure. *Journal of Separation Science*. 2008; 31(6-7):1007-14.

Milatovic D & Aschner M. Measurement of isoprostanes as markers of oxidative stress in neuronal tissue. *Current Protocols in Toxicology*. 2009; (SUPPL. 39):12.4.1-4.

Milne GL, Dai Q & Roberts LJ. The isoprostanes—25 years later. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014; (0).

Miller E, Mrowicka M, Saluk-Juszczak J & Ireneusz M. The level of isoprostanes as a non-invasive marker for in vivo lipid peroxidation in secondary progressive multiple sclerosis. *Neurochemical Research*. 2011; 36(6):1012-6.

Miller SB. Prostaglandins in Health and Disease: An Overview. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2006; 36(1):37-49.

Mineo C, Deguchi H, Griffin JH & Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circulation Research*. 2006; 98(11):1352-64.

Minghetti L, Salvi R, Lavinia Salvatori M, Antonietta Ajmone-Cat M, De Nuccio C, Visentin S, Bultel-Poncé V, Oger C, Guy A, Galano JM, Greco A, Bernardo A & Durand T. Nonenzymatic oxygenated metabolites of  $\alpha$ -linolenic acid B 1- and L1-phytoprostanes protect immature neurons from oxidant injury



and promote differentiation of oligodendrocyte progenitors through PPAR- $\gamma$  activation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 73:41-50.

Minuti L, Pellegrino RM & Tesei I. Simple extraction method and gas chromatography-mass spectrometry in the selective ion monitoring mode for the determination of phenols in wine. *Journal of Chromatography A*. 2006; 1114(2):263-8.

Miro-Casas E, Covas MI, Farre M, Fito M, Ortuño J, Weinbrenner T, Roset P & De La Torre R. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clinical Chemistry*. 2003; 49(6):945-52.

Montine TJ, Beal MF, Robertson D, Cudkowicz ME, Biaggioni I, O'Donnell H, Zackert WE, Roberts LJ & Morrow JD. Cerebrospinal fluid F2-isoprostanes are elevated in Huntington's disease. *Neurology*. 1999; 52(5):1104-5.

Montine TJ, Markesbery WR, Morrow JD & Roberts Ii LJ. Cerebrospinal fluid F2-isoprostane levels are increased in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. 1998; 44(3):410-3.

Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S & Tominaga M. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Molecular Pain*. 2005; 1.

Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA & Roberts Ii LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89(22):10721-5.

Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF & Roberts Ii LJ. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990; 87(23):9383-7.

Morrow JD, Minton TA, Mukundan CR, Campbell MD, Zackert WE, Daniel VC, Badr KF, Blair IA & Roberts Ii LJ. Free radical-induced generation of

isoprostanes in vivo: evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes; 1994.

Morrow JD, Zackert WE, Yang JP, Kurhts EH, Callewaert D, Dworski R, Kanai K, Taber D, Moore K, Oates JA & Roberts LJ. Quantification of the major urinary metabolite of 15-F(2T)-isoprostane (8-iso-PGF(2 $\alpha$ )) by a stable isotope dilution mass spectrometric assay. *Analytical Biochemistry*. 1999; 269(2):326-31.

Muñoz I, Apeleo E, de la Fuente J, Pérez-Santaescolástica C, Rivas-Cañedo A, Pérez C, Díaz MT, Cañeque V & Lauzurica S. Effect of dietary supplementation with red wine extract or vitamin E, in combination with linseed and fish oil, on lamb meat quality. *Meat Science*. 2014; 98(2):116-23.

Mukamal KJ, Jensen MK, Grønbæk M, Stampfer MJ, Manson JE, Pischon T & Rimm EB. Drinking frequency, mediating biomarkers, and risk of myocardial infarction in women and men. *Circulation*. 2005; 112(10):1406-13.

Mukamal KJ, Mackey RH, Kuller LH, Tracy RP, Kronmal RA, Mittleman MA & Siscovick DS. Alcohol consumption and lipoprotein subclasses in older adults. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007; 92(7):2559-66.

Mulero J, Pardo F & Zafrilla P. Antioxidant activity and phenolic compounds in conventional and organic red grapes (var. Monastrell). *CYTA - Journal of Food*. 2010; 8(3):185-91.

Mulero J, Zafrilla P, Cayuela JM, Martínez-Cachá A & Pardo F. Antioxidant activity and phenolic compounds in organic red wine using different winemaking techniques. *Journal of Food Science*. 2011; 76(3):436-40.

Murtaza G, Latif U, Najam-Ul-Haq M, Sajjad A, Karim S, Akhtar M & Hussain I. Resveratrol: An active natural compound in red wines for health. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2013; 21(1):1-12+127.

Mushtaq M & Wani SM. Polyphenols and human health- A review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2013; 4(2):338-60.

Narumiya S & FitzGerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *Journal of Clinical Investigation*. 2001; 108(1):25-30.

Noda M, Kariura Y, Pannasch U, Nishikawa K, Wang L, Seike T, Ifuku M, Kosai Y, Wang B, Nolte C, Aoki S, Kettenmann H & Wada K. Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. *Journal of Neurochemistry*. 2007; 101(2):397-410.

Nogués MR, Giralt M, Romeu M, Mulero M, Sánchez-Martos V, Rodríguez E, Acuña-Castroviejo D & Mallol J. Melatonin reduces oxidative stress in erythrocytes and plasma of senescence-accelerated mice. *Journal of Pineal Research*. 2006; 41(2):142-9.

Nunomura A, Moreira PI, Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Smith MA & Perry G. Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders. *Neurotoxicity Research*. 2012; 22(3):231-48.

OIV. World vitiviniculture situation. 38th World Congress of Vine and Wine; 6th July 2015; Mainz (Germany)2015.

Oliveira CM, Ferreira ACS, De Freitas V & Silva AMS. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*. 2011; 44(5):1115-26.

Oliveras-López MJ, Berná G, Carneiro EM, De La Serrana HLG, Martín F & López MC. An extra-virgin olive oil rich in polyphenolic compounds has antioxidant effects in Of1 mice. *Journal of Nutrition*. 2008; 138(6):1074-8.

Olley PM & Coceani F. Prostaglandins and the ductus arteriosus. *Annual Review of Medicine*. 1981; 32:375-85.

Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Bitzer-Quintero OK, Ramírez-Anguiano AC, Flores-Alvarado LJ, Ramírez-Ramírez V, Macias-Islas MA & Torres-Sánchez ED. Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: Clinical and basic approach. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2014; 34:34-42.

Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G & Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation

and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta*. 1995; 235(2):207-19.

Pace-Asciak CR, Rounova O, Hahn SE, Diamandis EP & Goldberg DM. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clinica Chimica Acta*. 1996; 246(1-2):163-82.

Palomar JC. El roble, la barrica y la crianza del vino tinto. *Cuadernos de Aragón*. 2009; 41.

Paredes C, Tazzeo T & Janssen LJ. E-Ring Isoprostane Augments Cholinergic Neurotransmission in Bovine Trachealis via FP Prostanoid Receptors. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2007; 37(6):739-47.

Pearson TA. Alcohol and heart disease. *Circulation*. 1996; 94(11):3023-5.

Pearson TA. Alcohol and heart disease. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1997; 65(5):1567-9.

Pellegrini N, Pareti FI, Stabile F, Brusamolino A & Simonetti P. Effects of moderate consumption of red wine on platelet aggregation and haemostatic variables in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*. 1996; 50(4):209-13.

Pérez-Mañá C, Farré M, Rodríguez-Morató J, Papaseit E, Pujadas M, Fitó M, Robledo P, Covas MI, Cheynier V, Meudec E, Escudier JL & de la Torre R. Moderate consumption of wine, through both its phenolic compounds and alcohol content, promotes hydroxytyrosol endogenous generation in humans. A randomized controlled trial. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2015; 59((6)):1213-6.

Peters-Golden M & Brock TG. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: Unexpected nuclear secrets. *FEBS Letters*. 2001; 487(3):323-6.

Pignatelli P, Ghiselli A, Buchetti B, Carnevale R, Natella F, Germanò G, Fimognari F, Di Santo S, Lenti L & Violi F. Polyphenols synergistically inhibit

oxidative stress in subjects given red and white wine. *Atherosclerosis*. 2006; 188(1):77-83.

Polette A, Lemaitre D, Lagarde M & Véricel E. N-3 fatty acid-induced lipid peroxidation in human platelets is prevented by catechins. *Thrombosis and Haemostasis*. 1996; 75(6):945-9.

Pollock WK, Armstrong RA, Brydon LJ, Jones RL & MacIntyre DE. Thromboxane-induced phosphatidate formation in human platelets. Relationship to receptor occupancy and to changes in cytosolic free calcium. *Biochemical Journal*. 1984; 219(3):833-42.

Praticò D, Clark CM, Lee VMY, Trojanowski JQ, Rokach J & Fitzgerald GA. Increased 8,12-iso-iPF(2 $\alpha$ )-VI in Alzheimer's disease: Correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Annals of Neurology*. 2000; 48(5):809-12.

Proestos C, Bakogiannis A, Psarianos C, Koutinas AA, Kanellaki M & Komaitis M. High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines. *Food Control*. 2005; 16(4):319-23.

Rabbani KJ, Tauqeer F & Rabbani R. ProstaglandinE1 for the medical management of erectile dysfunction. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences*. 2010; 4(4).

Rall JM, Mach SA & Dash PK. Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats. *Brain Research*. 2003; 968(2):273-6.

Rayo Llerena I & Marín Huerta E. Wine and the heart. *Revista Espanola de Cardiologia*. 1998; 51(6):435-49.

Reich EE, Markesbery WR, Roberts Li LJ, Swift LL, Morrow JD & Montine TJ. Brain regional quantification of F-ring and D-/E-ring isoprostanes and neuroprostanes in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*. 2001; 158(1):293-7.

Reiter RJ. Melatonin: Clinical relevance. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2003; 17(2):273-85.

Reiter RJ, Tan DX & Maldonado MD. Melatonin as an antioxidant: Physiology versus pharmacology. *Journal of Pineal Research*. 2005; 39(2):215-6.

Renaud S & De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992; 339(8808):1523-6.

Renaud SC, Beswick AD, Fehily AM, Sharp DS & Elwood PC. Alcohol and platelet aggregation: The Caerphilly Prospective Heart Disease Study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1992; 55(5):1012-7.

Renaud SC & Ruf JC. Effects of alcohol on platelet functions. *Clinica Chimica Acta*. 1996; 246(1-2):77-89.

Ricciotti E & Fitzgerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011; 31(5):986-1000.

Ridker PM, Vaughan DE, Stampfer MJ, Glynn RJ & Hennekens CH. Association of moderate alcohol consumption and plasma concentration of endogenous tissue-type plasminogen activator. *Journal of the American Medical Association*. 1994; 272(12):929-33.

Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M & Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: Meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *British Medical Journal*. 1999; 319(7224):1523-8.

Roberts Ii LJ, Fessel JP & Davies SS. The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran pathways of lipid peroxidation. *Brain Pathology*. 2005; 15(2):143-8.

Roberts Ii LJ & Milne GL. Isoprostanes. *Journal of Lipid Research*. 2009; 50:219-23.

Rodríguez-Naranjo MI, Gil-Izquierdo A, Troncoso AM, Cantos-Villar E & Garcia-Parrilla MC. Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. *Food Chemistry*. 2011; 126(4):1608-13.

Rodríguez-Naranjo MI, Gil-Izquierdo A, Troncoso AM, Cantos E & Garcia-Parrilla MC. Melatonin: A new bioactive compound in wine. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011; 24(4):603-8.

Rossner Jr P, Gammon MD, Terry MB, Agrawal M, Fang FZ, Teitelbaum SL, Eng SM, Gaudet MM, Neugut AI & Santella RM. Relationship between urinary 15-F2t-isoprostane and 8-oxodeoxyguanosine levels and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2006; 15(4):639-44.

Rotondo S, Rajtar G, Manarini S, Celardo A, Rotilio D, De Gaetano G, Evangelista V & Cerletti C. Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *British Journal of Pharmacology*. 1998; 123(8):1691-9.

Salazar C, Armenta JM, Cortés DF & Shulaev V. Combination of an AccQ•Tag-Ultra performance liquid chromatographic method with tandem mass spectrometry for the analysis of amino acids. 2012.

Sales KJ & Jabbour HN. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium. *Reproduction*. 2003; 126(5):559-67.

Sametz W, Hennerbichler S, Glaser S, Wintersteiger R & Juan H. Characterization of prostanoid receptors mediating actions of the isoprostanes, 8-iso-PGE<sub>2</sub> and 8-iso-PGF<sub>2</sub>α, in some isolated smooth muscle preparations. *British Journal of Pharmacology*. 2000; 130(8):1903-10.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C & Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005; 45(4):287-306.

Schaefer M & Hardeland R. The melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine is a potent singlet oxygen scavenger. *Journal of Pineal Research*. 2009; 46(1):49-52.

Schaffer S & Halliwell B. Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. *Genes & nutrition*. 2012; 7(2):99-109.

Scheer FAJL, Van Montfrans GA, Van Someren EJW, Mairuhu G & Buijs RM. Daily Nighttime Melatonin Reduces Blood Pressure in Male Patients with Essential Hypertension. *Hypertension*. 2004; 43(2 I):192-7.

Schnohr P, Jensen JS, Scharling H & Nordestgaard BG. Coronary heart disease risk factors ranked by importance for the individual and community: A 21 year follow-up of 12 000 men and women from the Copenhagen City Heart Study. *European Heart Journal*. 2002; 23(8):620-6.

Schrieks IC, van den Berg R, Sierksma A, Beulens JWJ, Vaes WHJ & Hendriks NFJ. Effect of red wine consumption on biomarkers of oxidative stress. *Alcohol and Alcoholism*. 2013; 48(2):153-9.

Schröder H, De La Torre R, Estruch R, Corella D, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Ros E, Arós F, Flores G, Civit E, Farré M, Fiol M, Vila J, Fernandez-Crehuet J, Ruiz-Gutiérrez V, Lapetra J, Sáez G & Covas MI. Alcohol consumption is associated with high concentrations of urinary hydroxytyrosol. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2009; 90(5):1329-35.

Seet RCS, Lee CYJ, Lim ECH, Tan JJH, Quek AML, Chong WL, Looi WF, Huang SH, Wang H, Chan YH & Halliwell B. Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010; 48(4):560-6.

Serdyuk AP, Metelskaya VA, Ozerova IN, Kovaltchouk NV, Olfieriev AM, Bubnova MG, Perova NV, Jauhiainen M, Lasselin C & Castro G. Effects of Alcohol on the Major Steps of Reverse Cholesterol Transport. *Biochemistry (Moscow)*. 2000; 65(11):1310-5.

Seto V, Hirota C, Hirota S & Janssen LJ. E-Ring Isoprostanes Stimulate a Cl<sup>-</sup> Conductance in Airway Epithelium via Prostaglandin E2-Selective Prostanoid



Receptors. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2008; 38(1):88-94.

Singh B, Parsaik AK, Mielke MM, Erwin PJ, Knopman DS, Petersen RC & Roberts RO. Association of Mediterranean diet with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2014; 39(2):271-82.

Six DA & Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: Classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2000; 1488(1-2):1-19.

Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochemical Journal*. 1989; 259(2):315-24.

Smith WL, DeWitt DL & Garavito RM. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*. 2000. 145-82.

Smith WL, Urade Y & Jakobsson PJ. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chemical Reviews*. 2011; 111(10):5821-65.

Smoliga JM, Baur JA & Hausenblas HA. Resveratrol and health - A comprehensive review of human clinical trials. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2011; 55(8):1129-41.

Sofi F, Macchi C, Abbate R, Gensini GF & Casini A. Mediterranean diet and health. *BioFactors*. 2013; 39(4):335-42.

Soleas GJ, Diamandis EP & Goldberg DM. Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 1997; 11(5):287-313.

Spector D, Zusman RM, Caldwell BV & Speroff L. The distribution of prostaglandins A, E, and F in the human kidney. *Prostaglandins*. 1974; 6(3):263-70.

Sprenger J, Hardeland R, Fuhrberg B & Han SZ. Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: Presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. *Cytologia*. 1999; 64(2):209-13.

Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Maestroni GJM, Esquifino AI, Hardeland R & Cardinali DP. Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicity Research*. 2005; 7(4):293-318.

Stockley CS. Is there a role for wine in cancer and the degenerative diseases of aging? *International Journal of Wine Research*. 2009; 1(1):195-207.

Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M & Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*. 2004; 500(1-3 SPEC. ISS.):299-313.

Suh I, Shaten BJ, Cutler JA & Kuller LH. Alcohol use and mortality from coronary heart disease: The role of high-density lipoprotein cholesterol. *Annals of Internal Medicine*. 1992; 116(11):881-7.

Sultana R & Butterfield DA. Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010; 19(1):341-53.

Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D & Conte A. In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*. 2010; 120(2):599-606.

Tandon M, Siddique RA, Arvind, Singh NK, Ambwani T & Rai SN. Anti-cancer diet: Reviewing the role of nutrition in cancer prevention. *Current Topics in Nutraceutical Research*. 2008; 6(2):67-82.

Taskinen MR, Nikkilä EA, Välimäki M, Sane T, Kuusi T, Kesäniemi YA & Ylikahri R. Alcohol-induced changes in serum lipoproteins and in their metabolism. *American Heart Journal*. 1987; 113(2 PART 2):458-64.

Teismann P & Ferger B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse*. 2001; 39(2):167-74.

Teissedre PL, Frankel EN, Waterhouse AL, Peleg H & Bruce German J. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1996; 70(1):55-61.

Tesniere C & Flanzy C. Carbonic maceration wines: Characteristics and winemaking process. 2011. 1-15.

Than NN, Heer C, Laatsch H & Hardeland R. Reactions of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) with the ABTS cation radical: Identification of new oxidation products. *Redox Report*. 2006; 11(1):15-24.

Thieden HI. The influence of ethanol on glycerol metabolism in liver slices from fed and fasted rats. *Acta chemica Scandinavica*. 1969; 23(1):237-43.

Thoma I, Krischke M, Loeffler C & Mueller MJ. The isoprostanoid pathway in plants. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2004; 128(1-2):135-48.

Thoma I, Loeffler C, Sinha AK, Gupta M, Krischke M, Steffan B, Roitsch T & Mueller MJ. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant Journal*. 2003; 34(3):363-75.

Thorén S & Jakobsson PJ. Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells: Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *European Journal of Biochemistry*. 2000; 267(21):6428-34.

Toth PP. Adiponectin and high-density lipoprotein: A metabolic association through thick and thin. *European Heart Journal*. 2005; 26(16):1579-81.

Toussaint-Samat M. *A History of Food*; 2009. 1-756.

Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J & Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters*. 1995; 358(1):1-3.

Traidl-Hoffmann C, Mariani V, Hochrein H, Karg K, Wagner H, Ring J, Mueller MJ, Jakob T & Behrendt H. Pollen-associated phytoprostanes inhibit

dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *Journal of Experimental Medicine*. 2005; 201(4):627-35.

Trebino CE, Stock JL, Gibbons CP, Naiman BM, Wachtmann TS, Umland JP, Pandher K, Lapointe JM, Saha S, Roach ML, Carter D, Thomas NA, Durtschi BA, McNeish JD, Hambor JE, Jakobsson PJ, Carty TJ, Perez JR & Audoly LP. Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100(15):9044-9.

Triantaphylidès C, Krischke M, Hoerberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F & Mueller MJ. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiology*. 2008; 148(2):960-8.

Urade Y, Ujihara M, Horiguchi Y, Ikai K & Hayaishi O. The major source of endogenous prostaglandin D2 production is likely antigen-presenting cells. Localization of glutathione-requiring prostaglandin D synthetase in histiocytes, dendritic, and Kupffer cells in various rat tissues. *Journal of Immunology*. 1989; 143(9):2982-9.

Urquiaga I, Strobel P, Perez D, Martinez C, Cuevas A, Castillo O, Marshall G, Rozowski J & Leighton F. Mediterranean diet and red wine protect against oxidative damage in young volunteers. *Atherosclerosis*. 2010; 211(2):694-9.

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K & Loridas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *International journal of environmental research and public health*. 2013; 10(9):3886-907.

Van Der Sterren S, Kessels L, Perez-Vizcaino F, Cogolludo AL & Villamor E. Prenatal exposure to hyperoxiamodifies the thromboxane prostanoid receptor-mediated response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the ductus arteriosus of the chicken embryo. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2014; 65(2):283-93.

van der Sterren S & Villamor E. Contractile effects of 15-E2t-isoprostane and 15-F2t-isoprostane on chicken embryo ductus arteriosus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2011; 159(4):436-44.

Vanrollins M, Woltjer RL, Yin H, Morrow JD & Montine TJ. F 2-Dihomo-isoprostanes arise from free radical attack on adrenic acid. *Journal of Lipid Research*. 2008; 49(5):995-1005.

Veenstra J. Moderate alcohol use and coronary heart disease: a U-shaped curve? *World review of nutrition and dietetics*. 1991; 65:38-71.

Venkov CD, Myers PR, Tanner MA, Su M & Vaughan DE. Ethanol increases endothelial nitric oxide production through modulation of nitric oxide synthase expression. *Thromb Haemost*. 1999; 81(4):638-42.

Vigor C, Bertrand-Michel J, Pinot E, Oger C, Vercauteren J, Le Faouder P, Galano JM, Lee JCY & Durand T. Non-enzymatic lipid oxidation products in biological systems: ASSESSMENT of the metabolites from polyunsaturated fatty acids. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2014; 964:65-78.

Vilaplana-Pérez C, Auñón D, García-Flores LA & Gil-Izquierdo A. Hydroxytyrosol and Potential Uses in Cardiovascular Diseases, Cancer, and AIDS. *Frontiers in Nutrition*. 2014; 1:18.

Villaño D, Vilaplana C, Medina S, Cejuela-Anta R, Martínez-Sanz JM, Gil P, Genieser H-G, Ferreres F & Gil-Izquierdo A. Effect of elite physical exercise by triathletes on seven catabolites of DNA oxidation. *Free Radical Research*. 2015; 49(8):973-83.

Visioli F & Davalos A. Polyphenols and Cardiovascular disease: A critical summary of the evidence. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2011; 11(14):1186-90.

Vitalini S, Gardana C, Simonetti P, Fico G & Iriti M. Melatonin, melatonin isomers and stilbenes in Italian traditional grape products and their antiradical capacity. *Journal of Pineal Research*. 2013; 54(3):322.

Vivas N. *Manual de tonelería*. Mundi Prensa. 2005.

Von Eynatten M, Schneider JG, Humpert PM, Rudofsky G, Schmidt N, Barosch P, Hamann A, Morcos M, Kreuzer J, Bierhaus A, Nawroth PP & Dugi KA. Decreased plasma lipoprotein lipase in hypoadiponectinemia: An association independent of systemic inflammation and insulin resistance. *Diabetes Care*. 2004; 27(12):2925-9.

Waldhauser F, Waldhauser M, Lieberman HR, Deng MH, Lynch HJ & Wurtman RJ. Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinology*. 1984; 39(4):307-13.

Walsh CR, Larson MG, Evans JC, Djousse L, Ellison RC, Vasan RS & Levy D. Alcohol consumption and risk for congestive heart failure in the Framingham Heart Study. *Annals of Internal Medicine*. 2002; 136(3):181-91.

Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K & Förstermann U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002; 106(13):1652-8.

Wallerath T, Li H, Gödtel-Ambrust U, Schwarz PM & Förstermann U. A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. 2005; 12(2):97-104.

Wang Z, Barker TH & Fuller GM. Alcohol at moderate levels decreases fibrinogen expression in vivo and in vitro. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1999; 23(12):1927-32.

Weber TJ & Markillie LM. Regulation of activator protein-1 by 8-iso-prostaglandin E2 in a thromboxane A2 receptor-dependent and -independent manner. *Molecular Pharmacology*. 2003; 63(5):1075-81.

Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E & Trichopoulos D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *The American journal of clinical nutrition*. 1995; 61(6):1402S-6S.

Wollny T, Aiello L, Di Tommaso D, Bellavia V, Rotilio D, Donati MB, De Gaetano G & Iacoviello L. Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: A role for increased nitric oxide production. *British Journal of Pharmacology*. 1999; 127(3):755-62.

Wu HC, Wang Q, Yang HI, Ahsan H, Tsai WY, Wang LY, Chen SY, Chen CJ & Santella RM. Urinary 15-F<sub>2t</sub>-isoprostane, aflatoxin B1 exposure and hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Carcinogenesis*. 2008; 29(5):971-6.

Wu YT, Lin LC & Tsai TH. Measurement of free hydroxytyrosol in microdialysates from blood and brain of anesthetized rats by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 2009; 1216(16):3501-7.

Yan Z, Mas E, Mori TA, Croft KD & Barden AE. A significant proportion of F<sub>2</sub>-isoprostanes in human urine are excreted as glucuronide conjugates. *Analytical Biochemistry*. 2010; 403(1-2):126-8.

Yang B, Kotani A, Arai K & Kusu F. Estimation of the Antioxidant Activities of Flavonoids from Their Oxidation Potentials. *Analytical Sciences*. 2001; 17(5):599-604.

Yin H, Musiek ES, Gao L, Porter NA & Morrow JD. Regiochemistry of neuroprostanes generated from the peroxidation of docosahexaenoic acid in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(28):26600-11.

Zafrilla P, Morillas J, Mulero J, Cayuela JM, Martínez-Cachá A, Pardo F & López Nicolás JM. Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(16):4694-700.

Zhao M, Destache C, Ohia S & Opere C. Role of Prostanoid Production and Receptors in the Regulation of Retinal Endogenous Amino Acid Neurotransmitters by 8-Isoprostaglandin E2, Ex Vivo. *Neurochemical Research*. 2009; 34(12):2170-80.

Zhou W, Blackwell TS, Goleniewska K, O'Neal JF, FitzGerald GA, Lucitt M, Breyer RM & Peebles Jr RS. Prostaglandin I2 analogs inhibit Th1 and Th2 effector cytokine production by CD4 T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007; 81(3):809-17.