

# Efecto del resveratrol sobre el factor de crecimiento transformante $\beta$ sérico en la aterosclerosis

## Effect of resveratrol on serum transforming growth factor- $\beta$ in atherosclerosis

JESSIKA JIMÉNEZ<sup>1\*</sup>, JULIO CÉSAR GONZÁLEZ<sup>1,2\*\*</sup>, LETICIA FIGUEIRA<sup>1\*\*\*</sup>

### Resumen

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) está involucrado en la fisiopatología de la aterosclerosis. El resveratrol es un polifenol que ha mostrado tener propiedades antiaterogénicas gracias a sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes. En el presente estudio se evaluó el efecto del resveratrol sobre los niveles séricos del TGF- $\beta$ , la formación y evolución de la placa de ateroma en conejos machos de la raza Nueva Zelanda sometidos a una dieta enriquecida con colesterol. Para ello 48 conejos fueron divididos en 4 grupos. Grupo 1 (control): Conejarina. Grupo 2: Conejarina suplementada con 0,5% colesterol. Grupo 3 (control resveratrol): Conejarina y resveratrol (2mg/Kg/día). Grupo 4: Conejarina suplementada con 0,5% colesterol y resveratrol, durante 12 semanas. Se realizaron determinaciones de lípidos séricos y del TGF- $\beta$  en la 0, 6ta y 12ma semana de experimentación. La mitad de los conejos fueron sacrificados a la 6ta y el resto a la 12ma semana y se realizó estudio histológico de su aorta. Se encontró un aumento significativo de la concentración de TGF- $\beta$  y del perfil lipídico en los grupos 2 y 4 con respecto a los grupos 1 y 3 desde la 6ta semana de experimentación. En la 6ta y 12ma semana se evidenció una disminución de los niveles de TGF- $\beta$  en el grupo 4 con respecto al grupo 2. El tratamiento con resveratrol disminuyó la formación de ateromas. En conclusión, el TGF- $\beta$  constituye un marcador temprano no invasivo de aterosclerosis. Asimismo, la suplementación oral con resveratrol ejerció efectos antiinflamatorios y antiateroscleróticos.

**Palabras clave:** Factor de crecimiento transformante  $\beta$ , resveratrol, aterosclerosis, inflamación

### Abstract

The transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is involved in atherosclerosis. Resveratrol is a polyphenol and has anti-inflammatory and antiatherogenic actions. We evaluated the effect of resveratrol on serum concentrations of TGF- $\beta$  during the progression and evolution of atherosclerosis in rabbits fed with a cholesterol diet. 48 New Zealand white male rabbits were randomly divided into four groups that received for 12 weeks: Group 1 (control): Standard diet (commercial rabbit food). Group 2: Cholesterol diet (0.5% cholesterol). Group 3 (control resveratrol): Standard diet (commercial rabbit food) and resveratrol (2mg/Kg). Group 4: Cholesterol diet (0.5% cholesterol) and resveratrol (2mg/Kg). Blood samples of overnight-fasted rabbits were collected on basal, sixth, and twelfth weeks, and the concentration of lipid profile and TGF- $\beta$  were determined. Half of the animals were sacrificed on the sixth or twelfth week, and the aorta was dissected for histological studies. Our findings demonstrated that the TGF- $\beta$  levels were significantly higher in Groups 2 and 4 than groups 1 and 3, respectively since the 6th week. Resveratrol treatment reversed the increased levels of TGF- $\beta$  induced by the cholesterol diet since the 6th week. Supplementation of resveratrol diminished the formation of atherosclerotic lesions. These results support that serum TGF- $\beta$  levels are early markers of atherosclerosis. Likewise, oral supplementation of resveratrol may induce anti-atherosclerotic effects depending on its anti-inflammatory properties.

**Keywords:** Transforming growth factor- $\beta$ , resveratrol, atherosclerosis, inflammation

1. Escuela de Bioanálisis, Laboratorio de Investigación y Postgrado de la Escuela de Bioanálisis (LIPEB), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Carabobo – Venezuela. 2. Laboratorio Clínico Julio César González. Carabobo – Venezuela.

Correspondencia: : [figueiraleticia@gmail.com](mailto:figueiraleticia@gmail.com)

ORCID: \*0000-0001-8966-4951; \*\*0000-0003-1980-5848 ; \*\*\*0000-0003-3865-5355

DOI: 10.54305/RFFUCV.2021.84.1-2.6

## Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica, sistémica, de etiología multifactorial y progresiva, que se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima arterial con pérdida de la elasticidad de las arterias de mediano y gran calibre, y en cuya génesis están involucrados factores genéticos y hábitos de vida (Didac y col., 2020; Shafi, 2020).

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) es una citocina de 25 KDa que regula una gran cantidad de actividades biológicas como la proliferación, migración y apoptosis en diferentes tipos celulares (Suenaga y col., 2008); entre sus funciones destaca su papel en el mantenimiento de la estructura normal de la pared de los vasos sanguíneos; por lo que se le ha relacionado con síndromes cardiovasculares; sin embargo, el papel del TGF- $\beta$  en el desarrollo de la aterosclerosis es complejo y no está completamente esclarecido (Grainger, 2007); pues por un lado, existe evidencia que apoyan la hipótesis de su acción protectora, considerando que es un factor antiaterogénico y estabilizador de la placa de ateroma; pero por otro lado, se ha señalado que el TGF- $\beta$  ejerce efectos proinflamatorios y proaterogénicos (Dabek y col., 2006; Yu y col., 2019).

De igual manera, hallazgos experimentales han permitido conocer que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en la patogénesis de la aterosclerosis (Figueira y col., 2008A; 2008B; 2010; Dubois-Deruy y col., 2020); sin embargo no se conoce si el estrés oxidativo es un evento primario que ocurre temprano en la enfermedad o si representa un fenómeno secundario que refleja daño en el tejido; en este sentido, actualmente

las terapias inmunomoduladoras y antioxidantes están emergiendo como una alternativa atractiva y con resultados alentadores para el tratamiento de la aterosclerosis (Mathew y Pennathur, 2014).

El resveratrol es un polifenol presente en varios frutos que forman parte de la dieta humana, principalmente en la piel de las uvas y en el vino tinto (Figueira, 2010). Diferentes evidencias indican que el resveratrol podría ser beneficioso para prevenir el inicio y progresión de la aterosclerosis, pues disminuye el estrés oxidativo inhibiendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), disminuyendo la peroxidación lipídica; protege al sistema cardiovascular inhibiendo varios procesos fisiológicos como la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), la agregación plaquetaria y la proliferación celular (Labinsky y col., 2006; Figueira, 2010; Zhou y col., 2019). No obstante, se desconoce su efecto sobre el TGF- $\beta$  y su evolución a lo largo del proceso aterogénico; sin embargo, se ha planteado que el resveratrol podría modular la producción y expresión del TGF- $\beta$  (Suenaga y col., 2008). En vista de ello, en el presente estudio se evaluó el efecto del resveratrol sobre los niveles séricos del TGF- $\beta$  y su evolución en el tiempo en conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol.

## Materiales y métodos

### ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se emplearon 48 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 12 semanas de edad con un peso entre 1.200 a 1.300 gramos, provenientes del Bioterio del Instituto de Higiene "Rafael Rangel"

(Caracas, Venezuela). Los animales fueron mantenidos en jaulas a temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C) con ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Después de una semana de ambientación en el Bioterio Experimental de la Universidad de Carabobo (Valencia, Venezuela), los conejos fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos de 12 conejos cada uno, organizados de la siguiente manera: Grupo 1 (Control): Los cuales fueron alimentados diariamente con conejarina comercial (Protinal, Venezuela). Grupo 2 (Colesterol): Alimentados diariamente con conejarina comercial suplementada con 0,5% p/p de colesterol. Grupo 3 (Control-resveratrol): Alimentados diariamente con conejarina comercial y suplementados con resveratrol (2mg/Kg de peso corporal, vía oral). Grupo 4 (Colesterol-resveratrol): Alimentados diariamente con conejarina comercial suplementada con 0,5% p/p de colesterol y resveratrol (2mg/Kg de peso corporal, vía oral).

La dosis de resveratrol se seleccionó con base en estudios *in vivo* en conejos (Matos y col., 2012; González y col., 2018; Figueira y González, 2018; 2019; 2020), en los cuales el resveratrol posee efectos biológicos a dosis de 2 mg/Kg por vía oral. El resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno) administrado a los conejos fue de origen natural (Sigma Aldrich). Todos los conejos consumieron agua a libre demanda. El periodo experimental tuvo una duración de doce semanas. Los conejos fueron pesados antes, durante y después de la experimentación. Los experimentos fueron aprobados por el comité de Bioética, y siguieron las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio del Consejo Nacional de Investigación del manejo de animales de Laboratorio (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*

*National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011*).

#### ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS ALIMENTOS

**Conejarina comercial (Protinal, Venezuela):** Maíz, sorgo, afrechillo de trigo, harinas de maíz, ajonjolí, algodón, girasol y soya, concha de arroz, bagacillo de caña, pasto deshidratado, melaza, grasa estabilizada, carbonato y fosfato de calcio, sal, minerales "trazas" (cobalto, cobre, hierro, manganeso, yodo y zinc) suplementos de las vitaminas A, B2, B12, C, D3, E, ácido pantoténico y niacina, antioxidante, suplemento antibiótico y anticoccidial. Proteína cruda 12%, grasa cruda 1%, fibra cruda 20%, extracto libre de nitrógeno 42%.

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

#### Procedimiento experimental

**Determinaciones bioquímicas:** Las muestras de sangre fueron extraídas por punción intracardiaca a todos los conejos previo ayuno de 14 horas en las semanas 0, 6ta y 12ma, utilizando tubos sin anticoagulante. Posteriormente, las muestras previamente mantenidas en frío se centrifugaron a 3.000 rpm

durante 15 minutos y el suero obtenido fue conservado en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del procesamiento. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) por métodos enzimáticos (Wiener Lab, Argentina). La determinación del colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y asociado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) se realizaron por precipitación y posterior determinación enzimática (Wiener Lab, Argentina). Las concentraciones séricas de TGF- $\beta$  fueron determinadas por ensayo inmunoenzimático (NeoBiolab, Cambridge, Massachusetts, USA).

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

#### ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se calculó promedio y desviación estándar para las variables estudiadas. Se realizó las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Jarque-Bera. Se empleó el análisis de Kruskal-Wallis con análisis post hoc mediante la prueba de U- de Mann-Whitney sobre cada par de grupos. Se empleó la

correlación de Spearman para relacionar la TGF- $\beta$  con las variables del estudio. Se consideró significativo  $p < 0,05$ . Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.

## Resultados

### PERFIL LIPÍDICO DE LOS CONEJOS

En la Tabla I se resume las concentraciones de los lípidos séricos de los conejos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de CT, c-HDL, c-LDL y TG basales entre los grupos de conejos en estudio. El CT, c-HDL, c-LDL y TG en los grupos 1 y 3 permanecieron sin cambios significativos a lo largo del estudio. Se apreció un aumento significativo en la concentración de CT, c-HDL, c-LDL y TG en el grupo 2 y en el grupo 4 con respecto a sus respectivos controles (grupo 1 y 3, respectivamente) ( $p < 0,0001$ ). Para los grupos 2 y 4 las concentraciones de los lípidos séricos variaron desde el inicio hasta el final del experimento ( $p < 0,0001$ ).

### CONCENTRACIONES SÉRICAS DE TGF- $\beta$

Como se puede apreciar en la Figura 1, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas basales de TGF- $\beta$  entre los grupos de conejos sujetos a estudio. El TGF- $\beta$  en los grupos 1 y 3 permanecieron sin cambios a lo largo del experimento; por su parte, en los grupos 2 y 4 variaron a lo largo del estudio ( $p < 0,0001$ ). Por otra parte, en la sexta semana y al final del experimento las concentraciones séricas de TGF- $\beta$  aumentaron en los grupos 2 y 4 con respecto a los grupos 1 y 3, respectivamente ( $p < 0,005$ ). Sin embargo, en la 6ta y 12ma semana se evidenció una disminución significativa de la concentración de TGF- $\beta$  en el grupo 4 con respecto al grupo 2 ( $p < 0,005$ ).

**Tabla I**  
Lípidos séricos de los conejos sujetos a estudio

Grupos	CT (mg/dL)	c-LDL (mg/dL)	c-HDL (mg/dL)	TG (mg/dL)
<b>Basal</b>				
<b>Grupo 1</b>	73 ± 12	37 ± 8	34 ± 8	74 ± 14
<b>Grupo 2</b>	69 ± 10	42 ± 7	31 ± 7	79 ± 15
<b>Grupo 3</b>	68 ± 11	38 ± 8	35 ± 7	81 ± 17
<b>Grupo 4</b>	75 ± 13	44 ± 7	37 ± 9	84 ± 12
<b>6ta semana</b>				
<b>Grupo 1</b>	84 ± 15	45 ± 10	32 ± 9	84 ± 13
<b>Grupo 2</b>	597 ± 110*	520 ± 81*	67 ± 14*	181 ± 58*
<b>Grupo 3</b>	87 ± 19	41 ± 9	38 ± 12	88 ± 17
<b>Grupo 4</b>	616 ± 157#	501 ± 98#	61 ± 10#	207 ± 73#
<b>12ma semana</b>				
<b>Grupo 1</b>	79 ± 13	47 ± 9	39 ± 8	82 ± 10
<b>Grupo 2</b>	1010 ± 221*	810 ± 91*	95 ± 42*	308 ± 95*
<b>Grupo 3</b>	84 ± 17	48 ± 10	40 ± 11	74 ± 18
<b>Grupo 4</b>	1158 ± 217#	871 ± 86#	89 ± 61#	344 ± 72#
<b>Valores p</b>				
<b>Grupo 1</b>	0,9641	0,9481	0,9715	0,8468
<b>Grupo 2</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Grupo 3</b>	0,3630	0,6174	0,4182	0,2485
<b>Grupo 4</b>	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar de la media.

Significativo  $p < 0,05$

\*= Comparación con respecto al grupo 1.

#= Comparación con respecto al grupo 3.

p= Comparación con respecto al basal.

En la Tabla II se muestra el análisis de Spearman de las correlaciones entre la concentración de TGF- $\beta$  con el perfil lipídico, evidenciando correlación positiva significativa entre las variables ( $p < 0,0001$ ).

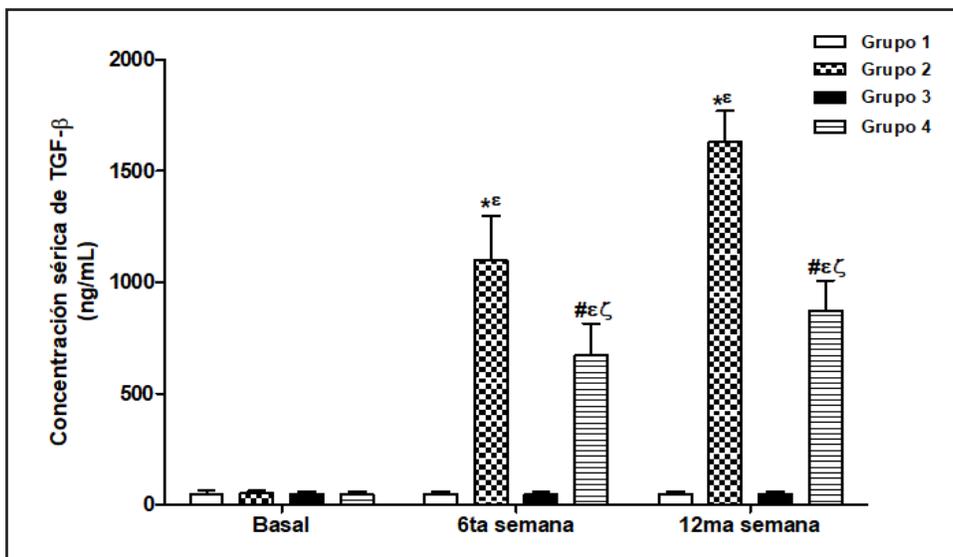
#### ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA AORTA

En la Tabla III se presenta la distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta. Ningún conejo de los grupos 1 y 3 presentaron lesiones ateroscleróticas a lo largo del estudio. Por su parte, todos los conejos del grupo 2 presentaron lesiones de grado variable a lo largo del estudio. En

el grupo 4, algunos conejos no presentaron lesiones y otros evidenciaron lesiones de grado variable (Figura 2).

#### Discusión

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que involucra al sistema inmunológico y al estrés oxidativo, que está caracterizada por la acumulación de lípidos oxidados en la pared arterial y la infiltración de células inmunológicas y células musculares lisas (CML) (Frutkin y col., 2009; Didac y col., 2020); las cuales son moduladas por citocinas y factores de crecimiento. En este sentido, el TGF- $\beta$



**Figura 1.** Efecto del resveratrol sobre las concentraciones sérica de TGF- $\beta$  en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 6<sup>ta</sup> y 12<sup>ma</sup>. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=12$  basal y 6<sup>ta</sup> semana;  $n=6$  en la 12<sup>ma</sup> semana). \* $p<0,0050$  vs. grupo control (Grupo 1), # $p<0,0050$  vs. control resveratrol (Grupo 3),  $\zeta p<0,005$  vs. Grupo 2.  $\epsilon p<0,0001$  vs. su respectivo valor basal.

ha demostrado estar involucrado en la patogénesis de esta enfermedad; ya que es una citocina pleiotrópica cuyo efecto sobre el sistema cardiovascular es ambiguo; por un lado, existe evidencias que apoyan su acción protectora, considerando que es un factor antiaterogénico y estabilizador de la placa de ateroma; pero, por otro lado, se ha señalado que ejerce efectos proinflamatorios y proaterogénicos (Dabek y col., 2006).

**Tabla II**

Análisis de la correlación de Spearman entre las concentraciones de TGF- $\beta$  y el perfil lipídico

	<b>r</b>	<b>p</b>
TGF- $\beta$ & CT	0,6351	0,0001
TGF- $\beta$ & c-LDL	0,5738	0,0001
TGF- $\beta$ & c-HDL	0,6482	0,0001
TGF- $\beta$ & TG	0,7380	0,0001

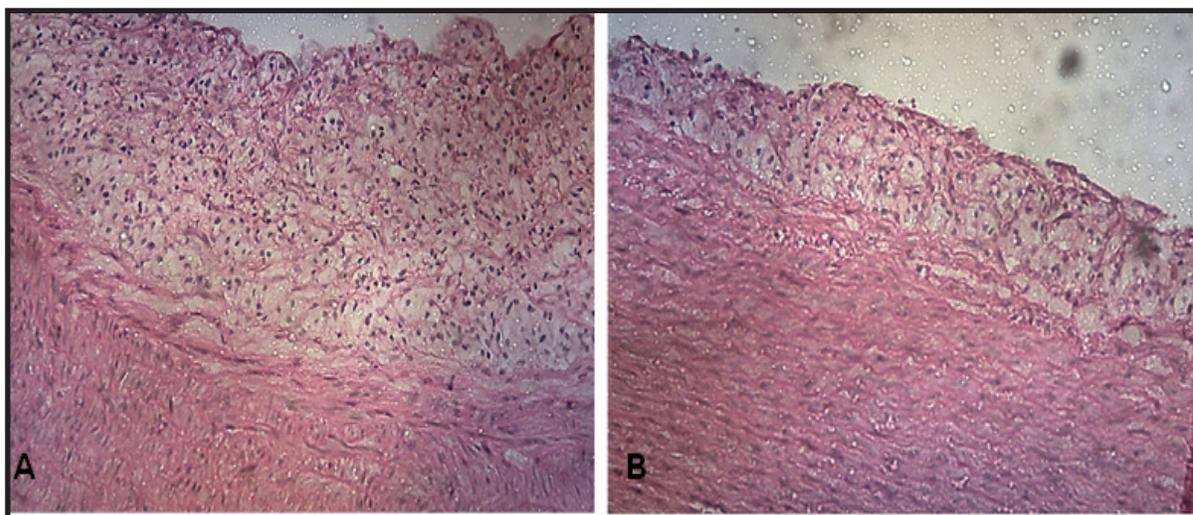
c-HDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, c-LDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad, CT: Colesterol total, TG: Triglicéridos. TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$

Diferentes estudios asocian las variaciones en la expresión o señalización del TGF- $\beta$  con la aterosclerosis; sin embargo, las relaciones precisas entre el TGF- $\beta$  y la aterosclerosis no están completamente comprendidas (Frutkin y col., 2009). En este sentido, el TGF- $\beta$  se ha considerado como una citocina antiaterogénica y protectora, debido

a que inhibe la proliferación y migración de las CML, leucocitos y la expresión de moléculas de adhesión endotelial vascular (Uluçay y col., 2015). En relación con esto, varios estudios en ratones hiperlipidémicos describen al TGF- $\beta$  como una citocina antiaterogénica que limita la aterosclerosis, principalmente a través de efectos inmunosupresores (Mallat y col., 2001; Lutgens y col., 2002; Gojova y col., 2003; Robertson y col., 2003; Frutkin y col., 2009). Por otra parte, estudios en animales sugieren que el TGF- $\beta$  podría acelerar la aterosclerosis, aumentando la acumulación de la matriz extracelular vascular y estimulando la producción de proteoglicanos, con el consecuente incremento en la retención de lipoproteínas en la pared vascular (O'Brien y col., 1998; Schlick y col., 1998; Mallat y col., 2001; Little y col., 2002; Uluçay y col., 2015; Agarwal y col., 2015; Cheng y col., 2019).

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

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



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

En el presente estudio se evidenció que la administración de una dieta enriquecida con colesterol ocasionó lesiones ateroscleróticas de grado intermedio y avanzado y un incremento progresivo y significativo en las concentraciones séricas de TGF- $\beta$  a partir de la sexta semana de estudio, sugiriendo el papel de esta molécula desde las primeras fases de la aterosclerosis, pudiendo constituir un marcador temprano no invasivo de la enfermedad. Diferentes estudios apoyan el papel pro-aterogénico del TGF- $\beta$ ; en efecto, la evidencia ha descrito que el TGF- $\beta$  se asocia con un mayor riesgo de incidencia de enfermedad arterial periférica (Kanzaki y col., 1995; Agarwal y col., 2015). Asimismo, experimentos *in vivo* en conejos han mostrado que el TGF- $\beta$ 1 estimula el engrosamiento de la íntima de las arterias después de la denudación vascular con catéter de balón, lo cual sugiere la importancia del TGF- $\beta$ 1 en las primeras fases de la aterogénesis, pues esta citocina es capaz de aumentar la producción de la matriz extracelular por parte de las CML en la íntima arterial, e induce la formación de una cicatriz fibrosa, participando en el desarrollo de la lesión aterosclerótica (Kanzaki y col., 1995). De hecho, Chen y col. (2019) describieron que la señalización de la TGF- $\beta$  endotelial es una pieza fundamental en el crecimiento de la placa aterosclerótica, y su bloqueo incrementa la expresión de genes involucrados en la regulación de la permeabilidad vascular, conllevando una reducción de esta.

Es relevante señalar que la elevación de las concentraciones séricas de este marcador de aterosclerosis se observó desde la sexta semana de experimentación, lo cual sugiere que el TGF- $\beta$  es un marcador temprano de aterosclerosis, pues interviene en el inicio y

progresión de esta enfermedad; ya que esta citocina posee propiedades proinflamatorias y proaterogénicas bien descritas, actuando desde las etapas iniciales de la aterogénesis; pues desempeña un importante papel en la retención de lípidos y en el consecuente desarrollo de las lesiones ateroscleróticas (Little y col., 2002); ya que es capaz de aumentar la síntesis de proteoglicanos por las CML que se acumulan en las regiones ricas en lípidos de las placas ateroscleróticas, promoviendo la retención de lipoproteínas. Consecuentemente, la agregación de proteoglicanos puede conducir a reducciones en el movimiento transmural de las lipoproteínas, su acumulación en la pared del vaso y su posterior modificación química (Bobik y col., 1999).

De igual manera, los hallazgos encontrados en el presente estudio muestran una asociación positiva del TGF- $\beta$  con el perfil lipídico en el grupo que consumió una dieta hipercolesterolémica (Grupo 2), tal y como ha sido reportado en otros estudios (Zhou y col., 2009; Buday y col., 2010). De hecho, Buday y col. (2010) demostraron que el TGF- $\beta$  causa disfunción endotelial a través del estrés oxidativo inducido por la activación de la NAD(P)H oxidasa y la consecuente sobreproducción de superóxido vascular en un modelo murino de aterosclerosis; dicho hallazgo se asoció con el engrosamiento de la pared aórtica y con la formación de placa aterosclerótica agravada. Estos resultados pueden proporcionar un mecanismo que explica la aterosclerosis acelerada en pacientes con TGF- $\beta$ 1 elevado en suero. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que el incremento del TGF- $\beta$ , acompañado del aumento de la concentración de los lípidos séricos favorece el proceso aterosclerótico

y apuntan a que el TGF- $\beta$  sérico puede constituir un marcador de riesgo y de aterosclerosis. Asimismo, se sugiere que el incremento de la concentración de los lípidos séricos puede contribuir a la instauración del proceso inflamatorio sistémico, lo cual se ve acompañado del aumento del TGF- $\beta$ , favoreciendo el proceso aterosclerótico.

Asimismo, en la presente investigación se observó que, bajo nuestras condiciones experimentales, la administración de una dieta enriquecida con colesterol durante 12 semanas fue capaz de ocasionar un incremento en los lípidos séricos desde la 6ta semana de experimentación, e indujo lesiones de grado leve en las aortas de los conejos; por su parte, la administración de la dieta hipercolesterolémica durante las doce semanas, indujo la evolución de las lesiones a un grado intermedio y avanzado. En este sentido, diferentes estudios han indicado que el colesterol (0,5-2%) añadido a la dieta ha demostrado que provoca hipercolesterolemia y posteriormente el desarrollo de lesiones ateromatosas (Roth y col., 1983). En cuanto a los niveles de triglicéridos, diversos estudios han reportado que los mismos incrementan o permanecen iguales tras la administración de una dieta hipercolesterolémica (Camejo y col., 1973; Stange y col., 1975; Kushwaha y col., 1978; Roth y col., 1983; Zhang y col., 2002; De Castro y col., 2009; Sun y col., 2013; Tanko y col., 2016). En este sentido, la hipertriglicéridemia resultante tras la administración de una dieta enriquecida en colesterol, puede ser debida al incremento de su síntesis o a la disminución del catabolismo de lipoproteínas ricas en triglicéridos, lo cual influye directamente en la composición y metabolismo de las LDL y HDL (Adekunle y col., 2013). Asimismo, la

lipidemia observada tras la administración del colesterol puede ser el resultado del incremento de la masa adiposa visceral, lo cual causa una alteración en el metabolismo de los lípidos y consecuentemente resulta en un incremento en los ácidos grasos circulantes, los cuales son potentes inductores de estrés oxidativo (Tanko y col., 2016).

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol natural con propiedades antioxidantes potentes, el cual está presente en frutos como las moras y los arándanos, pero principalmente, en la uva y en el vino tinto. Sus propiedades *in vitro* han sido ampliamente estudiadas, entre ellas cabe destacar su actividad como anticancerígeno, antiagregante plaquetario, antiinflamatorio (Dobrydneva y col., 1999; Tseng y col., 2011). En cuanto a sus propiedades *in vivo*, su actividad no está del todo esclarecida; sin embargo, existen evidencias que encuentran beneficios sobre el sistema cardiovascular (Baur y col., 2006; Agarwal y Baur, 2011; Timmers y col., 2011; Gambini y col., 2013).

En el presente estudio se demostró, por primera vez, que la suplementación de resveratrol disminuyó las concentraciones séricas del TGF- $\beta$  durante la aterosclerosis y ocasionó una disminución en la formación de lesiones ateroscleróticas en los conejos suplementados con este polifenol a los que se les administró una dieta hipercolesterolémica; sugiriendo que, bajo nuestras condiciones experimentales y de acuerdo a la dosis empleada, el resveratrol tiene efectos antiinflamatorios durante la aterosclerosis desde la sexta semana de experimentación. En relación a ello, diferentes estudios han demostrado que el resveratrol puede modular las

concentraciones y expresión del TGF- $\beta$ ; en este sentido, Suenaga y col., (2008), refieren que algunos de los efectos beneficiosos del resveratrol podrían estar mediados en parte por sus efectos sobre la expresión y señalización del TGF- $\beta$ ; ya que este polifenol fue capaz de incrementar la transcripción del gen TGF- $\beta$ 2, incrementar su producción y activar la señalización TGF- $\beta$ /Smad en la línea de células epiteliales de pulmón humano, A549. Asimismo, diversos estudios señalan que el resveratrol es capaz de disminuir la expresión del TGF- $\beta$  tanto *in vivo* como *in vitro* (Chávez y col., 2008; He y col., 2017; Qiao y col., 2017; Ashrafizadeh y col., 2020), inhibiendo la diferenciación y activación de los miofibroblastos a través de la supresión de la vía ERO/ERK/TGF- $\beta$ /periostina (Wu y col., 2016); e inhibiendo la fibrosis y la expresión de TGF- $\beta$  inducida por la angiotensina II y alta glucosa (Liu y col., 2015).

De igual manera se ha descrito que la administración oral de resveratrol (10 mg/Kg/día) fue capaz de disminuir la expresión del TGF- $\beta$  y la fibrosis en ratas a las que se indujo cirrosis con tetracloruro de carbono; sugiriendo que el resveratrol posee efectos antifibróticos (Chávez y col., 2008). Asimismo, He y col. (2017), indicaron que el resveratrol fue capaz de disminuir la expresión de TGF- $\beta$  en un modelo de prostatitis crónica en ratas, mejorando la fibrosis y suprimiendo la vía de señalización TGF- $\beta$ /Wnt/b-catenina. Por su parte, Arablou y col. (2021) demostraron que el resveratrol mejora la progresión de la endometriosis mediante la disminución de la expresión del TGF- $\beta$  y del factor de crecimiento derivado del endotelio en células de estroma endometrial. Asimismo, Qiao y col. (2017), demostraron una disminución en la expresión de TGF- $\beta$ 1, p38, fibronectina

y mejoría sobre los cambios histológicos renales en ratas diabéticas tratadas con resveratrol (20 mg/Kg/día durante 4 semanas), y una disminución en la expresión de esta proteína y de la fibronectina en una línea de células mesangiales tratadas con resveratrol, sugiriendo que este polifenol tiene propiedades renoprotectoras durante la diabetes, pues fue capaz de disminuir el daño al tejido posiblemente mediante una inhibición de la vía de señalización p38/MAPK/TGF- $\beta$ 1.

Por lo tanto, considerando que el resveratrol fue capaz de disminuir las concentraciones séricas del TGF- $\beta$ , el cual ha demostrado estimular la síntesis de proteoglicanos por las CML, promoviendo la retención de lipoproteínas y su acumulación en la pared del vaso y su posterior modificación química (Bobik y col., 1999), eventos claves en la aterosclerosis; se puede inferir que uno de los efectos antiaterogénicos del resveratrol se deba a la disminución en la secreción de esta citocina *in vivo* durante la aterosclerosis; lo cual podría contribuir a disminuir la acumulación de lipoproteínas en la íntima arterial, pues dicho efecto estuvo acompañado en una disminución en la formación y severidad de las lesiones ateroscleróticas, tal y como se ha demostrado previamente (González y col., 2018; Figueira y González, 2018; 2019; 2020). Es relevante señalar que el efecto del resveratrol sobre los niveles del TGF- $\beta$  se observó en los conejos a los que se le indujo la aterosclerosis con una dieta hipercolesterolémica, lo cual indica la necesidad de un ambiente "estimulado" o inflamado, tal y como se ha apreciado *in vitro* (Buttari y col., 2014).

Hasta ahora, algunos estudios han indicado que el resveratrol mejora el

perfil lipídico y el metabolismo de las lipoproteínas en ratones sometidos a dieta hipercolesterolémica (Ramprasath y Jones, 2010; Göçmen y col., 2011; Xie y col., 2014). Sin embargo, otros estudios experimentales y clínicos no han demostrado un efecto favorecedor del resveratrol sobre el perfil lipídico (Matos y col., 2012; Faghihzadeh y col., 2015; González y col., 2018; Figueira y col., 2018; 2019; 2020); dichos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio. Por lo tanto, la ausencia del efecto hipolipemiante encontrado en la presente investigación podría obedecer a la acumulación de lípidos exógenos provenientes de la dieta, ya que los conejos no pueden incrementar la excreción de esteroides (Kolodgie y col., 1996). Sin embargo, a pesar de que la suplementación del resveratrol no tuvo efecto sobre los lípidos séricos, fue capaz de reducir la formación y progresión de la aterosclerosis, inducida por la dieta hipercolesterolémica desde la sexta semana de estudio; dicho efecto del resveratrol ha sido señalado previamente, pues Matos y col. (2012) demostraron que la suplementación con resveratrol (2 mg/Kg/día) en conejos expuestos a una dieta hipercolesterolémica durante 56 días, inhibió la progresión de la lesión aterosclerótica hacia un fenotipo más grave y disminuyó el área de la íntima y la relación íntima/media. Igualmente, otros estudios como el de Meng y col. (2014) han evidenciado que la suplementación con resveratrol en ratas que recibieron dieta aterogénica, inhibió el avance de la lesión aterosclerótica. Por lo tanto, el efecto antiaterogénico del resveratrol encontrado en el presente estudio, pudo ser dependiente de sus propiedades antiinflamatorias; pues su suplementación fue capaz de disminuir las concentraciones séricas del TGF- $\beta$ .

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

### Referencias bibliográficas

- Adekunle A, Adelusi T, Fatoki J. 2013. Diet-induced hyperlipidemia and atherosclerosis in white rabbits. *Asian J Pharm Clin Res* 6 (2): 105–108.
- Agarwal B, Baur J. 2011. Resveratrol and life extension. *Ann NY Acad Sci* 1215(1): 138–143.
- Agarwal I, Arnold A, Glazer N, Barasch E, Djousse L, Fitzpatrick A, Rimm E. 2015. Fibrosis-related biomarkers and large and small vessel disease: the Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis* 239(2): 539–546.
- Arablou T, Aryaeian N, Khodaverdi S, Kolahdouz-Mohammadi R, Moradi Z, Rashidi N, Delbandi A. 2021. The effects of resveratrol on the expression of VEGF, TGF- $\beta$ , and MMP-9 in endometrial stromal cells of women with endometriosis. *Sci Rep* 11(1):6054.
- Ashrafizadeh M, Najafi M, Orouei S, Zabolian A, Saleki H, Azami N, Sharifi N, Hushmandi K, Zarrabi A, Seok K. 2020. Resveratrol modulates transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling pathway for disease therapy: A new insight into its pharmacological activities. *Biomedicine* 8:261.
- Baur J, Sinclair D. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nature reviews. Drug Discov* 5(6): 493–506.
- Bobik A, Agrotis A, Kanellakis P, Dilley R, Krushinsky

- A, Smirnov V, Kostolias G. 1999. Distinct patterns of transforming growth factor- $\beta$  isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. *Circulation* 99(22): 2883–2891.
- Buday A, Órsy P, Godó M, Mózes M, Kökény G, Lacza Z, Hamar P. 2010. Elevated systemic TGF- $\beta$  impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodeling, and increased plaque formation in apoE $^{-/-}$  mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299(2): H386–H395.
- Buttari B, Profumo E, Segoni L, D’Arcangelo D, Rossi S, Facchiano F, Saso L, Businaro R, Iuliano L, Riganò R. 2014. Resveratrol counteracts inflammation in human M1 and M2 macrophages upon challenge with 7-oxo-cholesterol: potential therapeutic implications in atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev* 257543.
- Camejo G, Bosch V, Arreaza C, Mendez H. 1973. Early changes in plasma lipoprotein structure and biosynthesis in cholesterol-fed rabbits. *J Lipid Res* 14:61–68.
- Chávez E, Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Vergara P, Moreno M, Muriel P. 2008. Resveratrol prevents fibrosis, NF-kappaB activation and TGF- $\beta$  increases induced by chronic CCl<sub>4</sub> treatment in rats. *J Appl Toxicol* 28(1): 35–43.
- Chen P, Qin L, Li G, Zheng W, Dahlman J, Malagon-Lopez J, Gujja S, Cilfone N, Kauffman K, Sun L, Sun H, Zhang X, Aryal B, Canfran-Duque A, Liu R, Kusters P, Sehgal A, Jiao Y, Anderson DG, Gulcher J, Fernandez-Hernando C, Lutgens E, Schwartz MA, Pober JS, Chittenden TW, Tellides G, Simons M. 2019. Endothelial TGF- $\beta$  signaling drives vascular inflammation and atherosclerosis. *Nat Metab* 1(9): 912–926.
- Cheng Y, Zhou M, Zhou W. 2019. MicroRNA-30e regulates TGF- $\beta$ -mediated NADPH oxidase 4-dependent oxidative stress by Snai1 in atherosclerosis. *Int J Mol Med* 43: 1806–1816.
- Dabek J, Kulach A, Monastyrska-Cup B, Gasior Z. 2006. Transforming growth factor b and cardiovascular diseases: The other facet of the ‘protective cytokine’. *Pharmacol Rep* 58(6): 799–805.
- De Castro M, Veiga A, Pacheco M. 2009. Plasma lipid profile of experimentally induced hyperlipidemic New Zealand white rabbits is not affected by resveratrol. *J Applied Res* 9(1,2): 18–22.
- Didac M, Esmeralda C, Nuria A. 2020. Cholesterol and Inflammation in atherosclerosis: An Immune-Metabolic Hypothesis. *Nutrients* 12(8): 2444.
- Dobrydneva Y, Williams R, Blackmore P. 1999. Trans-resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. *Br J Pharmacol* 128(1): 149–157.
- Dubois-Deruy E, Peugnet V, Turkieh A, Pinet F. 2020. Oxidative stress in cardiovascular diseases. *Antioxidants (Basel)* 9(9):864.
- Faghih-zadeh F, Adibi P, Hekmatdoost A. 2015. The effects of resveratrol supplementation on cardiovascular risk factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 114(5): 796–803.
- Figueira L. El Resveratrol. 2010. Papel en enfermedades cardiovasculares y cáncer. *INFORMED* 12(2): 73–84.
- Figueira L, González J. 2008A. Efecto del extracto de Pinus maritime, Vitamina C y E, sobre la concentración sérica de LDLox, PCR, Selectina-E, IL-6 y formación de ateromas en conejos con dieta hiperlipidémica. *INFORMED* 10 (10): 593–607.
- Figueira L, González J. 2008B. Efecto de la Vitamina C, sobre la actividad de la GPx y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica. *Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec* 11 (1): 30–36.
- Figueira L, González J, Arias M, Reigosa A. 2010. Efectos del Pycnogenol y vitamina E, sobre la actividad de la glutatión peroxidasa y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica. *Salus* 14 (3):33–42.
- Figueira L, González J. 2018. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones séricas del factor de crecimiento endotelial vascular durante la aterosclerosis. *Clin Investig Arterioscler* 30(5):209–216.
- Figueira L, González J. 2019. Efecto del resveratrol sobre la pentraxina 3 sérica en la aterosclerosis. Pentraxina 3 como marcador de aterosclerosis. *Rev Fac Farm* 82 (1y2): 97–109.
- Figueira L, González J. 2020. Efecto del resveratrol sobre quimioquinas séricas en la aterosclerosis. *Rev Fac Farm* 83 (1y2): 7–23.
- Frutkin A, Otsuka, G, Stempien-Otero A, Sesti C, Du L, Jaffe M, Minter D. 2009. TGF- $\beta$ 1 limits plaque growth stabilizes plaque structure and prevents aortic dilation in apolipoprotein E-null mice.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol 29(9): 1251–1257.
- Gambini J, López-Grueso R, Olaso-González G, Inglés M, Abdelazid K, El Alami M, Viña J. 2013. Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 48(2): 79–88.
- Göçmen A, Burgucu D, Gümüslü S. 2011. Effect of resveratrol on platelet activation in hypercholesterolemic rats: CD40–CD40L system as a potential target. *Appl Physiol Nutr Metab* 36(3): 323–330.
- Gojova A, Brun V, Esposito B, Cottrez F, Gourdy P, Ardouin P, Groux H. 2003. Specific abrogation of transforming growth factor- $\beta$  signaling in T cells alters atherosclerotic lesion size and composition in mice. *Blood* 102(12): 4052–4058.
- González J, El Basset A, Pascuas R, Severino S, Perdomo M, Bayone J, Navarro M, Figueira L. 2018. Efecto del resveratrol sobre marcadores séricos de inflamación durante la aterosclerosis. Papel de la interleucina-17 e interleucina-33. *Rev Fac Farm* 81 (1y2): 25–40.
- Grainger D. 2007. TGF- $\beta$  and atherosclerosis in man. *Cardiovasc Res* 74(2): 213–222.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
- He Y, Zeng H, Yu Y, Zhang J, Duan X, Zeng X, Gong F, Liu Q, Yang B. 2017. Resveratrol improves prostate fibrosis during progression of urinary dysfunction in chronic prostatitis. *Environ Toxicol Pharmacol* 54:120–124.
- Kanzaki T, Tamura K, Takahashi K, Saito Y, Akikusa B, Oohashi H, Morisaki N. 1995. *In vivo* effect of TGF- $\beta$ 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(11): 1951–1957.
- Kolodgie F, Katocs A, Largis E, Wrenn J, Herderick E, Lee S, Virmani R. 1996. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16(12): 1454–1464.
- Kushwaha R, Hazzard W. 1978. Catabolism of very-low-density lipoproteins in the rabbit. Effect of changing composition and pool size. *Biochim Biophys Acta* 528:176–189.
- Labinsky N, Csiszar A, Veress G, Stef G, Pacher P, Oroszi G, Wu J, Ungvari Z. 2006. Vascular dysfunction in aging: Potential effects of resveratrol, an anti-inflammatory phytoestrogen. *Curr Med Chem* 13(9): 989–996.
- Little P, Tannock L, Olin K, Chait A, Wight T. 2002. Proteoglycans synthesized by arterial smooth muscle cells in the presence of transforming growth factor- $\beta$ 1 exhibit increased binding to LDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(1): 55–60.
- Liu J, Zhuo X, Liu W, Wan Z, Liang X, Gao S, Yuan Z, Wu Y. 2015. Resveratrol inhibits high glucose-induced collagen upregulation in cardiac fibroblasts through regulating TGF- $\beta$ 1-Smad3 signaling pathway. *Chem Biol Interact* 227: 45–52.
- Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Koteliensky V, Daemen M. 2002. Transforming growth factor- $\beta$  mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(6): 975–982.
- Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamaté C, Merval R, Tedgui A. 2001. Inhibition of transforming growth factor- $\beta$  signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 89(10): 930–934.
- Mathew A, Pennathur S. 2014. Macrophages, Oxidative Stress, and Atherosclerosis. *Encyclopedia Med Immunol* 693–703.
- Matos RS, Baroncini LA, Précoma LB, Winter G, Lambach PH, Caron EY, Kaiber F, Précoma DB. 2012. Resveratrol causes antiatherogenic effects in an animal model of atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol* 98(2):136–142.
- Meng C, Liu J, Du A. 2014. Cardioprotective effect of resveratrol on atherogenic diet-fed rats. *Int J Clin Exp Pathol* 7(11): 7899–7906.
- O'Brien K, Olin K, Alpers C, Chiu W, Ferguson M, Hudkins K, Chait A. 1998. Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques. *Circulation* 98(6): 519–527.
- Qiao Y, Gao K, Wang Y, Wang X, Cui B. 2017. Resveratrol ameliorates diabetic nephropathy in rats through negative regulation of the p38 MAPK/TGF- $\beta$ 1 pathway. *Exp Ther Med* 13(6): 3223–3230.
- Ramprasath V, Jones P. 2010. Anti-atherogenic effects of resveratrol. *Eur J Clin Nutr* 64(7): 660–668.
- Rasmusen C, Moinard C, Martin C, Tricottet V, Cynober L, Couderc R. 2007. L-arginine

- plus atorvastatin for prevention of atheroma formation in genetically hypercholesterolaemic rabbits. *Br J Nutr* 97: 1083–1089.
- Robertson A, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell R, Hansson G. 2003. Disruption of TGF- $\beta$  signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest* 112(9): 1342–1350.
- Roth R, Gaubatz J, Gotto A, Pad J. 1983. Effect of cholesterol feeding on the distribution of plasma lipoproteins and on the metabolism of apolipoprotein E in the rabbit. *J Lipid Res* 44: 1–1.
- Schulick A, Taylor A, Zuo W, Qiu C, Dong G, Woodward R, Dichek D. 1998. Overexpression of transforming growth factor  $\beta$ 1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. *Proc Natl Acad Sci* 95(12): 6983–6988.
- Shafi O. 2020. Switching of vascular cells towards atherogenesis, and other factors contributing to atherosclerosis: a systematic review. *Thrombosis J* 18:28.
- Stange E, Agostini B, Papenberg J. 1975. Changes in rabbit lipoprotein properties by dietary cholesterol, and saturated and polyunsaturated fats. *Atherosclerosis* 22:125–148.
- Stary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfield M, Schwartz C, Wagner W, Wesler R. 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis. *Am Heart Assoc. Circulation* 15:1512–1531.
- Suenaga F, Hatsushika K, Takano S, Ando T, Ohnuma Y, Ogawa H, Nakao A. 2008. A possible link between resveratrol and TGF- $\beta$ : Resveratrol induction of TGF- $\beta$  expression and signaling. *FEBS Letters* 582(5): 586–590.
- Sun J, Byungrok M, Ki C, Eun J, Dong U. 2013. Effect of dietary cholesterol and cholesterol oxides on blood cholesterol, lipids, and the development of atherosclerosis in rabbits. *Int J Mol Sci* 14: 12593–12606.
- Tanko Y, Jimoh A, Ahmed A, Mohammed A, Ayo J. 2016. Resveratrol Protects Rabbits Against Cholesterol Diet-Induced Hyperlipidaemia. *Niger J Physiol Sci* 31(1):71–75.
- Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper R, van de Weijer T, Goossens G, Moonen-Kornips E. 2011. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metabolism* 14(5): 612–622.
- Tseng P, Hou S, Chen R, Peng H, Hsieh C, Kuo M, Yen M. 2011. Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis. *J Bone Miner Res* 26(10): 2552–2563.
- Uluçay S, Çam F, Batır M, Sütçü R, Bayturan Ö, Demircan K. 2015. A novel association between TGF $\beta$ 1 and ADAMTS4 in coronary artery disease: A new potential mechanism in the progression of atherosclerosis and diabetes. *Anatol J Cardiol/ Anadolu Kardiyol Derg* 15(10).
- Wu H, Li G, Xie J, Li R, Chen Q, Chen J, Wei Z, Kang L, Xu B. 2016. Resveratrol ameliorates myocardial fibrosis by inhibiting ROS/ERK/TGF- $\beta$ /periostin pathway in STZ-induced diabetic mice. *BMC Cardiovasc Disord* 16(1): 5.
- Xie H, Han H, Chen Z, He J. 2014. A study on the effect of resveratrol on lipid metabolism in hyperlipidemic mice. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 11(1): 209–212.
- Yu H, Ma S, Sun L, Gao J, Zhao C. 2019. TGF  $\beta$ 1 upregulates the expression of lncRNA ATB to promote atherosclerosis. *Mol Med Rep* 19: 4222–4228.
- Zhang Z, Ho W, Huang Y, James A, Lam L, Chen Z. 2002. Hawthorn Fruit Is Hypolipidemic in Rabbits Fed a High Cholesterol Diet. *J Nutr* 132: 5–10.
- Zhou X, Johnston T, Johansson D, Parini P, Funari K, Svensson J, Hansson G. 2009. Hypercholesterolemia leads to elevated TGF- $\beta$ 1 activity and T helper 3-dependent autoimmune responses in atherosclerotic mice. *Atherosclerosis* 204(2): 381–387.
- Zhou X, Yang J, Zhou M, Zhang Y, Liu Y, Hou P, Zeng X, Yi L, Mi M. 2019. Resveratrol attenuates endothelial oxidative injury by inducing autophagy via the activation of transcription factor EB. *Nutr Metab (Lond)* 16: 42.