

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**Efectos preventivos de quercetina sobre la
disfunción endotelial.**

Tesis Doctoral para aspirar
al Grado de Doctor que presenta el
Licenciado D. Manuel Sánchez Santos

2007

*El enigma no existe.
Si una pregunta puede llegar a plantearse,
entonces también se le puede dar una respuesta.*

Ludwig Wittgenstein

*La ciencia del hombre es grande,
pero su ignorancia es inmensa.*

Fernando Pessoa

Abreviaturas empleadas.

AA

Ácido araquidónico.

ACh

Acetilcolina.

ADMA

Dimetil arginina asimétrica.

ADN

Ácido desoxirribonucleico.

ADP

Adenosín difosfato.

Akt

Proteín kinasa B.

Ang II

Angiotensina II.

ARA-II

Antagonistas del receptor de angiotensina II.

ARN

Ácido ribonucleico.

ARNm

Ácido ribonucleico mensajero.

AT-1

Receptor 1 de angiotensina II.

AT-2

Receptor 2 de angiotensina II.

ATP

Adenosín trifosfato.

BH₂

Dihidrobiopterina.

BH₄

Tetrahidrobiopterina.

Bk

Bradikinina.

BSA

Albúmina de suero bovino.

[Ca²⁺]_i

Concentración intracelular de calcio.

Cam

Calmodulina.

cAMP

Adenosín monofosfato cíclico.

Cat

Catalasa.

CDKs

Kinasas dependientes de ciclinas.

cGMP

Guanosín monofosfato cíclico.

CMLV

Célula del músculo liso vascular.

COMT

Catecol-o-metil transferasa.

COX

Ciclooxigenasa.

c.s.p

Cantidad suficiente para.

c-SRC

Tirosín kinasa independiente de receptor c-SRC.

CuZn-SOD

SOD dependiente de cobre y cinc.

DAF-2

4,5-diaminofluoresceína.

DAPI

Dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DDAH

Dimetilaminohidrolasa.

DHE

Dihidroetidio.

DMSO

Dimetilsulfóxido.

DOCA

Acetato de deoxicorticosterona

DPI

Difeniléniodonio.

DTT

Ditiotreitol.

ECL

Desarrollo de quimioluminiscencia.

EDHF

Factor hiperpolarizante derivado de endotelio.

EDRF

Factor relajante derivado de endotelio.

EDTA

Ácido etilendiamino tetracético.

EGFR

Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

EGTA

Ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético.

eNOS

Óxido nítrico sintasa endotelial.

ERK 1/2

Kinasas reguladas por señales extracelulares 1/2.

ET-1

Endotelina 1.

FAD

Flavín adenín dinucleótido.

FC

Frecuencia cardiaca

FMN

Flavín mononucleótido.

GCs

Guanilato ciclasa soluble.

GLUT

Transportador de glucosa.

GPx

Glutation peroxidasa.

GTP

Guanosín trifosfato.

HDL

Lipoproteínas de alta densidad.

HEPES

Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico.

H₂O₂

Peróxido de hidrógeno.

HSP90

Proteína de impacto calórico 90.

ICAM-1

Molécula de adhesión intracelular 1.

IECA

Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

iNOS

Óxido nítrico sintasa inducible.

IP₃

Inositol trifosfato.

I.P.C.

Índice de peso cardíaco.

I.P.V.I

Índice de peso de ventrículo izquierdo.

I.P.R.

Índice de peso renal.

Iso

Isorhamnetina.

JNK

Kinasa c-jun-NH₂-terminal.

LDL

Lipoproteínas de baja densidad.

L-NAME

N^ω-nitro-L-arginina metil éster.

LO·

Radical lipídico.

LOO·

Radical lipídico.

LOX

Lipooxigenasa.

M

Molar.

MAPKs

Proteín kinasas activadas por mitógeno.

MCP-1

Proteína quimiotáctica de monocitos 1.

MDA

Malonildialdehído.

MLCK

Kinasa de cadenas ligeras de miosina.

MMPs

Metaloproteasas de matriz.

Mn-SOD

SOD dependiente de manganeso.

NA

Noradrenalina.

NAD⁺

Nicotinamín adenín dinucleótido oxidado.

NADPH

Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato.

NO

Óxido nítrico.

nNOS

Óxido nítrico sintasa neuronal.

NOS

Óxido nítrico sintasa.

NOS-I

Óxido nítrico sintasa neuronal.

NOS-II

Óxido nítrico sintasa endotelial.

NOS-III

Óxido nítrico sintasa inducible.

NPS

Nitroprusiato sódico.

O₂⁻

Anión superóxido.

OH⁻

Radical hidroxilo.

ONOO⁻

Peroxinitrito.

PAM

Presión arterial media

PAS

Presión arterial sistólica

PBS

Suero fisiológico salino.

PC

Peso corporal.

PCar

Peso cardiaco.

PDE

Fosfodiesterasa.

PDGF

Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PE-50

Polietileno 50.

PEG-SOD

Polietilenglicol-SOD.

PFA

Para-formaldehido.

PGH₂

Prostaglandina H₂.

PGI₂

Prostaciclina.

PI3K

Fosfatidil inositol-3-kinasa.

PK

Proteín kinasa.

PKA

Proteín kinasa A.

PKB

Proteín kinasa B = Akt.

PKC

Proteín kinasa C.

PLD Fosfolipasa D.	SDS Dodecilsulfato sódico.
PMSF Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo.	SEM Error estándar de la media
PPAR Receptor para el activador de la proliferación de peroxisomas.	Ser Serina.
PR Peso renal.	SHR Rata espontáneamente hipertensa.
P/V Relación peso/volumen.	SHR-SP SHR con tendencia a infarto cerebral.
PVDF Fluoruro de polivinilideno.	SNC Sistema nervioso central.
PVI Peso de ventrículo izquierdo.	SOD Superóxido dismutasa.
Quer Quercetina.	SQ 29.548 Antagonista del receptor de tromboxano/endoperóxido.
Rac-1 Proteína G de bajo peso molecular Rac 1.	TBARs Substancias reactivas del ácido tiobarbitúrico.
RLU Unidades relativas de luminiscencia.	TBS-T Tampón Tris salino tamponado al 0.1% de Tween 20.
ROS Especies reactivas de oxígeno.	TNF-α Factor de necrosis tumoral α .
r.p.m. Revoluciones por minuto.	TP Receptor de tromboxano/endoperóxido.
RS Reticulo sarcoplásmico.	tPA Activador del plasminógeno tisular.
SBP Presión sistólica.	

Abreviaturas.

Tre

Treonina.

TRIS

Tris (hidroximetil) aminometano.

TXA₂

Tromboxano A₂.

TXB₂

Tromboxano B₂.

U

Unidades.

UDP

Uridín difosfato.

VCAM-1

Molécula de adhesión de las células vasculares 1.

VEGF

Factor de crecimiento del endotelio vascular.

WKY

Wistar-Kyoto.

XO

Xantina oxidasa.

Índice.

Introducción.....	1
1. La disfunción endotelial en la hipertensión.....	3
1.1 Fisiología del endotelio.....	3
1.2 Funciones del endotelio.....	4
1.21 Como superficie permeable: transporte a través del endotelio.....	4
1.211 Transporte de glucosa.....	4
1.212 Transporte de aminoácidos.....	5
1.213 Caveolas.....	5
1.214 Uniones estrechas.....	5
1.22 Sobre el tono vascular.....	6
1.221 Factores vasodilatadores dependientes de endotelio.....	6
1.2211 El óxido nítrico.....	7
1.2212 Prostaciclina.....	16
1.2213 Factor hiperpolarizante derivado de endotelio.....	16
1.222 Factores contráctiles derivados de endotelio.....	18
1.2221 Endotelina-1.....	18
1.2222 Tromboxano A ₂ y Prostaglandina H ₂	19
1.23 Sobre la hemostasia y coagulación.....	22
1.24 Sobre la angiogénesis.....	23
1.3 La disfunción endotelial.....	23

1.31 Definición y concepto.....	23
1.32 Enfermedad cardiovascular y disfunción endotelial.....	26
1.33 Fisiopatología de la disfunción endotelial.....	27
1.331 Óxido nítrico.....	28
1.332 Dimetilarginina asimétrica.....	30
1.333 Metabolitos del ácido araquidónico.....	31
1.334 El estrés oxidativo.....	32
1.3341 Papel de NAD(P)H oxidasa en el estrés oxidativo vascular.....	37
<i>Estructura función y localización.....</i>	<i>37</i>
<i>Actividad mediada por Ang II.....</i>	<i>38</i>
<i>Efectos in vitro de la activación de la enzima.....</i>	<i>41</i>
<i>Efectos in vivo de la actividad de NAD(P)H oxidasa.....</i>	<i>42</i>
1.3342 Papel de la xantina oxidasa.....	43
1.3343 Papel del desacoplamiento de la eNOS.....	43
1.3344 Papel de las enzimas antioxidantes.....	44
1.335 Hiperhomocisteinemia.....	45
1.34 Valor pronóstico de la disfunción endotelial.....	46
1.35 Tratamiento de la disfunción endotelial.....	47
2. Modelo animal de hipertensión genética. Las ratas	
espontáneamente hipertensas o SHR.....	49
2.1 Volumen de líquido circulante.....	50
2.2 Sistema nervioso.....	50

2.3 Estructura vascular.....	51
2.4 Sistema renina-angiotensina.....	52
2.5 Función endotelial.....	54
3. Flavonoides.....	57
3.1 Generalidades.....	57
3.2 Proceso ADME de flavonoides y quercetina.....	62
3.21 Absorción.....	62
3.22 Metabolismo.....	63
3.23 Distribución.....	64
3.24 Excreción.....	66
3.3 Efectos vasculares <i>in vitro</i> de quercetina.....	67
3.31 Efecto directo sobre el tono del músculo liso y la proliferación de fibras musculares.....	67
3.32 Efectos sobre el óxido nítrico.....	68
3.33 Efectos antioxidantes.....	70
3.34 Efectos sobre el factor hiperpolarizante derivado de endotelio.....	71
3.35 Efectos sobre endotelina-1.....	71
3.36 Efectos sobre la apoptosis y la proliferación de células endoteliales.	72
3.4 Efectos <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i> de quercetina.....	73
3.41 Sobre la función endotelial en la hipertensión.....	73
3.42 Sobre la oxidación de LDL y aterosclerosis.....	75

3.43 Sobre las enfermedades cardiovasculares.....	76
3.44 Sobre el infarto cerebral.....	77
Justificación y objetivos del trabajo.....	79
Material y métodos.....	85
4. Efectos preventivos de quercetina sobre la hipertensión	
genética.....	87
4.1 Animales de experimentación.....	87
4.2 Medida de la presión sanguínea.....	88
4.3 Parámetros morfológicos.....	88
4.4 Estudios de reactividad vascular.....	89
Protocolos experimentales.....	90
4.41.....	90
4.42.....	90
4.43.....	91
4.5 Medida de la actividad vascular de la Óxido Nítrico Sintasa (NOS)..	91
4.6 Determinación del nivel de peroxidación lipídica.....	92
4.7 Determinación de la producción vascular de Tromboxano B ₂	
(TXB ₂).....	92
4.8 Determinación de la producción vascular de O ₂ ⁻	93
4.9 Expresión vascular de eNOS, caveolina-1 y p47 ^{phox} mediante western	
blot.....	93

4.10. Análisis histológico cardiaco mediante tricrómico de Masson.....	96
4.11. Análisis estadístico.....	97
5. Efecto de quercetina e isorhamnetina sobre la disfunción endotelial inducida por Ang II <i>in vitro</i>.....	98
5.1 Animales de experimentación.....	98
5.2 Pruebas de reactividad vascular.....	99
Protocolos experimentales.....	99
5.21.....	99
5.22.....	99
5.23.....	99
5.24.....	99
5.25.....	100
5.3 Expresión vascular de p47 ^{phox}	100
5.4 Detección <i>in situ</i> de la producción de O ₂ ⁻	102
5.5 Inmunohistoquímica.....	103
5.6 Reactivos.....	103
5.7 Análisis estadístico.....	104
Resultados.....	105
6. Efectos preventivos de quercetina sobre la hipertensión genética.....	107

6.1 Efectos de quercetina sobre la presión arterial y frecuencia cardiaca.....	107
6.2 Efectos de quercetina sobre el peso y los índices corporales.....	109
6.3 Efectos de quercetina en las respuestas vasodilatadoras de la aorta torácica.....	110
6.4 Efectos de quercetina en la vasoconstricción dependiente de endotelio en aorta torácica.....	111
6.5 Efecto de quercetina sobre la producción de TXB ₂ en aorta torácica.....	112
6.6 Efectos de quercetina en la actividad vascular de eNOS, en la expresión proteica de eNOS y caveolina-1.....	113
6.7 Efecto de quercetina en la producción vascular de O ₂ ⁻	114
6.8 Efecto de quercetina en la expresión vascular de p47 ^{phox}	116
6.9 Efectos de quercetina en la morfología cardiaca asociada a hipertensión.....	117
7. Efecto de quercetina e isorhamnetina en la disfunción endotelial inducida por angiotensina II <i>in vitro</i>	119
7.1 Disfunción endotelial.....	119
7.2 Localización de la producción <i>in situ</i> de O ₂ ⁻	125
7.3 Expresión y localización de la proteína p47 ^{phox}	127
7.4 Papel de los receptores de PPAR-γ.....	130
Discusión	131

8. Efectos preventivos de quercetina sobre la hipertensión genética.....	133
9. Efecto de quercetina e isorhamnetina sobre la disfunción endotelial inducida por angiotensina II <i>in vitro</i>.....	140
Conclusiones.....	145
Bibliografía.....	149

Índice de Figuras y Tablas.

Figuras.

Figura 1. Estructura de la eNOS.....	9
Figura 2. Mecanismo de señalización de la eNOS.....	13
Figura 3. Mecanismo de producción de NO en la célula endotelial y mecanismo de acción de éste en las CMLV mediado por GCs.....	15
Figura 4. Representación esquemática de los mecanismos que desembocan en relajación o contracción de las células del músculo liso vascular.....	21
Figura 5. Mecanismos causantes de la disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares.....	25
Figura 6. Esquema de la producción de ROS y sus interacciones con el NO.....	34
Figura 7. Mecanismos de señalización redox dependientes en las CMLV y sus efectos fisiológicos mediados por ROS, tendentes a producir y mantener la hipertensión.....	36
Figura 8. Mecanismo de activación y acción de la NAD(P)H oxidasa vascular mediante angiotensina II.....	40
Figura 9. Desacoplamiento de la eNOS.....	44
Figura 10. Estructura general de los flavonoides y numeración de sus substituyentes.....	57
Figura 11. Principales grupos de flavonoides y sus representantes más significativos.....	59

Figura 12. Esquema de las actividades biológicas de los flavonoides y sus principales efectos saludables.....	61
Figura 13 A. Efectos de quercetina sobre la presión arterial sistólica (PAS) en los diferentes grupos.....	108
Figura 13 B. Medida directa de la presión arterial media (PAM) en los diferentes grupos.....	108
Figura 13 C. Medida de la frecuencia cardiaca (FC) en los diferentes grupos.....	108
Figura 14 A. Relajaciones dependientes de endotelio inducidas por ACh en aortas de cada grupo.....	111
Figura 14 B. Relajaciones independientes de endotelio inducidas por NPS en aortas de cada grupo.....	111
Figura 14 C. Efectos de apocinina añadida al baño en la relajación inducida por ACh en aortas de cada grupo.....	111
Figura 15. Contracciones dependientes de endotelio inducidas por ACh en aortas de cada grupo.....	112
Figura 16. Niveles de TXB ₂ medidos en medio de incubación de anillos aórticos de los diferentes grupos.....	113
Figura 17 A. Actividad eNOS determinada en homogenados aórticos de los diferentes grupos.....	114
Figura 17 B. Western blots de las proteínas eNOS y caveolina-1 en aorta de los diferentes grupos.....	114
Figura 18. Liberación de O ₂ ⁻ en anillos aórticos intactos de cada grupo.....	115
Figura 19 A. Western blots de proteína p47 ^{phox} en fracción citosólica de aorta de los diferentes grupos.....	116

Figura 19 B. Western blots de proteína p47 ^{phox} en fracción particulada de aorta de los diferentes grupos.....	116
Figura 20. Microfotografías de la estructura y composición cardiaca en los diferentes grupos.....	118
Figura 21. . Evolución de la disfunción endotelial inducida por Ang II. Efectos de la incubación durante 2, 4, 6 u 8 horas con o sin Ang II (100 nM) en la relajación dependiente de endotelio inducida por ACh en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina.....	120
Figura 22 A. Inhibición de la disfunción endotelial inducida por Ang II debido al antagonismo de receptores AT-1. Anillos incubados con Losartán (10 µM) durante una hora.....	122
Figura 22 B. Inhibición de la disfunción inducida por Ang II debido a la captación de aniones superóxido. Anillos incubados con polietilenglicol superóxido dismutasa (PEG-SOD, 100 U/ml) durante una hora.....	122
Figura 22 C. Inhibición de la disfunción inducida por Ang II a la disminución de aniones superóxido. Anillos incubados con apocinina (100 µM) durante una hora.....	122
Figura 23. Prevención de la disfunción endotelial inducida por incubación durante 6 horas con angiotensina II, mediante quercetina (1 o 10 µM) e isorhamnetina (1 o 10 µM).....	123
Figura 24. Relajación independiente de endotelio a NPS, tras incubación con Ang II (1 µM), quercetina (10 µM) o isorhamnetina (10 µM).....	125
Figura 25 A. Microfotografías mostrando el efecto de quercetina e isorhamnetina en la sobreproducción de O ₂ ⁻ inducida por Ang II, mediante DHE y DAPI.....	126
Figura 25 B. Efecto de quercetina e isorhamnetina en la sobreproducción de O ₂ ⁻ inducida por Ang II medido mediante la relación fluorescencia de etidio/fluorescencia DAPI en anillos aórticos.....	127

Figura 26. Expresión de proteína p47^{phox} en fracción citosólica de aorta. Las aortas se incubaron durante 6 horas en ausencia o presencia de Ang II (1 μ M), quercetina (10 μ M) o isorhamnetina (10 μ M).....128

Figura 27. Localización inmunohistoquímica de p47^{phox}. Las aortas se incubaron durante 6 horas en ausencia o presencia de angiotensina II (1 μ M), quercetina (10 μ M) o isorhamnetina (10 μ M).....129

Figura 28. Efecto del antagonista de receptores PPAR- γ GW9662 (1 μ M) sobre la restauración de la función endotelial inducida por quercetina e isorhamnetina.....130

Figura 29. Esquema celular de disfunción endotelial en SHR.....139

Figura 30. Esquema celular de disfunción endotelial inducida por Ang II y efecto sobre ella de quercetina e isorhamnetina.....144

Tablas.

Tabla 1. Peso corporal e índices cardiacos y renales en cada grupo.....109

Tabla 2. Respuestas contráctiles a fenilefrina (1 μ M) y valores de pD₂ y E_{max} para relajaciones inducidas por ACh en anillos aórticos incubados con Ang II (1 μ M) durante 0, 2, 4, 6 u 8 h.....121

Tabla 3. Respuestas contráctiles a fenilefrina (1 μ M) y valores de pD₂ y E_{max} para las relajaciones inducidas por ACh en anillos aórticos incubados con Ang II (1 μ M) durante 6 h en presencia de vehículo DMSO, losartán, quercetina o isorhamnetina.....124

Introducción.

Introducción.

1. La Disfunción endotelial en la hipertensión.

1.1 Fisiología del endotelio.

El endotelio es un tejido de origen mesodérmico constituido por una única capa de células planas que cubren toda la superficie interna del sistema vascular.

En los adultos el endotelio lo forman aproximadamente diez trillones de células endoteliales, con lo que se puede considerar que forman una especie de órgano de un 1 kg de peso. La integridad estructural y funcional de las células endoteliales es importante en el mantenimiento de la pared de los vasos y de la función circulatoria. El endotelio de ningún modo es un tejido inerte. Como superficie límite entre dos medios muy distintos, el endotelio es semipermeable y regula la transferencia de pequeñas y grandes moléculas de la sangre a los tejidos, y en sentido inverso. Las células endoteliales son dinámicas y tienen funciones tanto metabólicas como sintéticas. Además, ejercen acciones autocrinas, paracrinas y endocrinas e influyen en las células del músculo liso vascular (CMLV), plaquetas y leucocitos periféricos.

El endotelio está constituido por células altamente especializadas y bastante heterogéneas, ya que su estructura varía en función del lecho vascular considerado. Además, no sólo expresan diferentes antígenos de superficie y receptores sino que pueden generar distintas respuestas al mismo estímulo (Gallagher y Sumpio, 1997). Incluso células de la misma parte de la vasculatura pueden tener respuestas variadas. Es importante señalar que las células endoteliales cultivadas pueden no reflejar la respuesta encontrada en las mismas células *in vivo*, y en particular, las líneas inmortales celulares endoteliales empleadas en muchos estudios de laboratorio, ya que tienen alterada la expresión de algunas proteínas clave comparada con las células estudiadas *in vivo* (Galley *et al.*, 2000).

Las células endoteliales ejercen numerosas funciones biológicas, entre las que destacan el mantenimiento de una interfase sangre-tejido no trombogénica, la regulación del tono vascular, del flujo sanguíneo tisular y de la presión arterial. El endotelio es indispensable para la homeostasis corporal y en muchos procesos patológicos, incluyendo la aterosclerosis, la hipertensión, la hipertensión pulmonar, la sepsis y los síndromes inflamatorios, se ha descrito una respuesta alterada de las células endoteliales. Estas enfermedades están relacionadas con lo que se denomina daño, activación o disfunción endotelial.

1.2 Funciones del endotelio.

1.21 Como superficie permeable: transporte a través del endotelio.

El endotelio es una barrera permeable que permite el paso de moléculas y células de la sangre hacia el intersticio y células subyacentes. Existen mecanismos específicos de transporte que facilitan el paso de macromoléculas del torrente sanguíneo a través de las células endoteliales hacia el espacio subendotelial para cubrir las necesidades metabólicas de las células del tejido circundante (Mann *et al.*, 2003). Además, el transporte entre células endoteliales (uniones estrechas) actúa como una barrera selectiva a la salida de las moléculas de la circulación.

1.211 Transporte de glucosa.

Se conoce la existencia de 7 transportadores de glucosa de la familia de supergenes GLUT, pero sólo GLUT-1 y GLUT-4 se expresan en las células endoteliales, siendo GLUT-1 la isoforma más abundante. La regulación de la expresión de GLUT-4 es un proceso esencial en la regulación del transporte de glucosa y es particularmente importante en la diabetes y la hipoxemia. El principal tejido endotelial que expresa transportadores GLUT es la barrera hematoencefálica; aunque también se han detectado en otras células endoteliales

localizadas en el cordón umbilical, capilares adrenales, aorta, retina, corazón, placenta, ojo y testículos (Mann *et al.*, 2003).

1.212 Transporte de aminoácidos.

Existen múltiples sistemas de transporte para aminoácidos en las células endoteliales, pero el sistema transportador de aminoácidos catiónicos es quizá el más importante, puesto que se utiliza para el transporte de L-arginina, sustrato para la síntesis de óxido nítrico (NO). Numerosos estudios han mostrado que las citoquinas, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), pueden estimular el transporte de L-arginina en las células endoteliales, lo que supone un incremento de la producción de NO (Bogle *et al.*, 1995).

1.213 Caveolas.

Las caveolas son invaginaciones de la membrana celular responsables del transporte transcelular (transcitosis) en células endoteliales (Minshall *et al.*, 2003). La transcitosis vía caveola es el principal medio de transporte de albúmina a través del endotelio. La caveolina-1 es una proteína que está insertada en la superficie citoplasmática de la membrana que regula la internalización caveolar. En el endotelio, caveolina-1 regula la vía del NO al unirse a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), manteniéndola inactiva (Bucci *et al.*, 2000). Además, la caveolina-1 también está implicada en las vías de señalización del calcio en las células endoteliales (Fujimoto, 1993).

1.214 Uniones estrechas.

Son uniones intercelulares importantes para el mantenimiento de la integridad estructural del endotelio y para el transporte paracelular. Aunque la permeabilidad vascular depende de 2 vías endoteliales, la vía paracelular (uniones estrechas) y la vía transcelular (caveolas), los edemas se desarrollan principalmente como consecuencia de la disfunción de estas uniones intercelulares. Un claro ejemplo es la barrera hemato-encefálica, hecha de células endoteliales altamente

especializadas cuyas uniones estrechas protegen el sistema nervioso central. Las uniones entre células pueden funcionar como una puerta que permita el paso selectivo de moléculas, o como una barrera que lo impida totalmente (Sawada *et al.*, 2003). Algunos virus y bacterias patógenas afectan la función de estas uniones entre células, lo que conduce a enfermedades del sistema vascular (como edemas), del tracto gastrointestinal (diarreas) y del tracto respiratorio (síndrome del distrés respiratorio agudo).

1.22 Sobre el tono vascular.

El endotelio es considerado un tejido esencialmente paracrino en relación al tono vascular, ya que tiene la capacidad de sintetizar mediadores biológicos que modulan el estado de contracción y/o relajación del músculo liso adyacente. El endotelio sintetiza tanto agentes vasodilatadores como agentes vasoconstrictores (Vanhoutte, 1993; Vane *et al.*, 1990). Dentro de los primeros tenemos NO, prostaciclina (PGI₂) y factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF). El segundo grupo está formado por endotelina-1 (ET-1) y productos derivados de la vía de la ciclooxigenasa (COX) como aniones superóxido (O₂⁻), tromboxano A₂ (TXA₂) y prostaglandina H₂ (PGH₂).

1.221 Factores vasodilatadores derivados de endotelio.

En 1980, Furchgott y Zawadzki descubrieron que era necesaria la presencia de células endoteliales para que se produjese la vasodilatación en aortas aisladas de conejo al ser estimuladas con acetilcolina (ACh). Este hallazgo significó el punto de partida para el reconocimiento del endotelio como regulador del tono vascular. Estos autores propusieron que la activación del receptor muscarínico de las células endoteliales por ACh, de alguna forma activaba una serie de hechos secuenciales en los cuales el ácido araquidónico (AA) (o algún otro ácido graso no saturado) era liberado y oxidado (por la acción de la lipooxigenasa (LOX)), originando el producto responsable de la relajación de las CMLV. En 1981,

Furchgott aumentó la lista de factores vasoactivos (substancia P, bradikinina (Bk), adenín trifosfato (ATP) y el ionóforo de calcio A23187) que causaban relajación dependiente de endotelio en arterias aisladas. Posteriormente, se descubrió que incluso agentes vasoconstrictores como la noradrenalina y serotonina (Cocks y Angus, 1983) podían estimular a las células endoteliales y liberar la molécula con capacidad vasodilatadora, a la que al desconocerse su naturaleza química se le denominó factor relajante derivado de endotelio (EDRF) (Angus y Cocks, 1989; Cherry *et al.*, 1982; Furchgott, 1981). El hecho en común para todos los agentes que estimulaban la liberación de EDRF parecía ser un incremento de los niveles de calcio en las células endoteliales.

La relajación del músculo liso vascular en respuesta a una señal iniciada por la estimulación del endotelio, es conocida hoy en día como “relajación dependiente de endotelio” y está relacionada con la liberación de al menos un EDRF. Los tres factores vasodilatadores producidos por el endotelio son el NO, la PGI₂ y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), siendo el principal el NO, ya que es el único que ejerce un efecto tónico vasodilatador sobre la pared vascular.

1.2211 El óxido nítrico.

El NO es una pequeña molécula gaseosa que actúa como mediador en numerosos procesos biológicos. Se produce a partir del grupo guanidino de la L-arginina, siendo el otro producto de esta reacción biológica la L-citrulina. La óxido nítrico sintetasa (NOS) es la enzima que cataliza esta reacción. Es una hemoproteína que, además del sustrato, requiere oxígeno molecular (Leone *et al.*, 1991), la presencia de calmodulina (Cam) y cuatro cofactores: nicotinamín adenín dinucleótido fosfato (forma reducida) (NADPH), flavín adenín dinucleótido (forma oxidada) (FAD), flavín mononucleótido (forma oxidada) (FMN) y tetrahidrobiopterina (BH₄) (Stuehr, 1997).

En el hombre se han identificado tres isoformas de esta enzima: NOS inducible (iNOS o NOS-III), NOS neuronal (nNOS o NOS-I) y NOS endotelial

(eNOS o NOS-II) (Forstermann y Kleinert, 1995; Griffith y Stuehr, 1995). Las nNOS y eNOS están expresadas constitutivamente; la iNOS requiere, en la mayoría de los casos, la presencia de estímulos extracelulares específicos para su expresión y, en contraste con nNOS y eNOS, no necesita un aumento de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) para ser biológicamente activa. Las enzimas constitutivas generan pequeñas cantidades de NO, mientras que la actividad iNOS es aproximadamente 1000 veces mayor. El NO sintetizado por la vía constitutiva participa en procesos fisiológicos o reguladores, mientras que el NO formado por la vía inducible participa en procesos inmunes, inflamatorios y de lesión celular.

Para que la NOS sea activa, se ha de producir el acoplamiento inverso entre dos monómeros (Figura 1). Cada monómero a su vez presenta dos dominios, uno con actividad oxigenasa y otro con actividad reductasa, que actúan de manera independiente. La BH_4 favorece la formación de este dímero activo a partir de los monómeros de proteína inactiva. El dímero activo contiene lugares de unión para la L-arginina y la BH_4 , y el grupo hemo en la porción N-terminal (dominio con actividad oxigenasa). En las NOS constitutivas hay además lugares para la fosforilación por proteínas kinasas (PK) que regulan su actividad. Existe así mismo un lugar de unión a la calmodulina en la parte media, y unas secuencias de unión al FMN, FAD, y NADPH en la porción C-terminal (dominio con actividad reductasa) (Stuehr, 1997).

Dímero de eNOS acoplada (condiciones fisiológicas)

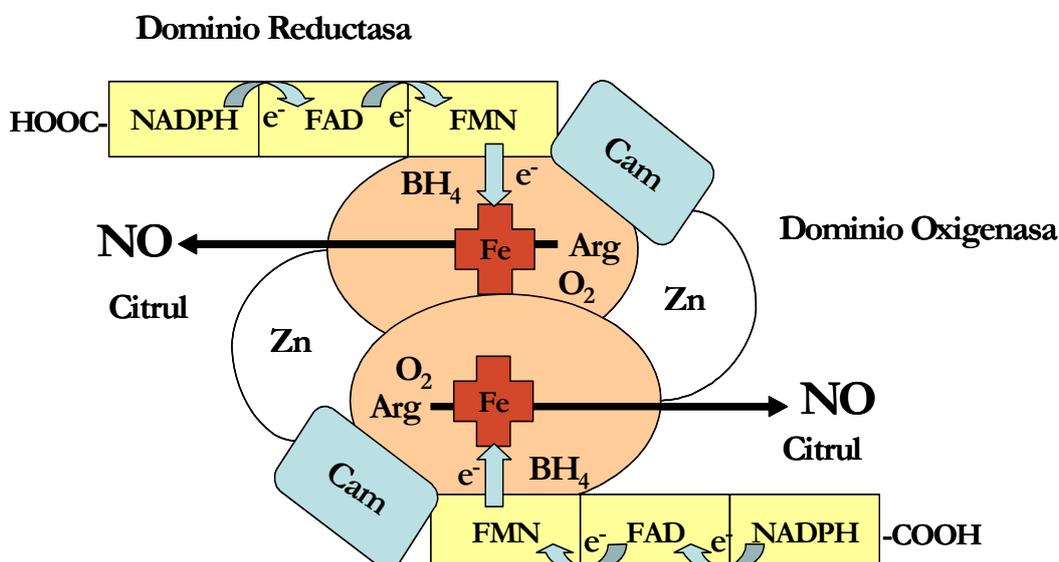


Figura 1. Estructura de la eNOS mostrando el acoplamiento entre dos monómeros de la enzima para formar el dímero activo. El flujo de electrones comienza en la porción C-terminal con actividad reductasa, desde el nicotinamín adenín dinucleótido fosfato (NADPH), hacia el flavín adenín dinucleótido (FAD), y el flavín mononucleótido (FMN), que lleva el electrón (e^-) al hierro del grupo Hemo (Fe), en el dominio oxigenasa. Cerca del centro del péptido, se encuentra una secuencia de unión a la calmodulina (Cam), una vez activada por calcio, que controla el flujo de electrones. Los iones de zinc (Zn) unidos a la enzima son necesarios para la formación del dímero y su estabilización. La tetrahidrobiopterina (BH₄) parece ser esencial para el proceso de donación de electrones del grupo hemo a la L-arginina (Arg) y el O₂ para formar óxido nítrico (NO) y L-citrulina (Citru) en condiciones fisiológicas normales.

Existen diferencias en la localización celular de las isoformas de la NOS. Así, la nNOS y la iNOS son enzimas solubles de localización citosólica, mientras que la eNOS está unida a membrana. Sowa *et al.* (1999), utilizando células transfectadas con eNOS, demostraron que cerca del 50% del total de eNOS está localizado en el interior de la membrana citoplasmática y el 35% en la del aparato de Golgi.

La eNOS sufre modificaciones post-traduccionales en el retículo endoplasmático por adición de restos de miristato, y posteriormente en el aparato de Golgi mediante palmitoilación de residuos de cisteína, que favorecen su asociación a microdominios especializados de la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos, llamados caveolas. Estas estructuras membranales están implicadas en los procesos de transcitosis de macromoléculas, como ya se comentó (apartado 1.213). Recientemente, se ha descrito su influencia en la regulación de la actividad de la eNOS.

Las caveolas acogen receptores para muchos de los estímulos de la eNOS, además del transportador de L-arginina, la ATPasa dependiente de Ca^{2+} y canales de Ca^{2+} dependientes de inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3). También poseen proteínas que actúan como moduladores alostéricos de la eNOS, como la caveolina-1, que es una proteína caveolar asociada a la eNOS. Estudios *in vitro* con células endoteliales revelan que los dominios N- y C- terminales de la caveolina interactúan directamente con el dominio oxigenasa de la eNOS, inhibiendo su actividad catalítica (García-Cardena *et al.*, 1997; Ju *et al.*, 1997). Esta inhibición se revierte mediante el aumento del complejo Ca^{2+} /calmodulina, al producirse una mayor unión de éste a la enzima, y mediante la fosforilación inducida por proteínas quinasas.

La actividad de las isoformas constitutivas está controlada por el complejo Ca^{2+} /calmodulina intracelular, disminuyendo la actividad de éstas en presencia de quelantes de calcio (Moncada y Palmer, 1990) y antagonistas de calmodulina (Busse y Mulsch, 1990). Este control se ejerce de dos maneras:

a) La mayoría de los agentes con efecto dependiente de endotelio (ACh, Bk, Angiotensina II (Ang II), substancia P, ATP, estradiol) aumentan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; este Ca^{2+} se une a calmodulina, y el consiguiente aumento de Ca^{2+} /calmodulina rompe la interacción entre eNOS y caveolina al unirse a la enzima, provocando un aumento de la actividad enzimática (Michel *et al.*, 1997).

Este incremento de Ca^{2+} que se observa cuando se estimula la célula endotelial con un agonista o por un estímulo mecánico se produce en dos fases.

a) En la primera, se registra un incremento de Ca^{2+} intracelular libre rápido, en pico, que viene seguida de una fase de aumento prolongado, en meseta. El primer aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se debe a la liberación del ión desde el retículo sarcoplásmico (RS) (Jaffe *et al.*, 1987; Buchan y Martín, 1991), y la fase de meseta se debe a la entrada constante del ión desde el medio extracelular (Dolor *et al.*, 1992). El Ca^{2+} liberado desde el RS condiciona la apertura de distintos canales iónicos. Inicialmente se produce una despolarización transitoria de la membrana por salida de Cl^- (Song y Davis, 1994), que viene seguida de una hiperpolarización por la salida de K^+ . Estas dos corrientes iónicas facilitan a su vez la apertura de canales catiónicos no específicos que permiten la entrada constante de Ca^{2+} al interior de la célula (Mendelowitz *et al.*, 1992; Bregestovski *et al.*, 1988; Lansman *et al.*, 1987). Puede así considerarse que el Ca^{2+} liberado inicialmente desde el RS sería el mensajero intracelular que regularía la entrada de este ión desde el exterior. Por tanto, estos dos procesos, la elevación citosólica inicial de Ca^{2+} causada por la salida masiva del ión desde el RS, y su entrada constante desde el medio extracelular, son esenciales para la síntesis de NO.

b) La activación de la eNOS por fuerzas de cizallamiento (principal estímulo fisiológico que controla la síntesis de NO endotelial en los vasos de resistencia) y por contracción isométrica de las arterias, se produce en ausencia de variaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fleming *et al.*, 1999; Ayajiki *et al.*, 1996). Este proceso está regulado por canales de K^+ y se previene por inhibición de tirosín kinasa, lo que indica que se requiere fosforilación de residuos de tirosina en la eNOS (Ayajiki *et al.*, 1996). Sin embargo, la dependencia de fosforilación de tirosina no se limita a mecanismos independientes de Ca^{2+} puesto que también es necesaria para la activación de la eNOS por agonistas dependientes de Ca^{2+} , como el estradiol y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Chen *et al.*, 1999a ; Papapetropoulos *et al.*, 1997).

Además de la regulación por calcio y por la fosforilación de residuos de tirosina, múltiples proteínas kinasas modifican la actividad de la eNOS mediante la fosforilación de la serina (Ser) en posición 1177. Entre estas kinasas se incluyen la

proteín kinasa activada por AMP, protenín kinasa C (PKC), proteín kinasa dependiente de AMPc (PKA) y serín/treonín kinasa Akt, también conocida por proteín kinasa B (PKB). Los factores que activan la eNOS a través de la fosforilación de la Ser 1177 mediada por PKB son el estradiol (Hisamoto *et al.*, 2001), el VEGF (Fulton *et al.*, 1999) y el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (Michell *et al.*, 1999). Para ello actúan como intermediarias la proteín kinasa Akt, y la proteína de choque calórico 90 (HSP90). Por el contrario, la fosforilación de la treonina (Tre) en posición 497 atenúa la actividad eNOS (Chen *et al.*, 1999c). Estudios recientes demuestran que las señales a través de la PKA conducen a la fosforilación de Ser 1177 y la defosforilación de Tre 497, lo que aumenta su actividad enzimática, mientras que la PKC promueve la defosforilación de la Ser 1177 y la fosforilación en la Tre 497 reduciéndose la actividad eNOS.

En definitiva observamos cómo la actividad eNOS está regulada por una compleja combinación de interacciones entre proteínas, y cascadas de transducción de señales que implican movilización de calcio y fosforilación de diversos residuos aminoacídicos (Figura 2).

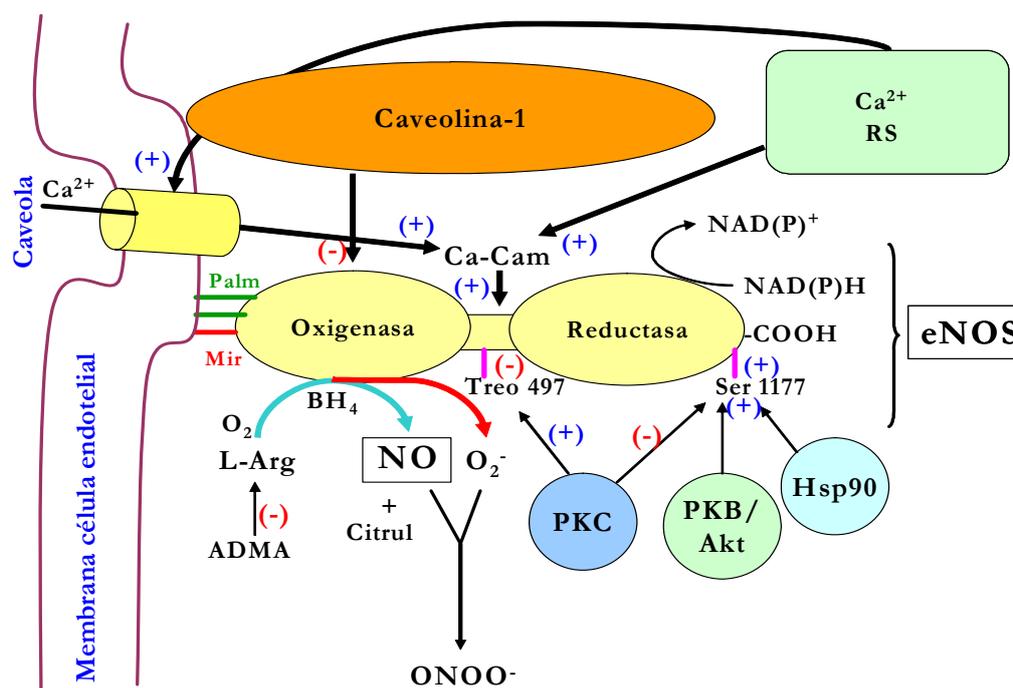


Figura 2. Mecanismos de señalización en la eNOS. La eNOS está formada por dos dominios proteicos, uno con actividad oxigenasa y otro reductasa, conectados por una unión flexible. La transferencia electrónica (ver Figura 1) es controlada por la unión dependiente de calcio de la calmodulina a un lugar específico en la unión flexible. El dominio oxigenasa es el centro catalítico donde se forma el óxido nítrico (NO) más citrulina (Citrul), al unir la L-arginina (L-Arg), grupo hemo, y tetrahidrobiopterina (BH_4) con O_2 . Para que se dé la producción óptima de NO, se requiere: a) La localización de la eNOS en la caveola (microinvaginaciones de la membrana plasmática). La eNOS debe sufrir una miristoilación post-transduccional en el retículo endoplasmático, que la dirige al aparato de golgi donde sufre dos palmitoilaciones para anclarse finalmente en la caveola. b) La caveolina-1, principal proteína de unión en la caveola, interacciona con la eNOS inhibiéndola. Para activar la eNOS, debe romperse esta interacción. c) La calmodulina (Cam) es un activador alostérico esencial de la eNOS. La Cam, que es activada por calcio proveniente del exterior celular o del retículo sarcoplásmico (RS), que estimula a su vez la entrada de calcio extracelular, al unirse a su lugar de unión específico entre los dominios de la enzima, aumenta la transferencia electrónica de un dominio a otro. d) La actividad de la eNOS está regulada por la fosforilación del residuo de serina 1177 (Ser 1177). Para esto se necesita la tirosín kinasa Akt y la proteína de choque calórico 90 (Hsp90). La Hsp90 actúa como paso intermedio entre la eNOS y PKB/Akt. La fosforilación del residuo de Treonina 497 (Tre 497), por ejemplo por proteína kinasa C (PKC) inactiva a la enzima. e) La unión del sustrato L-Arg al centro catalítico puede ser inhibida por el antagonista competitivo endógeno dimetil arginina asimétrica (ADMA). f) La tetrahidrobiopterina es un cofactor esencial. Su disminución puede ocasionar el desacoplamiento de la enzima (Figura 5), y así la producción de O_2^- en lugar de NO. g) Aunque el NO se produzca adecuadamente, puede ser rápidamente inactivado por el O_2^- , sobre todo en situaciones de alto estrés oxidativo, formando peroxinitrito ($ONOO^-$), potente agente prooxidante. (-):Inhibición. (+):Activación.

A diferencia de lo que ocurre con las isoenzimas constitutivas de la NOS, la actividad iNOS es independiente de $[Ca^{2+}]_i$. Aunque la iNOS contiene un lugar de unión para el complejo Ca^{2+} /calmodulina, la afinidad tan elevada de este lugar por su ligando hace que la iNOS se active incluso cuando existen valores muy bajos de $[Ca^{2+}]_i$, como en condiciones de reposo.

Los estudios realizados hasta el momento sugieren que el NO sintetizado en una célula determinada no ejerce su respuesta biológica principal en las células de origen, sino en células diana cercanas. Por lo tanto, de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas, el NO sintetizado en las células endoteliales vasculares, difunde rápidamente fuera de éstas hasta el interior de las CMLV adyacentes. Una vez en el citoplasma de éstas, provoca la activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs), aumentando los niveles intracelulares de guanosín monofosfato cíclico (cGMP) sintetizado por ella, y por consiguiente conduciendo a la vasodilatación (Moncada y Higgs, 1991; Martín *et al.*, 1988).

El cGMP formado actúa ocasionando una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ (Johansson y Hayness, 1992; Nakashima *et al.*, 1986). El cGMP provoca la activación de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} del RS (Cohen *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 1998) y de la membrana celular (Barnes y Liu, 1995), la activación de la ATPasa Na^+/K^+ (Tamaoki *et al.*, 1997), el cierre de canales de Ca^{2+} tipo L (Ruiz-Velasco *et al.*, 1998) y la inhibición de la liberación de Ca^{2+} desde el RS inducida por IP_3 (Schlossmann *et al.*, 2000; Ji *et al.*, 1998). Además de todos estos mecanismos que reducen la $[Ca^{2+}]_i$, el cGMP es capaz de unirse a los canales de K^+ y producir su activación, y puede también inhibir la fosfodiesterasa de AMPc, prolongando la vida biológica de este compuesto (Lincoln, 1989). También se ha descrito la disminución de la sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles tras la activación de la vía del cGMP (Karaki *et al.*, 1997). Todos estos efectos del cGMP producen la relajación de las CMLV, y por tanto la vasodilatación (Figura 3).

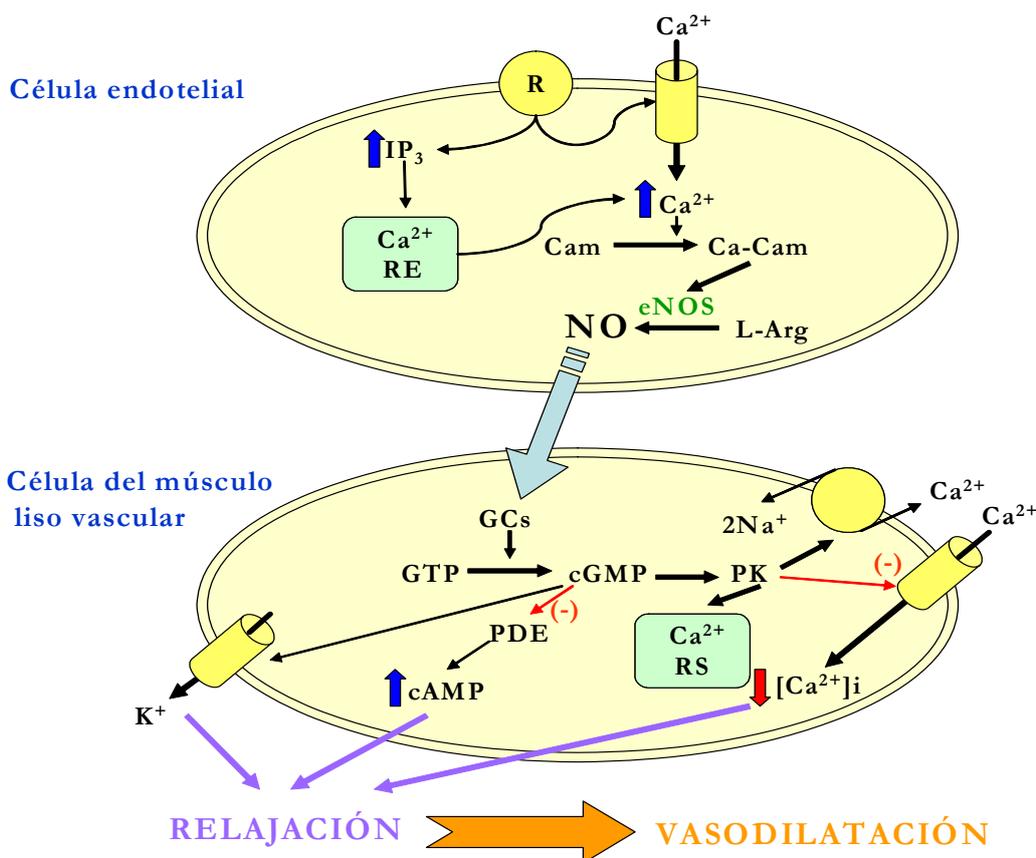


Figura 3. Mecanismo de producción de NO en la célula endotelial y mecanismo de acción de éste en las células del músculo liso vascular (CMLV) mediado por guanilato ciclasa. La activación de receptores endoteliales (como por acetilcolina, bradikina, substancia p...) produce un aumento en la entrada de calcio (Ca^{2+}) por canales específicos, lo que se traduce en un incremento de la concentración de inositol trifosfato (IP_3). El IP_3 causa la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático (RE). Este aumento intracelular de Ca^{2+} activa a la Calmodulina (Cam), que a su vez activa a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), que a partir de L-arginina (L-Arg) produce óxido nítrico (NO). El NO sale por difusión pasiva de la célula endotelial y entra de igual forma en célula del músculo liso vascular (CMLV), donde activa a la guanilato ciclasa soluble (GCs). Se forma así guanosín monofosfato cíclico (cGMP) a partir de guanosín trifosfato (GTP). El cGMP puede disminuir la actividad de fosfodiesterasas (PDE), con lo que aumenta la concentración de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) al no ser degradado por éstas. El cGMP puede activar diversas proteínas quinasas (PK), lo que causa la disminución de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), debido a la inhibición de su entrada por canales tipo L de Ca^{2+} , a su mayor salida mediante el intercambiador Na^+/Ca^{2+} y a su mayor acumulación en el retículo sarcoplásmico (RS). El cGMP también activa canales de K^+ estimulando su salida. Todos estos efectos del cGMP tendentes a reducir la $[Ca^{2+}]_i$, producen la relajación de la fibra muscular, y con ello, la vasodilatación.

(-) :Inhibición. \uparrow :Aumento: \downarrow :Disminución.

1.2212 Prostaciclina.

La PGI₂ fue el primer EDRF que se identificó. Se caracterizó en tiras de tejido aórtico a mediados de los años sesenta, como una sustancia capaz de inhibir la activación y la agregación plaquetaria y producir vasodilatación (Moncada *et al.*, 1976).

La PGI₂ se sintetiza fundamentalmente en las células endoteliales vasculares a partir del AA mediante la acción del complejo enzimático COX-PGI₂ sintetasa. También se sintetiza en CMLV y plaquetas, donde contribuye a regular el estado de agregación plaquetaria. Parte de la acción de la PGI₂ se debe a su unión a receptores específicos en la superficie de las CMLV que se encuentran acoplados a través de proteínas G a la adenilato ciclasa, lo que conduce a un aumento de los niveles intracelulares de cAMP (adenosín monofosfato cíclico) y a la consiguiente relajación del músculo liso (Vanhoutte, 1993; Furchgott y Vanhoutte, 1989; Hajjar *et al.*, 1982; Gorman *et al.*, 1977; Best *et al.*, 1977). Entre los factores que estimulan la síntesis y liberación de PGI₂ están la Ang II, la ACh o la Bk, así como productos derivados de las plaquetas como la serotonina y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

El NO y la PGI₂ actúan de forma sinérgica para producir tanto la relajación de las fibras de músculo liso vascular como para inhibir la agregación plaquetaria (Moncada y Vane, 1978). En arterias coronarias porcinas, la PGI₂ estimula la liberación e incrementa la actividad relajante del EDRF; sugiriéndose que la estimulación de esta vía del cAMP, en las CMLV, aumenta la sensibilidad al NO (Shimokawa *et al.*, 1988). Sin embargo, el NO inhibe la producción de PGI₂ en células endoteliales aórticas bovinas cultivadas (Doni *et al.*, 1988).

1.2213 Factor hiperpolarizante derivado de endotelio.

En diversos vasos sanguíneos, las relajaciones dependientes de endotelio pueden estar acompañadas por una hiperpolarización de las CMLV (Feletou y Vanhoutte, 1988; Taylor *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 1988; Bolton *et al.*, 1984). Estas hiperpolarizaciones y relajaciones dependientes de endotelio

pueden ser parcial o totalmente resistentes a inhibidores de COX y NOS (Nagao y Vanhoutte, 1992; Garland y McPherson, 1992), y pueden suceder sin un incremento de nucleótidos cíclicos en las CMLV (Mombouli *et al.*, 1992; Cowan y Cohen, 1991; Taylor *et al.*, 1988). Por lo tanto, la existencia de una vía adicional relacionada con la hiperpolarización del músculo liso se atribuyó a un factor endotelial no conocido denominado FHDE (McGuire *et al.*, 2001).

En general, la hiperpolarización del músculo liso produce vasodilatación por la disminución en la apertura de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes y de la concentración intracelular de fosfatidil inosoles, reduciendo así la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Nelson *et al.*, 1990). El EDHF está normalmente inhibido por el NO, de forma que cuando la síntesis de éste último está alterada por enfermedades cardiovasculares, la producción y/o función del EDHF debe estar incrementada (Nishikawa *et al.*, 2000; Bauersachs *et al.*, 1996). Sin embargo, hay también estudios que no confirman esta teoría en alteraciones patológicas como hipertensión y diabetes. El EDHF juega un papel más importante en pequeñas arterias de resistencia de animales (Woodman *et al.*, 2000; Hwa *et al.*, 1994; Zygmunt *et al.*, 1994) y humanos (Honing *et al.*, 2000; Urakami-Harasawa *et al.*, 1997) que en arterias de conducción y por lo tanto, modula la presión arterial sistémica.

La naturaleza química del EDHF aún no ha sido definitivamente establecida. Entre los posibles candidatos se encuentran los productos no-prostanoides derivados del metabolismo del AA, entre los que podemos citar productos de la lipooxigenasa (Hu y Kim, 1993; Kurachi *et al.*, 1989), o productos del citocromo P450, concretamente el ácido epoxieicosatrienoico (Campbell *et al.*, 1996; Cohen y Vanhoutte, 1995; Vanhoutte, 1993; Gebremedhin *et al.*, 1992). También se ha propuesto como EDHF un ligando endógeno de los receptores de cannabinoides, la anandamida (Randall y Kendall, 1998), a los iones K^+ (Edwards *et al.*, 1998) y al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Shimokawa y Matoba, 2004). Recientemente se ha identificado el péptido natriurético tipo C como FHDE, aunque su importancia es mayor que la de un factor hiperpolarizante puesto que existen evidencias de su

efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de leucocitos, la agregación plaquetaria y la proliferación de CMLV (Ahluwalia y Hobbs, 2005).

1.222 Factores contráctiles derivados de endotelio.

Los principales agentes vasoconstrictores producidos por el endotelio son la ET-1 y los metabolitos derivados del AA, como el TXA₂ y la PGH₂.

1.2221 Endotelina-1.

La endotelina (ET) es un péptido producido por las células endoteliales, con marcados efectos sobre el tono vascular. Existen 3 tipos de ET, pero las células endoteliales producen sólo ET-1 (Inoue, 1989). Sin embargo, los receptores de ET están distribuidos por todo el organismo y además de causar vasoconstricción, la ET tiene efectos pleiotrópicos en tejidos no vasculares. La ET-1 ejerce acciones vasoconstrictoras a través de la estimulación de los receptores ET_A de las CMLV y acciones vasodilatadoras a través de la estimulación del receptor ET_B en las células endoteliales. Sin embargo, los receptores ET_B también contribuyen a la vasoconstricción en algunos territorios vasculares (Gardiner *et al.*, 1994, Teerlink *et al.*, 1994). Además de estos efectos, la ET-1 promueve la proliferación de las células del endotelio, de las CMLV y de fibroblastos. Esto se traduce en cambios estructurales debido a su efecto en la pared vascular (Golfman *et al.*, 1993; Bobik *et al.*, 1990; Simonson *et al.*, 1989; Hirata *et al.*, 1988).

La producción de ET-1 por las células endoteliales está regulada en el proceso de síntesis del péptido, pero no en su liberación, ya que la célula endotelial no tiene gránulos de reserva donde la ET-1 sea almacenada y posteriormente liberada. Sin embargo, existen indicios de que la ET-1 preformada puede almacenarse en las células endoteliales, aunque probablemente no en gránulos. Los mecanismos de liberación de esta ET-1 almacenada no se conocen bien.

La expresión del gen de ET-1 se estimula por factores como adrenalina, Ang II, vasopresina, insulina, trombina, glucosa, citocinas, factores de crecimiento y estímulos físicos. Existe una implicación de la PKC Ca²⁺-dependiente en dicha

estimulación, inhibiéndose la expresión de la ET-1 en presencia de inhibidores de PKC y quelantes de calcio (Emori *et al.*, 1991). Otros factores que también disminuyen la expresión del gen de la ET-1 son el NO (Warner *et al.*, 1992; Boulanger y Luscher, 1990b), los péptidos natriuréticos (Emori *et al.*, 1993; Kohno *et al.*, 1992), que elevan el cGMP y disminuyen la actividad de PKC, y la heparina (Imai *et al.*, 1993; Yokokawa *et al.*, 1993). Por otra parte, el factor fisiológico que desempeña el papel más importante para la regulación de la producción y liberación de ET-1 es el cambio de flujo sanguíneo. El aumento de flujo sanguíneo promueve vasodilatación activando receptores de células endoteliales con liberación de NO y disminución en la producción y liberación de ET-1 (Kuchan y Frangos, 1993; Miller y Burnett, 1992).

1.2222 Tromboxano A₂ y prostaglandina H₂.

Otros factores vasoconstrictores derivados de endotelio son algunos metabolitos del AA como el TXA₂ o un endoperóxido cíclico inestable, la PGH₂, con el que comparte receptor. La COX cataliza la formación de endoperóxidos cíclicos tales como prostaglandina G₂ (PGG₂) y PGH₂ por oxigenación y ciclación del AA. La conversión de esta última en otros compuestos puede variar en los diferentes tejidos. En el endotelio vascular a partir de la PGH₂ se forma sobre todo PGI₂, que tiene actividad vasodilatadora además de antiagregante plaquetaria. En los sujetos hipertensos estos pasos metabólicos pueden estar alterados, existiendo un incremento en la producción de PGH₂, que tiene actividad vasoconstrictora, y que puede así mismo convertirse en otro compuesto vasoconstrictor, el TXA₂. Ambos, el TXA₂ y la PGH₂ ejercen su efecto al interaccionar con el receptor de tromboxano/endoperóxido (TP) situado en las CMLV.

La producción de metabolitos derivados de la COX se ha estudiado en numerosos modelos experimentales. En arterias de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y en animales diabéticos, se ha demostrado que la estimulación de receptores muscarínicos de la membrana endotelial con ACh, provoca un

incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, lo que tiene dos consecuencias. Primero, la actividad eNOS se incrementa y el NO formado difunde a las CMLV subyacentes, tal como se explicó (apartado 1.2212). Segundo, el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ también estimula la producción de O_2^- por fuentes aún no identificadas. Dependiendo de la cantidad de NO que reaccione con O_2^- (Rubaniyi y Vanhoutte, 1986), una mayor o menor cantidad de O_2^- puede difundir fuera de la célula endotelial. El O_2^- intracelular, aunque también el extracelular, estimula la COX-1 para transformar el AA en endoperóxidos que difunden hacia las CMLV provocando contracción (Vanhoutte *et al.*, 2005) (Figura 4).

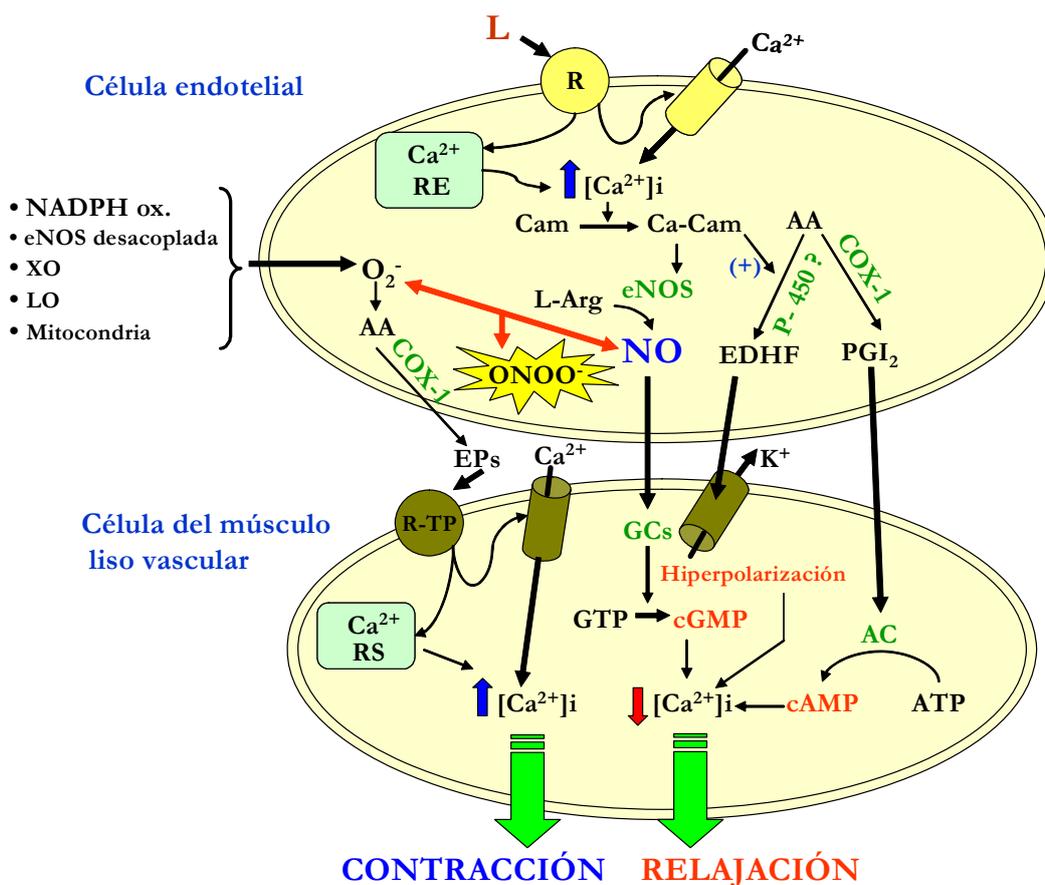


Figura 4. Representación esquemática de los mecanismos que desembocan en relajación o contracción de las células del músculo liso vascular. La activación del receptor (R) en la célula endotelial (CE) por el ligando (L) adecuado en cada caso (acetilcolina, bradikénina, ATP...), acaba desencadenando un aumento de la concentración intracelular de calcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), al liberarse éste del retículo endoplásmico (RE) o entrar en la célula mediante canales L de calcio. Se inician así tres procesos conducentes a producir relajación de las células del músculo liso vascular (CMLV). a) El Ca^{2+} se une a la calmodulina (Cam), con lo que activa la eNOS y se produce, desde L-arginina (L-Arg), NO que difunde a las células del músculo liso vascular (CMLV) adyacentes, activando la Guanilato ciclasa soluble (GCs), que a partir de GTP sintetiza cGMP, el cual, mediante diversos procesos (Figura 3) disminuye la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las CMLV. b) El Ca^{2+} también activa, probablemente a través del Citocromo P-450 (aunque este proceso no está claro), la síntesis del Factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) a partir de Ácido araquidónico (AA). El EDHF activa canales de K⁺ en la CMLV, produciendo hiperpolarización celular, y contribuyendo así a reducir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. c) También desde el AA, gracias a la Ciclooxygenasa 1 (COX-1), se sintetiza Prostaciclina (PGI₂), que en las CMLV activa a la Adenilato ciclasa (AC), formándose desde el precursor ATP, cAMP, que también contribuye a la reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y así, a la relajación muscular. Paralelamente, puede formarse anión superóxido (O_2^-) en las CE (principalmente por acción de diversas

enzimas, como NAD(P)H oxidasa, eNOS desacoplada, Xantina oxidasa(XO), Lipooxigenasa (LO), o en la cadena respiratoria de las mitocondrias). El O_2^- puede activar la COX-1 para transformar el AA en endoperóxidos (EPS), que actuando en las CMLV sobre los receptores de tromboxano/endoperóxidos (R-TP), causan un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ de la célula muscular, lo que lleva a la contracción. Un exceso de O_2^- puede reaccionar con el NO, disminuyendo así sus efectos relajantes, y formando peroxinitrito (ONOO⁻), un potente agente oxidante. ↓ :Disminución. ↑ :Aumento.

1.23 Sobre la hemostasia y coagulación.

El endotelio participa en el mecanismo de la coagulación mediante la liberación de agentes como el factor tisular, que inicia la cascada de coagulación y actúa como un receptor celular para la activación del factor VII; el factor VIII, que es un cofactor que se une al factor IX activado y la trombomodulina, a la que se une la trombina para poder activar a la proteína C que actúa como anticoagulante.

En condiciones normales, el endotelio manifiesta una importante actividad anticoagulante, antiagregante plaquetaria y fibrinolítica que permite el mantenimiento de la fluidez sanguínea y evitar problemas trombóticos. Así, la liberación endotelial de NO y PGI₂ inhibe la adhesión y la agregación plaquetaria a través del aumento respectivo de la concentración intraplaquetaria de cGMP y cAMP. Además, las células endoteliales producen ectonucleotidasas, que son enzimas que defosforilan adenosín difosfato (ADP), que es un agente proagregante, a AMP y luego adenosina, inhibiendo la agregación plaquetaria (Marcus *et al.*, 1997). Asimismo el endotelio participa en la fibrinólisis al sintetizar el activador del plasminógeno tisular (tPA), que cataliza el paso de plasminógeno a plasmina.

Sin embargo, el endotelio también posee actividad proagregante, protrombótica y antifibrinolítica mediada por el factor de von Willebrandt, el TXA₂, la fibronectina, el factor V y el inhibidor del tPA (Galley y Webster, 2004, Landmesser *et al.*, 2004).

1.24 Sobre la angiogénesis.

La angiogénesis es el proceso por el cual se desarrollan nuevos vasos sanguíneos a partir de un lecho vascular preexistente. Comienza por la activación de las células endoteliales bajo la acción de una serie de citocinas y de otros mediadores fisiológicos. Entre los factores de crecimiento promotores destaca el VEGF. Otros mediadores solubles de la angiogénesis son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el NO. Como respuesta a la señal angiogénica, las células endoteliales comienzan a proliferar. Tras esto, se produce la síntesis y liberación de una serie de enzimas degradativas. La acción degradadora producida por estas enzimas está implicada en, al menos, 3 pasos del proceso angiogénico, la degradación de la membrana basal, la migración celular y la formación del lumen vascular (Conway *et al.*, 2001; Ziche y Morbidelli, 2000).

1.3 La disfunción endotelial.

1.31 Definición y concepto.

El endotelio juega un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis circulatoria. Esto se debe a que este tejido responde a señales químicas y hormonales, así como a cambios hemodinámicos producidos por modificaciones en el flujo sanguíneo, con la liberación de mediadores que modulan la respuesta de las fibras de la musculatura lisa vascular, las plaquetas y los leucocitos. Pero en situaciones patológicas, sus funciones pueden alterarse y no responder adecuadamente a las necesidades orgánicas.

La disfunción endotelial puede definirse como el desequilibrio entre la síntesis, liberación o efecto de los factores endoteliales vasodilatadores y el de las sustancias vasoconstrictoras que pueden sintetizarse en las células de este tejido. Este desequilibrio se manifiesta en una reducción de la respuesta vasodilatadora

dependiente de endotelio, o con una mayor respuesta vasoconstrictora. Hay, no obstante, que tener en cuenta que cuando existe un deterioro endotelial pueden además afectarse otras funciones de este tejido, y puede facilitarse la interacción de las plaquetas y los leucocitos con la pared vascular, así como el crecimiento y la migración de las CMLV (Endemann y Schiffrin, 2004). Por tanto, en una definición más amplia de disfunción endotelial, se incluiría no sólo una capacidad vasodilatadora disminuida sino también un estado proinflamatorio y protrombótico asociado a la misma (Figura 5).

Hoy se sabe que la disfunción endotelial desempeña un papel importante en la patogénesis de la aterosclerosis y que es un marcador precoz de daño vascular anterior a que los cambios estructurales de la pared de los vasos se hagan patentes mediante angiografía o ultrasonidos (Davignon y Ganz, 2004).

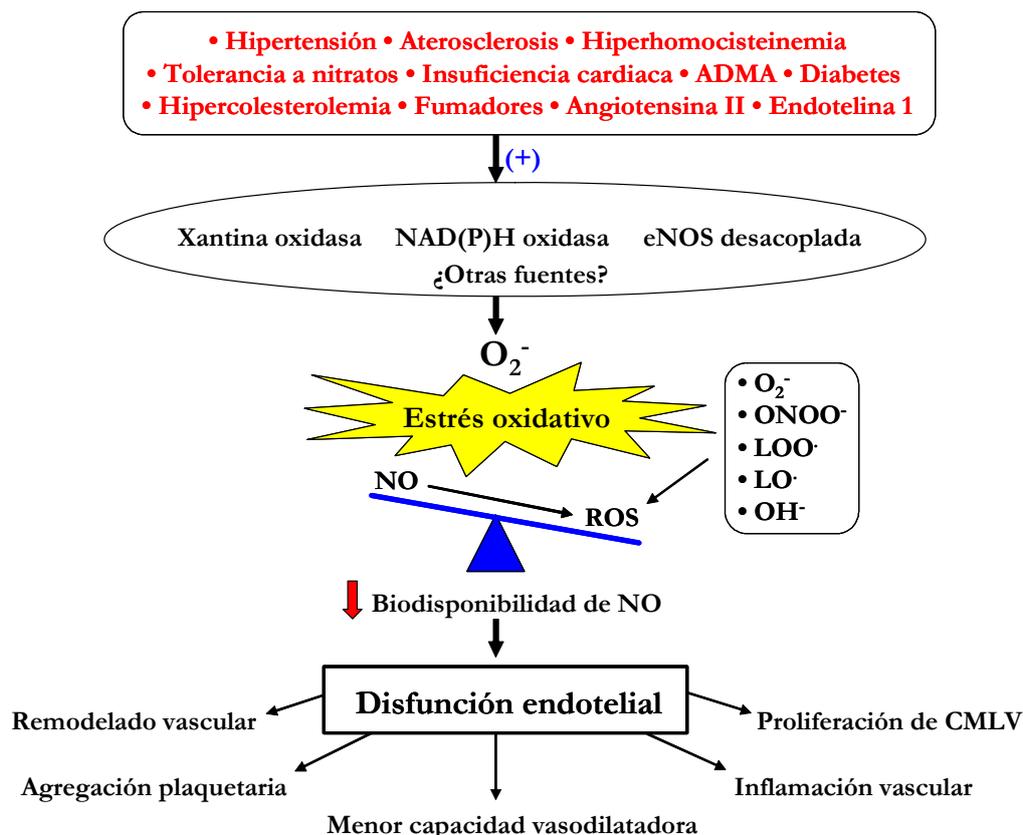


Figura 5. Mecanismos causantes de la disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares. Distintos agentes, como enfermedades cardiovasculares (hipertensión, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis), factores de riesgo (hipercolesterolemia, fumar, tolerancia a nitratos, diabetes, dimetil arginina asimétrica (ADMA), hiperhomocisteinemia) y agentes vasoconstrictores (angiotensina II, endotelina 1), pueden activar diferentes sistemas enzimáticos, como la NAD(P)H oxidasa vascular, la xantina oxidasa, o la eNOS desacoplada, que producen un potente agente oxidante y precursor de otros oxidantes, el anión superóxido (O_2^-), generando así un estrés oxidativo (altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre ellas O_2^- , peroxinitrito (ONOO $^-$), radicales lipídicos (LOO \cdot y LO \cdot) o radical hidroxilo (OH $^-$) principalmente), que disminuye la biodisponibilidad del agente vasodilatador óxido nítrico (NO) al aumentar su degradación por las ROS. Esto produce la denominada disfunción endotelial, donde se observa un estado vascular proinflamatorio, proagregante plaquetario y con alteración en el tono vascular, debido a que se produce un remodelado vascular, un aumento de la agregación plaquetaria, inflamación vascular, la proliferación de células del músculo liso vascular (CMLV) y una menor capacidad vasodilatadora (a través de mecanismos que se detallarán más adelante) La disfunción endotelial también mantiene, agrava y probablemente influye en el desarrollo de esas patologías cardiovasculares. ↓:Disminución. (+):Activación.

1.32 Enfermedad cardiovascular y disfunción endotelial.

La disfunción endotelial en la hipertensión humana se describió por primera vez en la vasculatura del antebrazo en 1990 (Panza *et al.*, 1990a). La pérdida de vasodilatación dependiente de endotelio en la hipertensión se ha confirmado en numerosos estudios realizados en diferentes lechos vasculares, incluyendo los pequeños vasos de resistencia (Park *et al.*, 2001a,b; Schiffrin *et al.*, 2000). En pacientes con hipertensión esencial en estado I, se ha demostrado que aproximadamente el 60% exhiben pérdida de vasodilatación en arterias pequeñas cuando se estudia este hecho *in vitro* en vasos diseccionados de biopsias subcutáneas gluteales (Park *et al.*, 2001a,b). Se sabe que la disfunción endotelial se produce con independencia de si la etiología es derivada o consecuencia de factores etiológicos renales o endocrinos (Rizzoni *et al.*, 1998).

La hipertensión tiene una influencia directa en la función vascular, independientemente de otros factores de riesgo cardiovasculares. Ward *et al.* (2004) estudiaron la presión arterial ambulatoria durante 24 horas y la función del músculo liso y del endotelio de arterias braquiales en pacientes hipertensos y normotensos. La presión arterial estaba inversamente relacionada con la respuesta vasodilatadora mediada por flujo.

La disfunción endotelial no parece que se dé en pacientes hipertensos de “bata blanca” de mediana edad sin otros factores de riesgo cardiovascular (Pierdomenico *et al.*, 2002). La hipertrofia ventricular izquierda asociada a la hipertensión, tiene un efecto negativo adicional sobre la función endotelial (Ercan *et al.*, 2003). En un subestudio del LIFE (Olsen *et al.*, 2004), pacientes hipertensos con hipertrofia ventricular izquierda diagnosticada electrocardiográficamente, sin enfermedad arterial coronaria, tenían alterada la función vasodilatadora en la circulación coronaria y no coronaria.

Recientemente, Nishizaka *et al.* (2004) demostraron que la aldosterona puede causar disfunción endotelial en pacientes con hipertensión resistente independientemente de presión arterial alta. De hecho, la espironolactona

aumentó la vasodilatación mediada por flujo a pesar de no reducir la presión arterial.

El deterioro de la vasodilatación se ha descrito también en otras enfermedades cardiovasculares: en la diabetes tipo I (Beckman *et al.*, 2003) y tipo II (Endemann *et al.*, 2004; Schofield *et al.*, 2002; Rizzoni *et al.*, 2001), en la enfermedad arterial coronaria (Monnink *et al.*, 2002), en la insuficiencia cardíaca congestiva (Landmesser *et al.*, 2002) y en la insuficiencia renal crónica (Yildiz *et al.*, 2003; Bolton *et al.*, 2001; Thambyrajah *et al.*, 2000). Además, esta manifestación de la disfunción endotelial no sólo es consecuencia de la enfermedad cardiovascular sino que también podría preceder a su desarrollo, como muestra un estudio en descendientes de pacientes hipertensos (Taddei *et al.*, 1996); los sujetos estudiados presentaron disfunción endotelial a pesar de ser normotensos. También, en pacientes con diabetes tipo II, normotensos y normoglucémicos, se relacionó la disfunción endotelial con la resistencia a la insulina (Balletshofer *et al.*, 2000).

Finalmente, se ha demostrado la existencia de disfunción endotelial en el síndrome metabólico y en la dislipidemia (Engler *et al.*, 2003), y podría asociarse a la obesidad (Raitakari *et al.*, 2004), la hiperhomocisteinemia (Viridis *et al.*, 2001), la vida sedentaria (Green *et al.*, 2003) y el hábito tabáquico (Oida *et al.*, 2003), en ausencia de enfermedad cardiovascular patente.

1.33 Fisiopatología de la disfunción endotelial.

La fisiopatología de la disfunción endotelial es compleja. El endotelio es el principal regulador de la homeostasis y ejerce un gran número de efectos vasoprotectores como la vasodilatación, la inhibición de la respuesta inflamatoria y de la agregación plaquetaria, y la inhibición de la proliferación de CMLV. La disfunción del endotelio, por tanto, causa reducción o abolición de estos efectos vasoprotectores. Los factores que conducen a la menor vasodilatación son, principalmente, una reducción en la producción de NO, un incremento del estrés oxidativo, una disminución de la disponibilidad de NO y una disminución del

FHDE. La respuesta inflamatoria se inicia por una regulación al alza de moléculas de adhesión, generación de quimiocinas y producción del inhibidor del tPA, lo que también conduce a un estado protrombótico. Los niveles de dimetilarginina asimétrica (ADMA), péptidos vasoconstrictores como la Ang II y ET-1 y la hiperhomocisteinemia, hipercolesterolemia e hiperglucemia también contribuyen a la disfunción endotelial. Como el conjunto de mecanismos de disfunción endotelial es complejo, analizaremos algunos de los factores comunes en la mayoría de las condiciones patológicas.

1.331 Óxido nítrico.

El tono vascular se mantiene mediante la liberación endotelial de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras (Davignon y Ganz, 2004), siendo el NO el principal agente vasodilatador. Además de actuar como vasodilatador, inhibe la proliferación celular y la inflamación, y tiene efectos antiagregantes sobre las plaquetas.

Ya se dijo que la característica esencial de la disfunción endotelial es la pérdida de vasodilatación dependiente de endotelio (apartado 1.31), lo que se relaciona con una disminución de NO. Esta disminución puede deberse a una reducida expresión y/o actividad de la eNOS (consecuencia de inhibidores endógenos o exógenos o una reducción en la disponibilidad de su substrato, L-arginina) y así a una disminuida biodisponibilidad de NO.

La expresión de la eNOS se ha estudiado en modelos animales de hipertensión. Sin embargo, los datos publicados sobre la regulación de la expresión de la eNOS vascular en SHR son dispares; se ha descrito tanto una disminución (Chou *et al.*, 1998) como un incremento de la expresión de la proteína eNOS (Piech *et al.*, 2003; Vaziri *et al.*, 1998) con respecto a sus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) reaccionan con el NO, disminuyendo así su cantidad disponible, y formando peroxinitritos (ONOO⁻) (Koppenol *et al.*, 1992), oxidantes citotóxicos que a través de la nitración de proteínas afectarán a su

función y por tanto a la función endotelial. Los ONOO⁻ son importantes mediadores de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), acentuando su papel aterogénico (Griendling y Fitzgerald, 2003). Además, conducen a la degradación del cofactor de la eNOS, BH₄, (Milstien y Katusic, 1999) lo que lleva a un “desacoplamiento” de la enzima, como se tratará posteriormente. Mediante el uso de un catalizador de descomposición de ONOO⁻, FP15, se pudo prevenir la disfunción endotelial y cardiaca en ratones diabéticos (Szabo *et al.*, 2002). El exceso de oxidantes también produce una reducción de la BH₄ con el consiguiente incremento de dihidrobiopterina (BH₂). Cuando esto ocurre, la formación del dímero activo de la eNOS con actividad oxigenasa y la formación de NO está limitada (desacoplamiento de la eNOS). La función reductasa de la eNOS se ve aumentada y se forman más ROS, mayoritariamente O₂⁻, con el consiguiente aumento de estrés oxidativo y deterioro de la función endotelial y vascular (Landmesser *et al.*, 2003).

El estrés oxidativo está unido al estado proinflamatorio de la pared de los vasos, ya que las ROS regulan al alza las moléculas de adhesión (moléculas de adhesión a las células vasculares [VCAM-1], moléculas de adhesión intercelular [ICAM-1]) y quimiotácticas (proteína quimiotáctica de monocitos-1 [MCP-1]) (Griendling y FitzGerald, 2003). La inflamación disminuye la biodisponibilidad del NO, de hecho, se ha demostrado que la proteína C reactiva reduce la actividad de la eNOS (Venugopal *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2002).

Los nuevos avances en la regulación de la función endotelial se centran en el estudio de las caveolas y caveolinas y su participación e importancia en la regulación de la eNOS. Se ha sugerido que la causa de la disfunción endotelial e hipertensión inducida por ciclosporina-A puede ser una disminución del contenido de colesterol en la caveola, puesto que el tratamiento de células endoteliales aórticas bovinas con colesterol bloquea el efecto de la ciclosporina y restablece la funcionalidad de la eNOS (Lungu *et al.*, 2004). Sindhu *et al.* (2004) encontraron que el fallo renal crónico inducía un aumento en caveolina-1 del tejido aórtico renal y hepático, acompañado de disfunción endotelial hipertensiva.

Por tanto, la insuficiencia renal crónica contribuye a la hipertensión y a cambios en la biodisponibilidad de NO.

1.332 Dimetilarginina asimétrica .

La ADMA es un inhibidor endógeno competitivo de la eNOS que se ha relacionado con la disfunción endotelial. Se ha demostrado que está incrementada en pacientes con hipertensión (Kielstein *et al.*, 2003) y que existe una fuerte correlación entre los niveles sanguíneos de ADMA y el empeoramiento de la vasodilatación dependiente de endotelio, así como de la morbilidad y mortalidad cardiovasculares (Fliser *et al.*, 2003).

Se estableció una relación entre la inhibición de la eNOS y los niveles en plasma de ADMA en células endoteliales humanas que se estimularon con plasma procedente de pacientes con enfermedad renal crónica (Xiao *et al.*, 2001). Los niveles de ADMA están inversamente relacionados con la vasodilatación dependiente de endotelio (Boger *et al.*, 1998) en sujetos con hipercolesterolemia. De hecho, la infusión de L-arginina, sustrato de la eNOS y competidor de ADMA, normalizó su función endotelial (Achan *et al.*, 2003).

Recientemente, Takiuchi *et al.* (2004) realizaron un estudio en pacientes con hipertensión esencial sin enfermedad arterial coronaria o diabetes mellitus y demostraron que el aumento de los niveles plasmáticos de ADMA jugaba un papel fundamental en la disfunción endotelial, independientemente de la resistencia a la insulina o de la hipertrofia ventricular izquierda. Kielstein *et al.* (2004) evaluaron los efectos cardiovasculares sistémicos de la infusión de ADMA en sujetos sanos observando que producía una disminución del gasto cardiaco y del flujo plasmático renal efectivo, y un incremento de la resistencia renovascular, retención de sodio y aumento de la presión arterial de forma dosis-dependiente.

La ADMA se elimina por excreción a través de los riñones o se metaboliza a citrulina por la enzima dimetilaminohidrolasa (DDAH). La sobreexpresión de DDAH en ratones transgénicos disminuye el ADMA, incrementa la actividad de la eNOS y reduce la presión arterial (Dayoub *et al.*, 2003), subrayando la

importancia fisiopatológica de la ADMA. También se ha demostrado que la proteína arginina metiltransferasa, que produce la metilación de la arginina, principalmente la metiltransferasa-1, está regulada al alza por las fuerzas de cizallamiento, y esta sobre-regulación se asoció con la elevada generación de ADMA (Osanai *et al.*, 2003).

La hipercolesterolemia es un factor de riesgo para la aterosclerosis, patología que está asociada a la disfunción endotelial (Kawano *et al.*, 2002). Actualmente, existen evidencias que relacionan la hipercolesterolemia con elevados niveles de ADMA (Boger *et al.*, 1998). Estos niveles también están aumentados en pacientes hipertensos de edad avanzada (Kielstein *et al.*, 2003) y se correlacionan con la edad y la presión arterial (Miyazaki *et al.*, 1999). También se han relacionado altos niveles de ADMA con el incremento de factores de riesgo cardiovascular en el fallo renal, tales como un aumento de proteína C reactiva, la proporción del grosor de las capas íntima-media de la carótida, la hipertrofia ventricular izquierda y la disfunción ventricular izquierda (Zoccali *et al.*, 2002a,b; Miyazaki *et al.*, 1999). Además, es una eficaz herramienta predictora de sucesos coronarios agudos (Valkonen *et al.*, 2001), mortalidad total de pacientes con fallo renal crónico (Zoccali *et al.*, 2001) y mortalidad de pacientes enfermos críticos (Nijveldt *et al.*, 2003).

1.333 Metabolitos del ácido araquidónico.

El aumento de sustancias vasoconstrictoras derivadas de la COX se ha relacionado con la disfunción endotelial. La estimulación con ACh es capaz de ocasionar contracciones dependientes de endotelio en la aorta y las arterias de resistencia de SHR (Luscher *et al.*, 1990b; Luscher y Vanhoutte, 1986), contrarrestando los efectos de los factores relajantes derivados de endotelio. Estas contracciones pueden prevenirse con inhibidores selectivos de la COX-1 (Yang *et al.*, 2002; Ge *et al.*, 1995), restaurándose así la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio (Luscher y Vanhoutte, 1986). En SHR, además, la administración de indometacina, inhibidor de la COX, redujo los niveles de

presión arterial una vez establecida la hipertensión (Luscher *et al.*, 1990b). Existe paralelismo entre los estudios en animales hipertensos y los realizados en humanos por Taddei *et al.* (1998), que confirman el importante papel que juegan los vasoconstrictores derivados de la COX en la hipertensión esencial. En este sentido, recientemente se ha demostrado que el tratamiento crónico con aspirina reduce la presión arterial en pacientes hipertensos (Hermida *et al.*, 2003).

La expresión de la COX-1 es mayor en aortas de SHR adultas que en WKY (Ge *et al.*, 1995). Esta enzima, presuntamente unida a la membrana de las células endoteliales, transforma el AA en endoperóxidos, que difunden hacia las CMLV para activar al receptor TP (Yang *et al.*, 2003). Ge *et al.* (1999, 1995) describieron que para las contracciones dependientes de endotelio se requiere tanto un aumento de la actividad de la COX-1 como una hiperactividad de dicho receptor. El dazoxiben, un inhibidor de la tromboxano sintetasa, no afecta a la contracción dependiente de endotelio a ACh, descartándose la intervención del TXA₂, agonista del receptor TP. Es la PGH₂ la mediadora de la contracción dependiente de endotelio. De hecho, se comprobó que la ACh provoca un aumento en la liberación de PGH₂ en SHR pero no en WKY (Ge *et al.*, 1995).

Además, la reducida disponibilidad de NO, característica de la disfunción endotelial, aumenta la amplitud de las contracciones dependientes de endotelio, al igual que el aumento en la producción de O₂⁻, que estimula la COX-1 (Yang *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2002). Todos estos datos indican que en las SHR la hipertensión está asociada al aumento en la producción y efecto de estos endoperóxidos.

1.334 El estrés oxidativo.

Las células endoteliales vasculares sanas metabolizan el oxígeno y generan ROS potencialmente nocivas. En condiciones normales, la tasa de formación de oxidantes está equilibrada con la tasa de eliminación (Touyz, 2004; Ogita y Liao, 2004). En la disfunción endotelial, sin embargo, existe un desequilibrio entre agentes prooxidantes y agentes antioxidantes, lo que da origen al estrés oxidativo. Así, éste será el resultado patogénico de la sobreproducción de oxidantes, con lo

que superan la capacidad antioxidante celular. Muchas condiciones patológicas incrementan las ROS en la pared de los vasos, incluyendo la hipercolesterolemia, la diabetes y la hipertensión, patologías asociadas a la disfunción endotelial.

Las ROS incluyen O_2^- , radical hidroxilo (OH^\cdot) y radicales lipídicos (LO^\cdot y LOO^\cdot). Todos ellos poseen electrones desapareados, por lo que se clasifican como radicales libres. Sin embargo el H_2O_2 , el $ONOO^-$ y el ácido hipocloroso (HCl) no son radicales libres, pero tienen propiedades oxidantes y contribuyen también al estrés oxidativo (Figura 6).

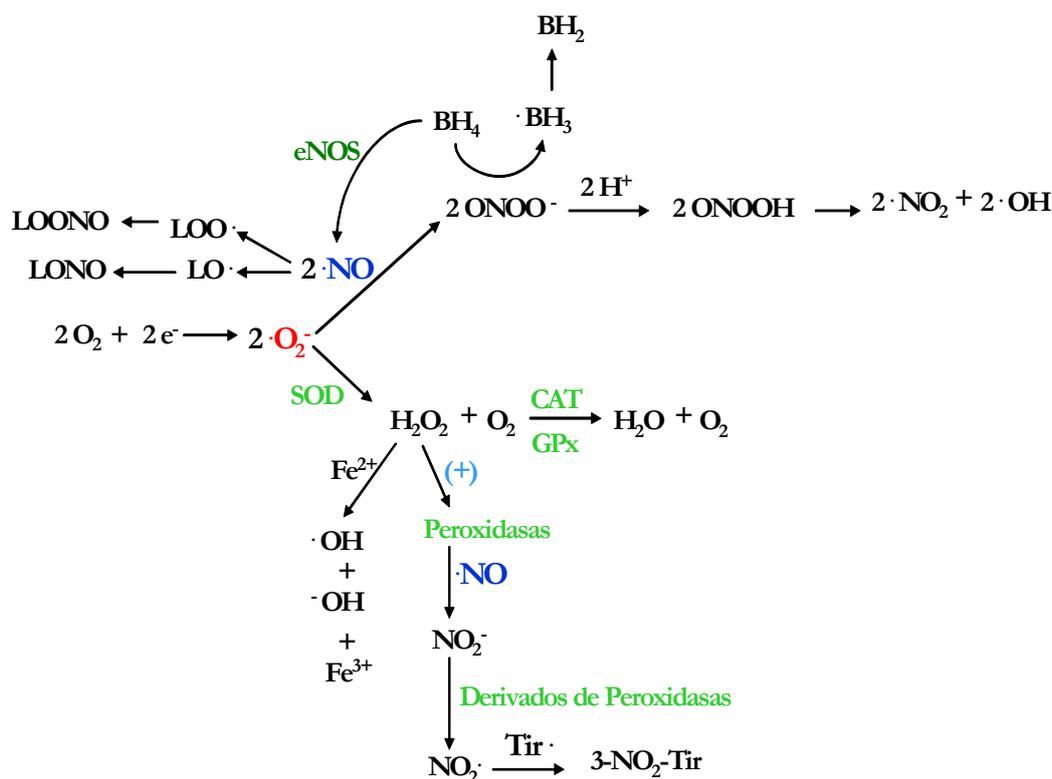


Figura 6. Esquema de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y sus interacciones con el NO. El anión superóxido (O_2^-) se genera mediante la reducción del O_2 por un electrón. La superóxido dismutasa (SOD) lo descompone rápidamente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Éste puede ser reducido a su vez y generar radicales hidroxilo ($\cdot OH$). El H_2O_2 puede activar a las peroxidasas para generar especies altamente reactivas que pueden oxidar el NO y formar nitritos (NO_2^-), que a su vez pueden reaccionar con productos de las peroxidasas y generar radicales nitritos ($NO_2\cdot$) que al unirse a restos de tirosina ($Tir\cdot$), producen nitrotirosina ($3-NO_2-Tir$). La catalasa (CAT) o la glutatión peroxidasa (GPx) descomponen el H_2O_2 en H_2O y O_2 . El O_2^- también puede reaccionar, sobre todo en condiciones de alto estrés oxidativo, con el NO y formar peroxinitrito ($ONOO^-$), un potente agente oxidante y nitrosante. El $ONOO^-$ puede reducirse a ácido peroxinitrico, que generará $NO_2\cdot$ y $OH\cdot$. El NO puede también reaccionar con radicales lipídicos ($LO\cdot$, $LOO\cdot$) para formar compuestos derivados nitrosados. Mediante estos procesos, disminuye la biodisponibilidad de NO al reducirse su cantidad para ejercer sus beneficiosos efectos sobre la vasculatura, y además se crean numerosos agentes oxidantes que aumentan el estrés oxidativo. Activación: (+).

Las ROS se han asociado a modelos de hipertensión experimental. Estos modelos están frecuentemente inducidos por la estimulación del sistema renina-angiotensina: perfusión crónica de Ang II, sobreexpresión de genes de renina y

angiotensinógeno o coartación de la arteria renal. La Ang II está también involucrada en el desarrollo de la hipertensión en SHR, como se verá en el apartado 2. En estos modelos, las ROS y los marcadores de la oxidación (nitración de residuos de tirosina en proteínas, 8-isoprostaglandina $F_{2\alpha}$, malonildialdehído (MDA) y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico [TBARS]), se hallan aumentados en vasos, corazón y riñones (Guo *et al.*, 2003; Chabrashvili *et al.*, 2003; Lassegue y Clempus, 2003).

Los modelos de hipertensión con bajos niveles de renina y angiotensina se obtienen, por ejemplo, mediante la perfusión de ET-1 o por nefrectomía unilateral y administración de acetato de deoxicorticosterona (DOCA) más dieta rica en sal (DOCA-sal). En estos modelos también se ve elevada la producción de O_2^- vascular y los marcadores de estrés oxidativo (Li *et al.*, 2003a,b; Sedeek *et al.*, 2003, Zheng *et al.*, 2003). Por tanto, vemos que en muchos modelos experimentales, la hipertensión está asociada a una elevada producción de ROS (Figura 7).

Sin embargo, las ROS no sólo participan en la disfunción endotelial hipertensiva como veremos a continuación, sino que colaboran en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión. Así, el O_2^- puede inducir vasoconstricción (Grover *et al.*, 2003; Gonzalez-Pacheco *et al.*, 2002), hipertrofia vascular (Wedgwood y Black, 2003; Lassegue y Clempus, 2003) y miocárdica (Delbosc *et al.*, 2002; de Andrade *et al.*, 2002), disminución de la función renal (Sedeek, *et al.*, 2003; Welch y Wilcox, 2001) e incrementar la actividad simpática del SNC (Zanzinger, 2002). Por el contrario, el H_2O_2 ejerce efectos protectores al incrementar la actividad NOS o al actuar como EDHF.

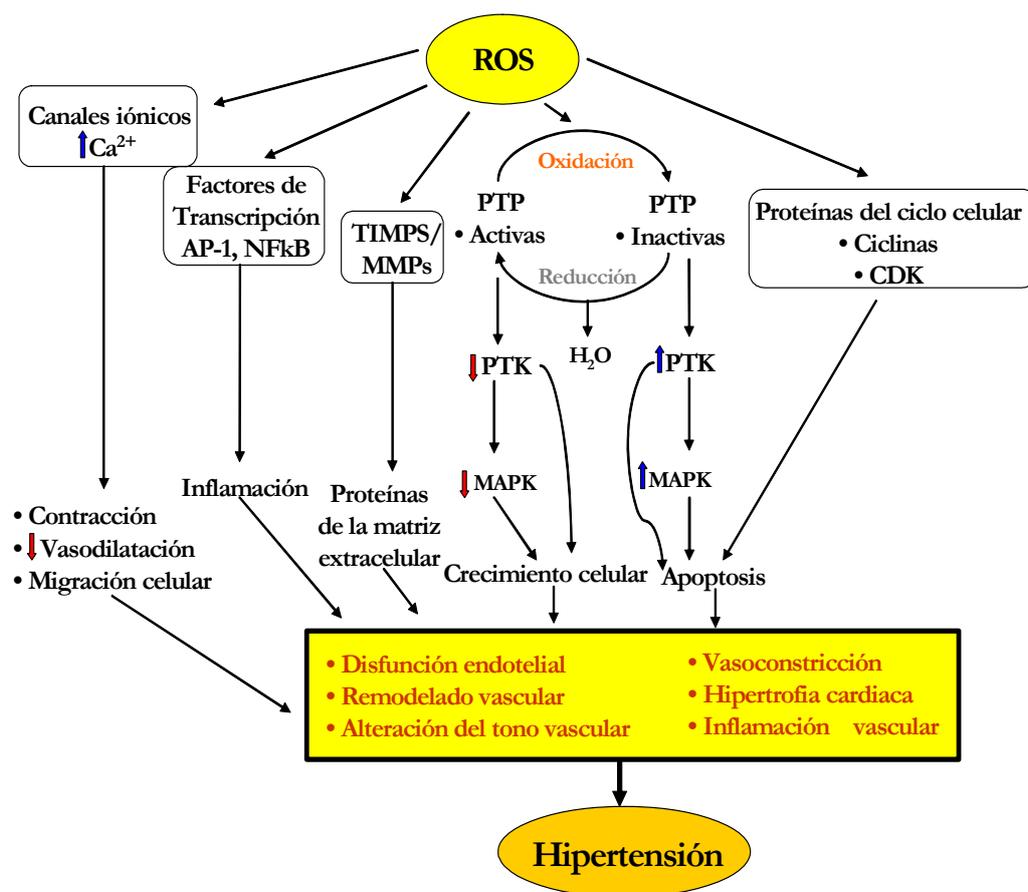


Figura 7. Mecanismos de señalización redox dependientes en las células del músculo liso vascular y sus efectos fisiológicos mediados por especies reactivas de oxígeno (ROS), tendientes a producir y mantener la hipertensión. Los ROS intracelulares modifican la actividad de proteínas tirosín kinasas (PTK), como Src, Ras, JAK2, PI3K y EGFR, así como proteínas kinasas activadas por mitógeno (MAPK), particularmente p38MAPK, JNK y ERK, probablemente debido a la oxidación/reducción de proteínas tirosín fosfatasa (PTP) debido a estas ROS. También influyen en la expresión genética y proteica activando factores de transcripción como el NFκB y el activador de proteína-1 (AP-1). Los ROS estimulan además canales iónicos, como los de Ca²⁺ y K⁺, causando cambios en la concentración catiónica intracelular. Todos estos procesos se traducen en numerosas respuestas celulares que parecen contribuir y prolongar el daño vascular hipertensivo. MMPs: Metaloproteasas de matriz. TIMP: Inhibidor tisular de metaloproteasas de matriz. ↑ :Aumento. ↓ :Disminución. CDK: Kinasa dependiente de ciclina.

La gran cantidad de ROS puede deberse a un aumento de su producción o a una menor eliminación de éstas. Aunque hay múltiples fuentes celulares de creación de ROS, como la cadena respiratoria en las mitocondrias, enzimas que

intervienen en la reducción del oxígeno, como la COX, LOX, el citocromo p450 y otras hemoproteínas (Cai y Harrison, 2000), las fuentes más importantes de ROS en el endotelio son NAD(P)H oxidasa, xantina oxidasa (XO) y la eNOS desacoplada.

1.3341 Papel de NAD(P)H oxidasa en el estrés oxidativo vascular.

Numerosos estudios han identificado una oxidasa asociada a la membrana plasmática como la principal fuente de ROS en los vasos humanos, situada tanto en el endotelio, como en las capas media y adventicia (Griendling *et al.*, 2000). La activación de esta enzima produce gran cantidad de señales intracelulares que pueden desembocar en disfunción endotelial, proliferación de las células del músculo liso vascular, expresión de genes pro-inflamatorios y síntesis de la matriz extracelular (Qamirani *et al.*, 2005; Lassegue *et al.*, 2004; Viridis *et al.*, 2004; Irani, 2000; Rao *et al.*, 1999).

Estructura, función y localización.

En un principio se determinó la estructura y la función de la NAD(P)H oxidasa en neutrófilos. Esta enzima es un complejo multi-enzimático formado un dominio con actividad reductasa compuesto por una flavoproteína y un citocromo b558 formado por las subunidades gp22^{phox} y gp91^{phox}. Otras importantes subunidades citoplasmáticas incluyen p47^{phox}, p40^{phox}, p67^{phox} y la proteína Rac. Cuando las células fagocíticas son activadas, las subunidades citosólicas se traslocan hacia al citocromo b558 de membrana, dando lugar a la forma activa de la enzima (Lapouge *et al.*, 2000; Koga *et al.*, 1999; Babior, 1995). Cuando el complejo está activo, transfiere electrones del NAD(P)H citosólico al oxígeno del espacio extracelular generando O₂⁻ (Cross y Segal, 2004 ; Nisimoto *et al.*, 1999).

La NAD(P)H oxidasa vascular tiene algunas características funcionales similares a la que se halla en neutrófilos. Ambas se inhiben por difenileneiodonio (DPI), un producto empleado para inhibir la producción de O₂⁻ vía NAD(P)H oxidasas. Se diferencian, sin embargo, en que la oxidasa vascular produce O₂⁻ en menor cantidad, pero de manera más constante (Cai y Harrison, 2000; Somers *et*

al., 2000). Muchos componentes de las NAD(P)H oxidasas de neutrófilos están presentes en las NAD(P)H oxidasas de las células endoteliales y el músculo liso vascular (Touyz *et al.*, 2002; Wassmann *et al.*, 2002; Griendling *et al.*, 2000). Así, esta oxidasa dependiente de NAD(P)H está formada por múltiples subunidades. Las principales subunidades catalíticas en el territorio vascular son Nox-1, gp91^{phox} (Nox-2) y Nox-4, y sus subunidades reguladoras son p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} y rac (Bengtson *et al.*, 2003; Lassegue y Clempus, 2003; Touyz *et al.*, 2002). Las subunidades Nox y p22^{phox} están localizadas en la membrana, mientras que el resto de componentes se encuentran en el citosol. En los últimos años se ha descubierto una familia de proteínas homólogas a la gp91^{phox} presente en los tejidos vasculares, las Nox (Bedard y Krause, 2007). Las células endoteliales contienen Nox-1 (el primer homólogo de Nox-2), Nox-2 (o gp91^{phox}), Nox-4, la isoforma más abundante, y Nox-5 (Ago *et al.*, 2005; Ago *et al.*, 2004; Lassegue y Clempus, 2003; Higashi *et al.*, 2003; Banfi *et al.*, 2001). Las células del músculo liso vascular expresan mayoritariamente Nox-4 (Griendling *et al.*, 2004; Lassegue *et al.*, 2001), mientras que en los vasos de conductancia (aorta y grandes arterias) se expresa principalmente Nox-1 (Lassegue *et al.*, 2001) y en los vasos de resistencia (arteriolas) Nox-2 (Griendling *et al.*, 2004; Touyz *et al.*, 2002). Los fibroblastos de la capa adventicia expresan Nox-2 y Nox-4 (Chamseddine y Miller, 2003; Rey *et al.*, 2002).

Actividad mediada por Ang II.

La actividad de la NAD(P)H vascular es regulada por las citocinas, hormonas y factores físicos tradicionalmente implicados en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular (Bedard y Krause, 2007; Griendling *et al.*, 2000). En particular, la Ang II, es un importante activador de la NAD(P)H oxidasa vascular. En las células del músculo liso vascular, la activación del receptor del Ang II AT-1 determina la fosforilación de residuos de serina en p47^{phox}. Touyz y colaboradores (2002) han indicado que la c-Src es una importante intermediaria de este mecanismo, porque su inhibición farmacológica previene la fosforilación de p47^{phox} y su translocación a la membrana (Touyz *et al.*, 2003a) donde interacciona

con la p22^{phox} y da lugar a la forma activa de la enzima. La translocación de p47^{phox} a la membrana implica también la translocación de p67^{phox}, estando esta subunidad unida a p47^{phox}. De esta forma, p47^{phox} se define como la subunidad organizadora, y p67^{phox} como la subunidad activadora (Takeya *et al.*, 2003). Este importante papel de c-Src se ha confirmado posteriormente en células de músculo liso vascular de ratones deficientes en c-Src (c-Src^{-/-}) (Touyz y Schiffrin, 1999). Las activaciones de la fosfolipasa D (PLD) (Touyz y Schiffrin, 1999) y la PKC (Seshiah *et al.*, 2002) probablemente están implicadas en la fosforilación de p47^{phox}. Además, la activación de c-Src estimula también la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que estimula a su vez la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) para la producción de fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (IP3), que a su vez activa a GTP-Rac-1. Una vez activada, GTP-Rac-1 se desplaza hacia la membrana e inicia la segunda fase de activación de la enzima (Touyz *et al.*, 2003b; Cai *et al.*, 2003; Quinn *et al.*, 1993). Este mecanismo de señalización por parte de Ang II y el proceso de formación de O₂⁻ por NAD(P)H oxidasa se ilustran en la Figura 8. Li y Shah (2003) han demostrado también que Ang II estimula la asociación de p47^{phox} con p22^{phox} en las células endoteliales. Por último, se ha demostrado que la subunidad p40^{phox} no es indispensable para la activación de la enzima (Wientjes *et al.*, 1993).

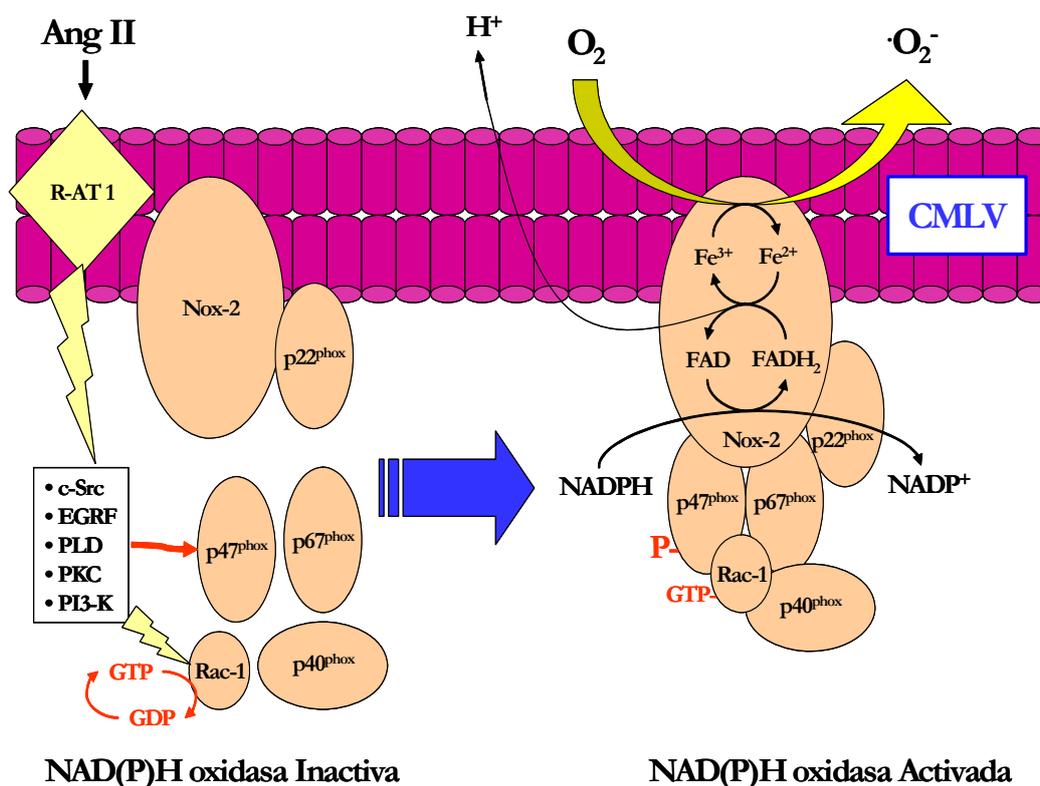


Figura 8. Mecanismo de activación y acción de la NAD(P)H oxidasa vascular mediante Ang II. La activación del receptor de Ang II AT1 en la membrana de las células del músculo liso vascular (CMLV) promueve la fosforilación de p47^{phox}. El mecanismo incluye la activación de Fosfolipasa D (PLD), de Proteín kinasa C (PKC), del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y de la tirosín kinasa c-Src. La fosforilación de p47^{phox} promueve su unión y la del resto de subunidades citoplasmáticas, a las subunidades de membrana de la enzima. La translocación de Rac-1 una vez unida a GTP gracias a la acción de la Fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3-K), a la membrana contribuye también a la activación de la enzima, que entonces, a partir de NAD(P)H y O₂ produce, mediante un sistema redox de transporte electrónico en el dominio reductasa formado por las subunidades Nox-2 y p22^{phox}, NAD(P)⁺, H⁺ y anión superóxido, O₂⁻.

Además de activar la NADPH-oxidasa, Ang II induce también un aumento en la expresión de sus subunidades tanto en células endoteliales como musculares. Así, la infusión crónica de Ang II en ratas aumenta la expresión de p22^{phox}, Nox-1 y Nox-4 en aorta (Mollnau *et al.*, 2002; Wingler *et al.*, 2001; Fukuy *et al.*, 1997). Las subunidades phox están aumentadas en las células endoteliales y en las CMLV de pequeños vasos expuestos a Ang II (Gragasi *et al.*, 2003; Touyz *et al.*, 2003a; Touyz

et al., 2002). Concretamente, se ve un aumento en la expresión de las subunidades gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, y p40^{phox} en células de músculo liso aisladas de arterias de resistencia humanas, y estos efectos se ha visto que están mediados a través de la activación de c-Src (Touyz *et al.*, 2002).

Además de la Ang II, otros factores influyen en la expresión de la enzima, y a la inversa. Así, Li y Shah (2003) estudiaron el papel de la subunidad p47^{phox} en la regulación de NAD(P)H oxidasa y observaron que la producción de ROS se reduce por la transfección de moléculas antisentido de p47^{phox}, se suprime por la eliminación del gen p47^{phox}, y se recupera mediante su expresión. De forma similar, en las CMLV expuestas a presión, la Nox-1 está aumentada y el incremento de ROS originado se reduce al impedir el ensamblaje de p47^{phox} (Grote *et al.*, 2003). También *in vitro*, se demostró que la producción de O₂⁻ en vasos expuestos a ET-1 o aislados de animales DOCA-sal o SHR, se reduce por la apocinina, inhibidor de la unión de las subunidades de la oxidasa (Li *et al.*, 2003a,b; Zheng *et al.*, 2003b). *In vivo*, gp91^{phox} está aumentada en el riñón e hígado después de la nefrectomía (Vaziri *et al.*, 2003). También se ha podido comprobar cómo la perfusión de Ang II y la sobreexpresión de renina aumentan la expresión de la subunidad Nox-1 en vasos y corteza renal (Chabrashvili *et al.*, 2003; Lassegue y Clempus, 2003).

Efectos in vitro de la actividad de la enzima.

En cuanto a los efectos de este aumento en la expresión de subunidades y presumible actividad de la enzima, se ha visto que diversos estímulos tales como Ang II, trombina, PDGF y el TNF- α incrementan la actividad de NAD(P)H oxidasa y la producción de ROS en las CMLV (Griendling *et al.*, 2000a). La actividad de la NAD(P)H oxidasa también está aumentada en el tejido vascular de SHR. Asimismo, el H₂O₂ derivado de la NAD(P)H oxidasa está implicado en la hipertrofia de las células del músculo liso vascular causada por Ang II (Griendling *et al.*, 2000a; Servant *et al.*, 1996). La Ang II estimula, a través de la activación de NAD(P)H oxidasa, las respuestas inflamatorias, produciendo un aumento en la expresión de la MCP-1 (Tummala *et al.*, 1999), en VCAM-1 (Chen *et al.*, 1997) e

interleukina- 6 (Schieffer *et al.*, 2000). Las ROS derivadas de NAD(P)H oxidasa parecen modular también la angiogenesis, a través de la activación de los receptores del VEGF (Ushio-Fukai *et al.*, 2002). Las ROS producidas por NAD(P)H oxidasa también activan las metaloproteasas de la matriz (MMPs) y aumentan su expresión (Galis y Khatri, 2002). En células endoteliales, uno de los efectos debido a la activación de NAD(P)H oxidasa es la producción de NO, de tal manera la Ang II puede estimular simultáneamente la producción de O_2^- y NO, favoreciendo así la formación de ONOO⁻ (Thorup *et al.*, 1999; Pueyo *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 1996).

Efectos in vivo de la actividad de NAD(P)H oxidasa.

Aparte de estos resultados en estudios *in vitro*, la NAD(P)H oxidasa parece estar implicada en la generación de las ROS observada en muchas enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, un exceso en la producción de O_2^- por NAD(P)H oxidasa está implicado en la disminución de NO asociada a la disfunción endotelial en modelos experimentales de hipertensión y en la hipertensión esencial (Endeman *et al.*, 2004; Viridis *et al.*, 2004). En ratas a las que se indujo hipertensión arterial por administración de Ang II, se observó un aumento en la expresión y actividad de la NAD(P)H vascular (Griendling *et al.*, 2000a). En estos animales, la administración de superóxido dismutasa (SOD) o del inhibidor específico de la NAD(P)H oxidasa apocinina revirtió el incremento de la presión arterial (Welch *et al.*, 2006; Viridis *et al.*, 2004). En modelos experimentales en animales, la producción de O_2^- aumenta con el envejecimiento, y este efecto parece estar asociado a la NAD(P)H oxidasa (Hamilton *et al.*, 2001). También se ha demostrado un papel similar de la NAD(P)H oxidasa en humanos. Por ejemplo, en venas safenas humanas de pacientes diabéticos e hipercolesterolémicos, el aumento en la producción de O_2^- es debido a un aumento en la actividad de NAD(P)H oxidasa (Cai y Harrison, 2000). Vemos a través de todos estos datos el papel clave que NAD(P)H oxidasa parece ejercer en la hipertensión.

1.3342 Papel de la xantina oxidasa.

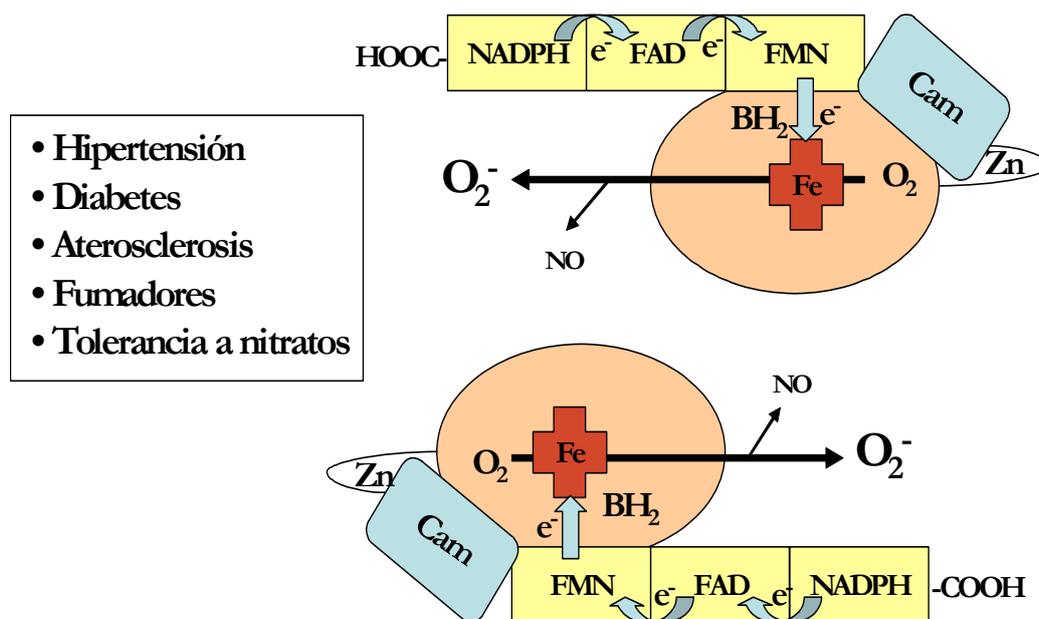
Otra fuente importante de ROS es la enzima XO. Existen dos isoformas, convertibles la una en la otra en función del estado redox y de la presencia de cofactores, con dos actividades enzimáticas: xantina deshidrogenasa y XO. La primera reduce nicotinamín adenosín dinucleótido oxidado (NAD⁺), mientras que la segunda reduce el oxígeno molecular produciendo O₂⁻ y H₂O₂ (Berry y Hare, 2004). Algunos estudios indican que los inhibidores de XO, oxipurinol o alopurinol, mejoran la disfunción endotelial (Mervaala *et al.*, 2001; Butler *et al.*, 2000; Cardillo *et al.*, 1997). También, en SHR, el oxipurinol es capaz de reducir los valores de presión arterial, indicando un papel de la XO en el mantenimiento de las presiones arteriales elevadas (Nakazono *et al.*, 1991).

1.3343 Papel del desacoplamiento de la eNOS.

Bajo ciertas circunstancias, esta enzima puede no ejercer correctamente su función (apartado 1.2211) y producirse lo que se denomina “desacoplamiento de eNOS”, transfiriendo los electrones que debían ir al nitrógeno guanidínico de la L-arginina para formar NO, al oxígeno, y produciendo O₂⁻ y H₂O₂, con lo que se disminuye así la producción de NO (Forstermann, 2006) y se aumenta la de ROS. El desacoplamiento de la eNOS representa otro posible mecanismo implicado en la disfunción endotelial y puede deberse a una deficiencia en L-arginina o en BH₄ (al oxidarse a BH₂), o bien, puede ser debido a la presencia de sus inhibidores endógenos. De esta forma, el desacoplamiento de la eNOS es también un mecanismo crítico en la disfunción endotelial experimental y clínica (Vasquez-Vivar *et al.*, 2003). Este desacoplamiento se ha observado *in vivo* en distintas situaciones patológicas. Así, en aorta de ratas espontáneamente hipertensas con tendencia a infarto cerebral (SHR-SP), la producción de O₂⁻ es mayor respecto a ratas normotensas y aumenta con la edad. Este efecto se revierte al inhibir la eNOS con N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) o después de eliminar el endotelio (Hamilton *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado que la tolerancia a los nitratos

esta asociada con un aumento de la producción vascular de O_2^- por desacoplamiento de la eNOS (Munzel *et al.*, 2000) (Figura 9).

Monómeros de eNOS, enzima desacoplada



- Hipertensión
- Diabetes
- Aterosclerosis
- Fumadores
- Tolerancia a nitratos

Figura 9. Desacoplamiento de la eNOS. La enzima en forma de monómero o en condiciones de de baja biodisponibilidad de L-arginina, o tetrahydrobiopterina (BH_4) (por aumento de su oxidación a dihydrobiopterina [BH_2]) que puede ser debido a diversos factores como hipertensión, diabetes, aterosclerosis, adicción al tabaco o tolerancia a los nitratos, se encuentra en un estado que se denomina “desacoplada”, en el que en lugar de producir NO , produce mayoritariamente O_2^- .

1.3344 El papel de las enzimas antioxidantes.

Nuestro organismo posee mecanismos de defensa antioxidantes, cuya alteración también contribuye al estrés oxidativo (Redon *et al.*, 2003). La SOD convierte el O_2^- en H_2O_2 , que es más tarde degradado a agua por la catalasa (Cat) o la glutatión peroxidasa (GP_x). La perfusión de Ang II disminuye la expresión de SOD extracelular en riñón (Chabrashvili *et al.*, 2003). Se ha podido comprobar

cómo la actividad de CuZn-SOD y Mn-SOD es más baja en vasos y riñón de animales sometidos a nefrectomía parcial (Vaziri *et al.*, 2003), en ratas Dahl sensibles a sal, estenosis arterial renal y DOCA-sal (Awe *et al.*, 2003). Además, la actividad Mn-SOD disminuye en el riñón por la perfusión de Ang II debido a la nitración de tirosina (Guo *et al.*, 2003). De forma semejante, la Cat y la GP_x disminuyen tras la estenosis renal. La catalasa aórtica también se encuentra disminuida en ratones genéticamente hipertensos (Uddin *et al.*, 2003). Por tanto, en estos modelos animales, la menor actividad de estas enzimas antioxidantes endógenas contribuye a la elevación de ROS, al no poderlas eliminar eficazmente.

El NO generado por el endotelio reacciona con el O₂⁻ a una velocidad superior a la de la SOD con este anión. Por tanto, un incremento de la producción de O₂⁻ podría ser la causa de una reducida biodisponibilidad de NO y una menor relajación dependiente de endotelio.

1.335 La hiperhomocisteinemia.

Un factor de riesgo no tradicional que conduce a la disfunción endotelial es la elevación de los niveles de homocisteína. Este hecho se ha demostrado en modelos animales de hiperhomocisteinemia (Viridis *et al.*, 2003). En humanos, pacientes normotensos con hiperhomocisteinemia muestran disfunción endotelial (Viridis *et al.*, 2001). La suplementación con ácido fólico redujo los niveles de homocisteína y mejoró la disfunción endotelial en niños con insuficiencia renal crónica (Bennet-Richards *et al.*, 2002). Los estudios celulares (Zhang y col., 2000), animales (Viridis *et al.*, 2003) y humanos (Viridis *et al.*, 2001) sugieren que la homocisteína reduce la biodisponibilidad de NO debido a estrés oxidativo. También existen evidencias de la acumulación de ADMA debida a la homocisteína, causado por la inhibición de DDAH (Stuhlinger *et al.*, 2003; Boger *et al.*, 2001; Stuhlinger *et al.*, 2001). Sin embargo, no todos los estudios apoyan esta afirmación (Wanby *et al.*, 2003), aunque estos mecanismos podrían explicar el incremento de riesgo cardiovascular en pacientes con hiperhomocisteinemia.

1.34 Valor pronóstico de la disfunción endotelial.

Puesto que la disfunción endotelial es un hecho que ocurre y se detecta previamente a cambios estructurales en la pared de los vasos (Davignon y Ganz, 2004) puede tener un valor pronóstico, sirviendo como predictor de sucesos cardiovasculares (Quyyumi, 2003; Perticone *et al.*, 2001).

La disfunción endotelial en arterias coronarias se ha asociado a sucesos cardiovasculares en pacientes con y sin enfermedad coronaria manifiesta (Halcox *et al.*, 2002; Schachinger *et al.*, 2000; Suwaidi *et al.*, 2000). La disfunción endotelial de la vasculatura periférica también tiene valor pronóstico. La realización de tests no invasivos de disfunción endotelial predijeron sucesos cardiovasculares en pacientes con enfermedad arterial periférica (Gokce *et al.*, 2003), hipertensión (Perticone *et al.*, 2001) y en pacientes que no sufrían daño vascular (Gokce *et al.*, 2002).

Perticone *et al.* (2001) demostraron que en pacientes hipertensos la disfunción endotelial, determinada mediante el test de ACh, es un marcador de futuros sucesos cardiovasculares para estos pacientes. El mismo grupo ha investigado recientemente la relación entre la disfunción endotelial del antebrazo y la función renal en 500 pacientes con hipertensión esencial no tratada y no complicada y con niveles de creatinina dentro del rango normal, demostrando que la respuesta vasodilatadora alterada estaba asociada a la pérdida de la función renal en pacientes con hipertensión esencial (Perticone *et al.*, 2004).

Bugiardini *et al.* (2004) han demostrado recientemente que el dolor torácico en mujeres con arterias coronarias angiográficamente normales no es totalmente benigno. Mujeres con angina de-novo, evidencia de defecto de perfusión cardiaca reversible, angiografía coronaria normal y disfunción endotelial de base, tenían elevado riesgo cardiovascular y mayor incidencia de enfermedad arterial coronaria.

La disfunción endotelial también se ha visto que puede ser un factor predictivo del riesgo de desarrollar hipertensión en mujeres postmenopáusicas (Rossi *et al.* 2004), ya que mujeres postmenopáusicas normotensas con disfunción

endotelial tenían más probabilidades que las que no padecían disfunción endotelial de sufrir hipertensión.

1.35 Tratamiento de la disfunción endotelial.

La disfunción endotelial está presente en muchas formas de enfermedad cardiovascular, como ya se vio (apartado 1.32). El tratamiento de la enfermedad principal puede restablecer la función endotelial, aunque sólo en algunas condiciones. En pacientes con insuficiencia renal crónica, el trasplante renal restablece la función renal y puede mejorar la disfunción endotelial (Passauer *et al.*, 2003).

En la hipertensión, la reducción de la presión arterial, no parece restaurar por sí misma la función endotelial, puesto que la terapia antihipertensiva mejora la disfunción endotelial pero no en todos los casos. Así, los α - y β -bloqueantes adrenérgicos no tienen efecto directo sobre la disfunción endotelial (Nadar *et al.*, 2004), aunque el tratamiento con carvedilol, fármaco perteneciente a la tercera generación de β -bloqueantes, inhibe el estrés oxidativo (Yasunari *et al.*, 2004). Los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), los antagonistas del receptor de Ang II (ARA-II) y los bloqueantes de canales de calcio, mejoran la disfunción endotelial en pacientes hipertensos (Nadar *et al.*, 2004; Schiffrin, 2004). Schiffrin *et al.* (2002a) mostraron que en pacientes con hipertensión esencial, el cambio del β -bloqueante atenolol por el antagonista del receptor de Ang II irbersartán corregía la función endotelial. También demostraron que el tratamiento con el antagonista de canales de calcio amlodipino, mejoraba la función endotelial en pacientes hipertensos mientras que el β -bloqueante atenolol, que ejercía el mismo control sobre la presión arterial, no (Schiffrin *et al.*, 2002b). Los ARA-II y los IECA son específicamente beneficiosos. Los mecanismos por los que el bloqueo del sistema renina-angiotensina pueden mejorar la disfunción endotelial incluyen la reducción del estrés oxidativo y de la inflamación (Schiffrin y Touyz, 2003).

En estados de resistencia a la insulina y en la diabetes, los mecanismos de disfunción endotelial son complejos. Se ha demostrado que los agonistas de receptores para activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR)- γ (como ciglitazona) reducen la presión arterial y mejoran la función endotelial en ratas Zucker obesas (Pershad Singh *et al.*, 1993).

Otra posibilidad para el tratamiento de la disfunción endotelial es actuar sobre los mecanismos de la enfermedad que conducen a la disfunción del endotelio. De esta forma, la disminución de los niveles de homocisteína en la hiperhomocisteinemia mediante la suplementación con ácido fólico mejora la disfunción endotelial (Bennet-Richards *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2000). El tratamiento oral con L-arginina, precursor de NO, reduce la presión arterial y mejora la función endotelial (Palloshi *et al.*, 2004). La BH₄ y sus análogos (Hyndman *et al.*, 2002), pueden también mejorar la función endotelial incrementando la biodisponibilidad del NO. Recientemente, se ha sugerido que el ácido acetil salicílico podría reducir el estrés oxidativo y mejorar así la función endotelial (Wu *et al.*, 2002). Se ha demostrado también que las estatinas mejoran la disfunción endotelial en modelos animales de hipertensión (Zhou *et al.*, 2004) y en pacientes hipertensos con niveles normales de colesterol (Danaoglu *et al.*, 2003), facilitando la activación de la eNOS e inhibiendo el estrés oxidativo. El tratamiento a largo plazo con las vitaminas antioxidantes C y E también mejora la disfunción endotelial *in vivo* (Kinlay *et al.*, 2004).

2. El modelo animal de hipertensión genética. Las ratas espontáneamente hipertensas o SHR.

El desarrollo de varias especies de ratas caracterizadas por presentar una hipertensión similar a la hipertensión esencial en humanos, determinada genéticamente, tiene un gran interés desde el punto de vista práctico y teórico. Entre los modelos experimentales de este tipo de hipertensión se encuentran aquellos que utilizan una determinada especie de ratas espontáneamente hipertensas, las SHR, y sus subespecies.

La primera referencia sobre SHR la encontramos en un artículo de Okamoto y Aoki (1963), donde se describía cómo la endogamia sistemática entre animales de la especie WKY, seleccionados por tener presiones arteriales elevadas, daba lugar a descendientes con valores de presión arterial considerablemente mayores que las de las especies progenitoras. Con posterioridad, fueron surgiendo subespecies de SHR que poseían, entre otras particularidades, una diferente vulnerabilidad a las lesiones vasculares. En todas ellas se sugirió una herencia poligénica (Louis *et al.*, 1969), donde varios componentes genéticos parecen actuar sinérgicamente.

En este modelo experimental, la hipertensión se caracteriza por desarrollarse gradualmente, de forma que se pueden diferenciar dos fases fundamentales: una fase de hipertensión lábil, que comienza a la edad de 4-6 semanas, y una fase de hipertensión establecida, que se alcanza a los 3-4 meses; además, el aumento de presión arterial se genera y se mantiene por un incremento de la resistencia vascular periférica, atribuida en su fase inicial, a una vasoconstricción funcional neurogénica y, posteriormente, a cambios estructurales vasculares relacionados con una síntesis acelerada de proteínas vasculares.

La elevación sostenida de la presión arterial requiere de la presencia, al menos, de una de las siguientes anormalidades: aumento del gasto cardíaco, resistencia periférica aumentada y disminución en la capacidad renal de excretar sodio. A su

vez, estas alteraciones se producen por modificación de distintos parámetros biológicos.

2.1 Volumen de líquido circulante.

En SHR, el gasto cardiaco es normal o está reducido, aunque algunos estudios describen un incremento del mismo en el estadio precoz de la hipertensión, atribuido a un aumento de la frecuencia cardiaca (Lundin y Hallback-Nordlander, 1980). Respecto a la regulación del volumen, la utilización renal de sodio y agua es normal, pero los riñones necesitan una mayor presión de perfusión para mantener su funcionalidad. La tasa de filtración glomerular sólo está reducida en los estadios avanzados de la hipertensión, cuando ya hay complicaciones vasculares renales extensas.

En definitiva, se puede decir que los factores relacionados con el volumen de líquido circulante no desempeñan un papel especialmente importante en el desarrollo de esta hipertensión (Trippodo *et al.*, 1978).

2.2 Sistema nervioso.

El incremento de la actividad del sistema nervioso simpático contribuye al desarrollo de hipertensión, debido a un aumento en la retención renal de sodio. De hecho, la enervación renal retrasa el desarrollo de la hipertensión en ratas jóvenes, de 7 semanas de edad (estadio precoz) (Winternitz, 1980); sin embargo, en la fase de hipertensión establecida (más de 18 semanas) no se producen cambios en los niveles de presión arterial.

Varios estudios han demostrado que son los mecanismos peptidérgicos y catecolaminérgicos centrales los que están alterados en varias regiones cerebrales, como el núcleo hipotalámico (Saavedra *et al.*, 1978; Versteeg *et al.*, 1976). También

se ha encontrado elevada la actividad de los sistemas hipotalámico-tiroideo e hipotalámico-corticoideo.

Graham *et al.* (1982) demostraron la existencia de un incremento en la densidad de los receptores α_2 y β_1 adrenérgicos en preparaciones de membrana renal de SHR respecto a las de ratas WKY, lo que explicaría la mayor retención de sodio que tiene lugar en este modelo de hipertensión. Se cree que el receptor α_2 adrenérgico del túbulo proximal es un sitio probable de anomalía que predispone al desarrollo de hipertensión genética en SHR.

El sistema nervioso simpático parece participar, pues, de forma decisiva en la patogénesis del modelo de hipertensión genética SHR

2.3 Estructura vascular.

El cambio hemodinámico más importante para el mantenimiento de esta hipertensión es el incremento de las resistencias periféricas totales. Doyle y Black (1955) demostraron que la hipertensión está asociada con un aumento en la reactividad del antebrazo (la infusión de agonistas provocó una mayor respuesta presora en los pacientes con hipertensión esencial que en los normotensos). Con posterioridad, Folkow relacionó, incluso desde el punto de vista cuantitativo, estos incrementos de la resistencia vascular y de la reactividad con las alteraciones que tienen lugar en la arquitectura de la pared vascular, y sugirió, que la hipertensión no cursa necesariamente con cambios en el acoplamiento excitación-contracción (Folkow, 1978; Folkow *et al.*, 1958). Demostró que las alteraciones en la estructura vascular consisten en el engrosamiento de la túnica media hacia el lumen, que disminuye su diámetro, y en el consiguiente aumento de la relación existente entre el grosor de la capa media y el diámetro del lumen (media/lumen).

Estos cambios han sido confirmados posteriormente por otros autores en pequeñas arterias subcutáneas procedentes de la región glútea (Schiffrin *et al.*, 1992; ; Izzard *et al.*, 1991; Korsgaard *et al.*, 1991; Aalkjaer *et al.*, 1987). En modelos

animales de hipertensión esencial, como el SHR, se han observado cambios similares en la estructura de las pequeñas arterias (disminución del lumen e incremento de la relación media/lumen) independientemente de la técnica utilizada para su detección (miográfica o histológica) o del vaso de resistencia examinado: mesentérico (Deng y Schiffrin, 1992; Mulvany *et al.*, 1985), cerebral (Baumbach y Heistad, 1989) o femoral (Bund *et al.*, 1991).

En hipertensos esenciales, estas alteraciones estructurales son consecuencia de la redistribución de los miocitos vasculares normales (a lo que se le denomina remodelado), sin que se modifique su crecimiento ni exista hipertrofia celular. En SHR, este remodelado se acompaña de un incremento en el número de CMLV (hiperplasia), aunque no se observa hipertrofia celular (Heagerty *et al.*, 1993).

Las CMLV reciben estímulos hemodinámicos y humorales anormales que afectan a su crecimiento, disposición geométrica y morfología, y que producen las modificaciones responsables de la aparición de las lesiones descritas. La hipertensión propicia el estiramiento de las células de la pared arterial y, con ello, el aumento de la tensión de la membrana plasmática, lo que da lugar a cambios en el citoesqueleto. En respuesta a estos estímulos se ponen en marcha los mecanismos de síntesis de ADN, ARN y proteínas, lo que se traduce en cambios en su crecimiento, proliferación y capacidad para la síntesis de componentes de la matriz extracelular. Los mecanismos no hemodinámicos implicados en el desarrollo de estas alteraciones son un condicionamiento genético y el desequilibrio local de sustancias que regulan el ciclo celular, a favor de aquellas que estimulan el crecimiento (Fortuno *et al.*, 1997).

2.4 Sistema renina-angiotensina.

En las ratas jóvenes SHR existe un claro aumento de la resistencia periférica junto con una disminución de la tasa de filtración glomerular y del flujo sanguíneo renal. Estos factores suponen bien un incremento de los sistemas

vasoconstrictores, bien una disminución de los sistemas vasodilatadores o ambas cosas. En este modelo de hipertensión, aunque los valores plasmáticos de renina son normales, parece que la alteración del sistema renina-angiotensina representa un importante papel. El contenido renal de renina está elevado en ratas jóvenes (desde el nacimiento hasta 4-6 semanas de edad) (Saito *et al.*, 1976) y desciende con la edad, al contrario de lo que ocurre en ratas WKY, cuya actividad plasmática de renina permanece estable durante toda la vida. Por otra parte, se ha comprobado que la administración crónica de un inhibidor de la enzima de conversión de la Ang II previene el desarrollo de la hipertensión en SHR jóvenes y revierte la hipertensión en SHR adultas, al reducir las resistencias periféricas (Richer *et al.*, 1983). Se han obtenido resultados contradictorios al examinar la reactividad vascular renal a Ang II exógena en riñones aislados y perfundidos de SHR; no obstante, Chatziantoniou *et al.* (1990) demostraron que la reactividad vascular a Ang II *ex vivo* se duplicaba en ratas SHR respecto de las ratas WKY de la misma edad. Todo esto hace suponer que el sistema renina-Ang está involucrado en la exagerada vasoconstricción que se produce en ratas jóvenes con hipertensión genética. Esta vasoconstricción inducida por la Ang II es posible que se deba a un incremento del número y/o la afinidad de los receptores de Ang II en la vasculatura renal de SHR o a un incremento, en las ratas WKY, de los sistemas vasodilatadores que se oponen a la acción de la Ang II.

Por otra parte, se ha observado que en SHR jóvenes, la Ang II estimula preferentemente la síntesis glomerular y renal de TXA₂, mientras que la producción de PGI₂ predomina en la edad adulta (Konieczkowski *et al.*, 1983). Se supone que la vasculatura de SHR jóvenes es más sensible a Ang II, debido a una deficiencia de prostanoïdes vasodilatadores endógenos y al consiguiente predominio de los prostanoïdes vasoconstrictores, responsable de la intensa vasoconstricción que caracteriza a este modelo de hipertensión.

Otro hecho que ratifica la participación del sistema renina-Ang en este tipo de hipertensión es la reducción de presión arterial que inducen los antagonistas de los receptores de Ang II (Wong *et al.*, 1990). Dada la actividad plasmática normal de

renina en SHR, se ha especulado con la posibilidad de que la renina derivada del riñón contribuya a la generación local de Ang II para mantener el tono vascular en estas ratas. Además, y puesto que los antagonistas de Ang II no promueven excreción de sodio y agua en este modelo de hipertensión y sí incrementan el flujo plasmático renal, se sugiere que la Ang II contribuye a la elevación de la resistencia vascular renal en SHR. Todos estos datos son bastante consistentes para formular la hipótesis de que el factor responsable de la elevada resistencia periférica y vascular renal en SHR sea una anomalía en el sistema renina-angiotensina tisular (Fenoy *et al.*, 1991).

2.5 Función endotelial.

El endotelio vascular es un “órgano” diana de la hipertensión ya que, como consecuencia de su localización, está expuesto a las fuerzas mecánicas sanguíneas. El principal mecanismo inductor y mediador de la disfunción endotelial hipertensiva es la presión arterial elevada, responsable de un incremento de las fuerzas de cizallamiento sobre las células del endotelio vascular. Ello puede dar lugar a modificaciones estructurales y/o funcionales que afectan a la producción, a la liberación y a los efectos de los distintos agentes vasoactivos (Luscher, 1990a). La disfunción endotelial se manifiesta como una reducida respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, o como una mayor respuesta vasoconstrictora (dependiente o independiente de endotelio), ambas resultantes de una alteración del equilibrio que normalmente existe entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores (Lahera *et al.*, 1997). Este desequilibrio conlleva una elevación de las resistencias vasculares periféricas totales y el mantenimiento o agravamiento de la hipertensión arterial.

Se ha observado, tanto en hipertensos esenciales como en modelos experimentales de hipertensión, una alteración en la regulación inducida por NO. Varios estudios han demostrado que, en estos casos, se reduce la liberación de

NO (Cosentino *et al.*, 1998; Tschudi *et al.*, 1996) y, en consecuencia, también la vasodilatación dependiente de NO (Panza *et al.*, 1993b; Lüscher y Vanhoutte, 1986). Esto indica que la hipertensión está relacionada con la disfunción endotelial subyacente en la reducida biodisponibilidad de NO. Sin embargo, esta conclusión se sostiene principalmente por los resultados obtenidos con agonistas que estimulan la formación de NO, pero los datos referentes a la regulación basal del NO en hipertensión son contradictorios. En SHR, los efectos vasoconstrictores observados con inhibidores de NO y la expresión y actividad de la eNOS pueden estar incrementadas (Maffei *et al.*, 2002; Nava *et al.*, 1998; Vaziri *et al.*, 1998; Radaelli *et al.*, 1998) o disminuidas (Chou *et al.*, 1998). También existen discordancias entre los resultados obtenidos con otros indicadores de la síntesis de NO, como la concentración en plasma y orina de metabolitos de NO (Vaziri *et al.*, 1998) o la formación de cGMP (Ruetten *et al.*, 1999; Nava *et al.*, 1998). Por lo tanto, la regulación de NO basal en la hipertensión no está suficientemente aclarada. El aumento de la formación basal de NO se interpreta como un intento ineficaz, por parte del endotelio, para equilibrar la excesiva producción vascular de radicales libres derivada del incremento del catabolismo de NO (Nava *et al.*, 1998). En definitiva, aunque la disfunción endotelial hipertensiva se entienda como una respuesta defectuosa a la estimulación de la liberación de NO por agonistas, este concepto tiene que ser también aplicado a la producción de NO basal.

Todos los estudios que se han realizado para analizar la función endotelial en hipertensión han utilizado métodos indirectos (expresión o actividad de eNOS, determinación de metabolitos de NO, etc), lo que supone ciertas limitaciones. La medida directa de la producción de NO requiere técnicas sofisticadas (debido a su corta vida media y a que se produce en muy poca cantidad) como la fluorescencia DAF-2, que ha permitido observar, en anillos aórticos de SHR, un incremento en la producción de NO basal y una respuesta menor a la liberación de NO inducida por agonistas en comparación con sus controles, las ratas WK.Y (Maffei *et al.*, 2002).

También se ha sugerido que una producción exagerada de radicales libres, como el, sea responsable de la disfunción endotelial en el modelo SHR (Grunfeld *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1995). De hecho, la reducción de la producción de O_2^- mediante aloxantina, un inhibidor de la XO (Miyamoto *et al.*, 1996), o mediante CuZn-SOD (Nakazono *et al.*, 1991) disminuye de forma aguda la presión arterial en ratas SHR. También se ha descrito que la administración crónica de antioxidantes como la vitamina E (Chen *et al.*, 2001) revierte la disfunción endotelial hipertensiva y reduce la presión arterial. Estos O_2^- tienen la capacidad, como ya se describió, de oxidar el NO (eliminando así su efecto beneficioso) y producir ONOO⁻, que tiene una potente acción oxidante y produce lesión celular a nivel estructural y molecular (Rubanyi y Vanhoutte, 1986). El ONOO⁻ reacciona con el AA y produce 8-isoprostaglandina $PGF_{2\alpha}$, que es un potente vasoconstrictor que incrementa la presión arterial (Morrow y Roberts, 1996). Además, varios estudios han demostrado que los O_2^- pueden actuar como vasoconstrictores (Cosentino *et al.*, 1994; Auch-Schwelk *et al.*, 1989) y estimulantes de la proliferación celular por sus efectos mitogénicos directos sobre las CMLV (Gong *et al.*, 1996; Rao y Berk, 1992).

Otro mecanismo que puede estar involucrado en la disfunción endotelial en SHR es el aumento de la producción de un factor endotelial constrictor. Se especula con un derivado prostanoide del tipo prostaglandina H_2/TXA_2 que podría expresarse localmente en exceso, puesto que la incubación de anillos aórticos de animales SHR en presencia del inhibidor de la COX, indometacina, reduce la disfunción endotelial en respuesta a la ACh (Lahera *et al.*, 1993; Luscher *et al.*, 1990). Estudios publicados recientemente por nuestro grupo señalan que puede ser la PGH_2 el compuesto responsable del efecto vasoconstrictor (Vera *et al.*, 2005).

3. Flavonoides.

3.1 Generalidades.

Dentro de los compuestos polifenólicos, los flavonoides representan la clase más importante y numerosa (Rice-Evans *et al.*, 1998). Son miles de sustancias producidas como metabolitos secundarios por las plantas y con muy diversas funciones en ellas, como antifúngicos, bactericidas, quelantes de metales, protectores de radiación ultravioleta, colorantes y controladores de las auxinas reguladoras del crecimiento y la diferenciación en los vegetales, cuyo elemento estructural común es que todas poseen un esqueleto de difenilpirano ($C_6-C_3-C_6$), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo (C) de pirano (Martínez-Flórez *et al.*, 2002) (Figura 10). Sobre este esqueleto pueden darse miles de sustituciones, lo que origina las diferentes clases de flavonoides: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles (catequinas y proantocianidinas), antocianidinas, chalconas, auronas e isoflavonas (Figura 11).

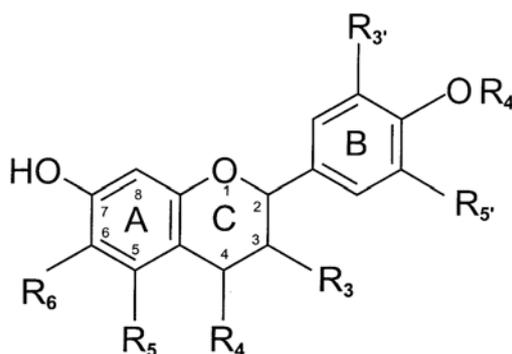
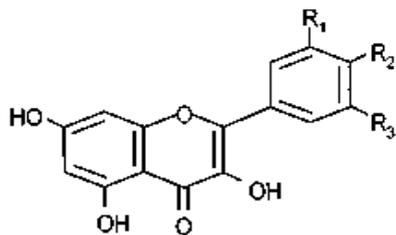


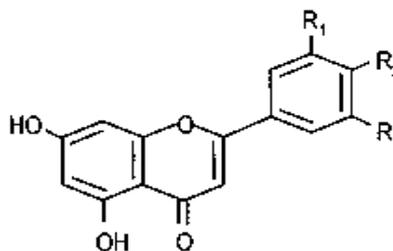
Figura 10. Estructura general de los flavonoides y numeración de sus sustituyentes.

Flavonoles



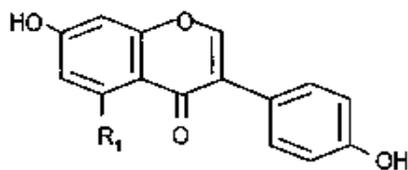
$R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: Quercetina
 $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: Isorhamnetina
 $R_2 = \text{OH}; R_1 = R_3 = \text{H}$: Kaempferol

Flavonas



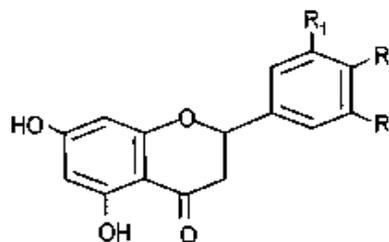
$R_1 = \text{H}; R_2 = \text{H}$: Apigenina
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Luteolina

Isoflavonas



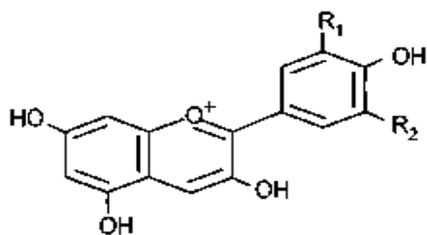
$R_1 = \text{H}$: Daidzeina
 $R_1 = \text{OH}$: Genisteina

Flavanonas



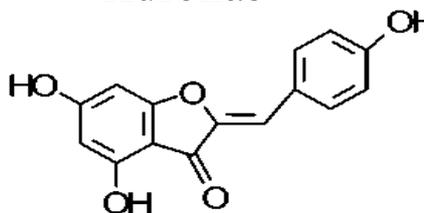
$R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$: Naringerina
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Eriodictiol
 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OCH}_3$: Hesperedina

Antocianidinas



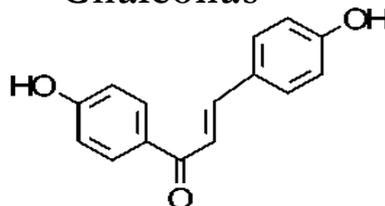
$R_1 = R_2 = \text{H}$: Pelargonidina
 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$: Cianidina
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Delfinidina

Auronas



Hispidol

Chalconas



Isoliquiritigenina

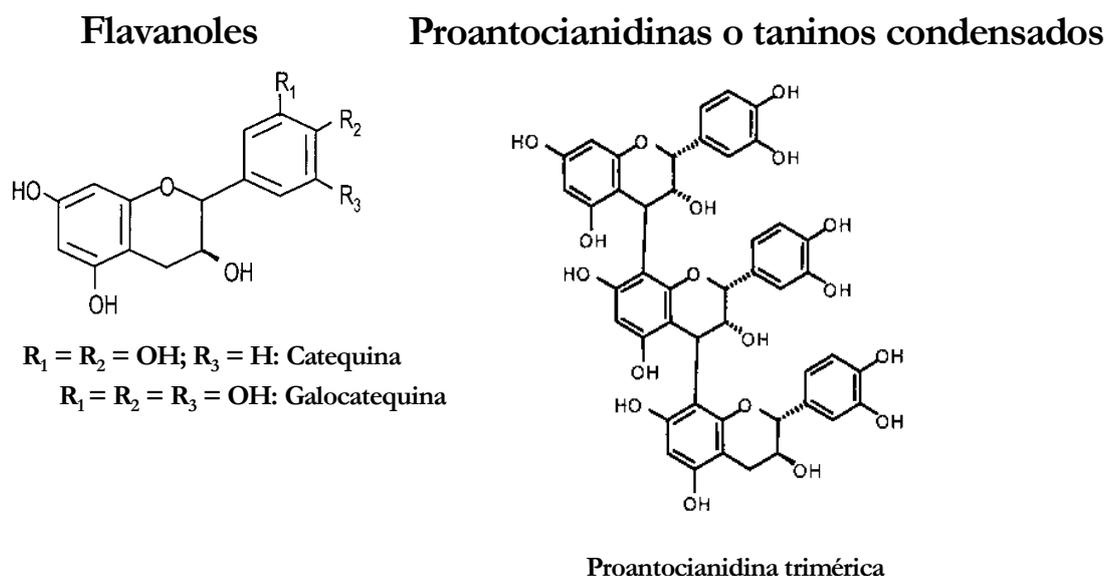


Figura 11. Principales grupos de flavonoides y sus representantes más significativos.

Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, encontrándose en cantidades variables en frutas, verduras, semillas, especias y bebidas derivadas de vegetales, como el te, las infusiones, el mosto, los zumos y el vino, por lo que entran a formar parte de nuestra dieta (Macheix *et al.*, 1990). El consumo diario medio en humanos de flavonoles más flavonas se ha calculado en unos 20-25 mg (Manach *et al.*, 2004), pero hay grandes variaciones dependiendo de los hábitos nutricionales y las zonas geográficas, por ejemplo, desde 5 a 125 mg de flavonoles por día en Italia, a una media de 82 mg de antocianidinas en Finlandia, alcanzando incluso los 200 mg, y variando el consumo de flavonoles más flavonas en Alemania de 4 a 100 mg al día, con un consumo medio estimado en 23 mg (Sampson *et al.*, 2002; Heinonen 2001; Pietta *et al.*, 1996; Hertog *et al.*, 1993), llegando a ser la ingesta diaria media del total de polifenoles probablemente de alrededor de 1 g (Kuhnau *et al.*, 1976). El vino tinto, por ejemplo, contiene 1,8 g/l de polifenoles, entre los que los flavonoides forman el grupo mayoritario, con concentraciones entre 1,36-1,5 g/l (Waterhouse, 2002).

El interés en los flavonoides presentes en la dieta ha aumentado en los últimos años debido a la publicación de numerosos estudios epidemiológicos que han mostrado una correlación inversa entre el consumo diario de flavonoles y flavonas, y una menor incidencia y mortalidad de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Geleijnse *et al.*, 2002; Hertog *et al.*, 1996; Hertog *et al.*, 1993). El meta-análisis de siete estudios de cohortes prospectivos determinó que estar entre los individuos del tercio superior en la ingesta diaria de flavonoles se asociaba a un menor riesgo de mortalidad debida a enfermedad cardíaca coronaria, comparados con el tercio inferior después de ajustar el resto de factores de riesgo y de otros componentes dietéticos (Huxley y Neil 2003).

Esto ha llevado también en los últimos años a un gran interés sobre los efectos de los flavonoides en el endotelio vascular, como demuestran el gran número de estudios experimentales e incluso algunos clínicos (Duarte *et al.*, 2001; Appel *et al.*, 1997), ya que parece ser una de las claves de sus efectos cardioprotectores. La dificultad estriba en que al ser los flavonoides un grupo tan numeroso y heterogéneo, sus efectos pueden diferir entre ellos tanto cuantitativa como cualitativamente. La mayoría de los datos disponibles se basan en alimentos ricos en flavonoides, como el coco, o en bebidas que los contienen en altas proporciones, como el vino, los zumos y el té; o en extractos de vino o zumos de frutas; o en algunos compuestos aislados como kaempferol, delphinidina y quercetina; lo cual hace muy difícil extrapolar resultados al comparar unos con otros. El flavonol quercetina representa el 60-75% del total de flavonoles más flavonas de la dieta (Hertog *et al.*, 1993), siendo las principales fuentes de flavonoles, y sus concentraciones medias: las cebollas (350-1200 mg/kg), la col rizada (300-600 mg/kg), el puerro (30-225 mg/kg), los tomates cherrys (15-200 mg/kg), el brócoli (40-100 mg/kg), los arándanos (30-160 mg/kg), las manzanas (20-40 mg/kg), las habas (10-50 mg/kg), las uvas tintas (15-40 mg/kg), la infusión de te negro (30-45 mg/l), la infusión de te verde (20-35 mg/l) y el vino tinto (2-30 mg/l) (Manach *et al.*, 2004). Un amplio rango de acciones biológicas de los flavonoides, incluyendo sus propiedades antioxidantes, antiagregantes plaquetarias

y vasodilatadoras (Rice-Evans *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 1993) (Figura 12), concuerdan con los efectos protectores de quercetina en los modelos estudiados de enfermedades cardiovasculares (Galisteo *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2001), por lo que puede representar uno de los principales promotores de los saludables efectos cardiovasculares de los flavonoides.

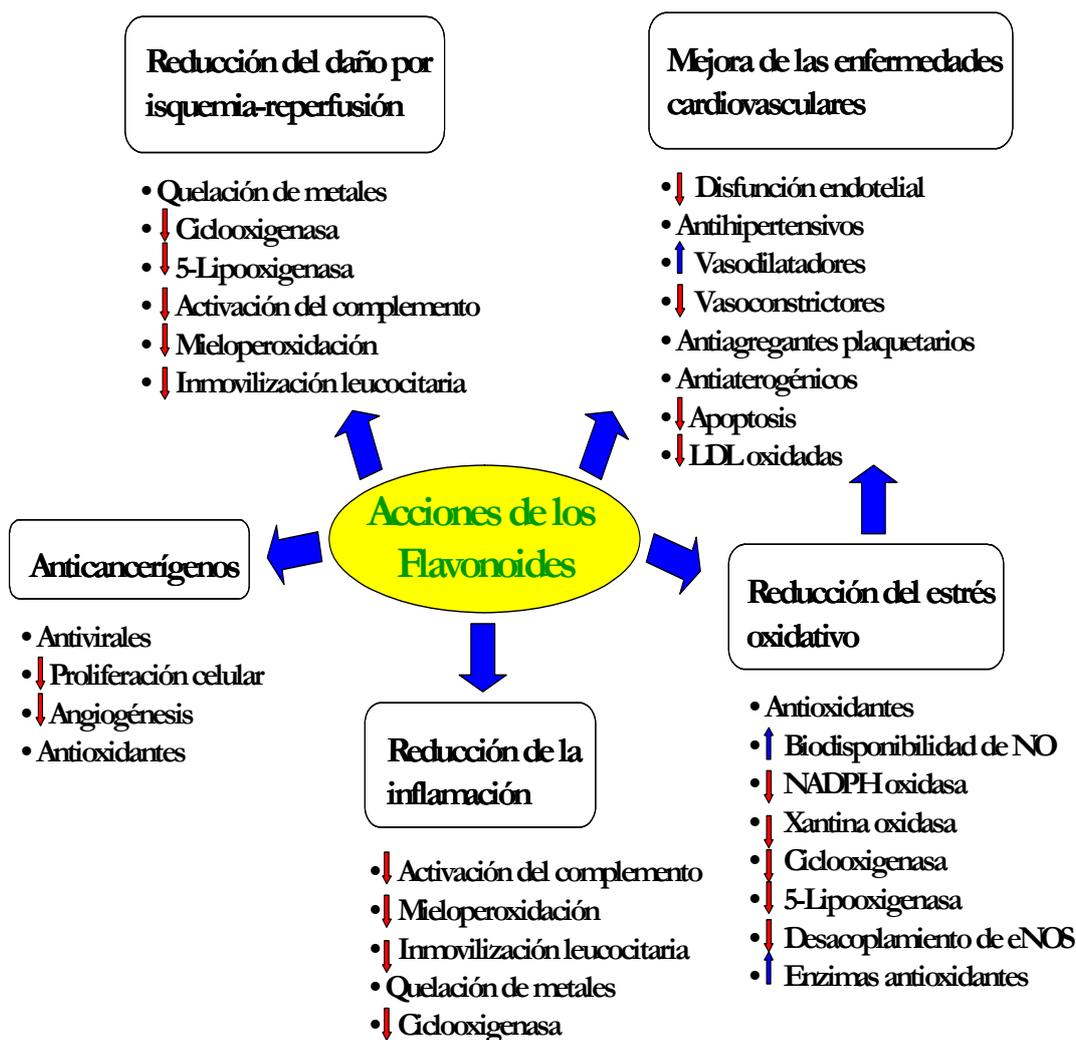


Figura 12. Esquema de las actividades biológicas de los flavonoides y sus principales efectos saludables. ↓ :Disminución, inhibición. ↑ :Aumento, estimulación.

3.2 Proceso ADME de flavonoides y quercetina.

Los flavonoles han sido muy estudiados, principalmente porque se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales que forman parte de nuestra dieta (Hertog *et al.*, 1993).

Los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción que se dan en el organismo han sido ampliamente estudiados para algunos de los flavonoides, pero debido a sus diversos efectos y propiedades, es difícil extrapolar resultados o asumir un mismo mecanismo o proceso para todos, por eso nos centraremos en la quercetina, el principal flavonol objeto de esta Tesis, del que se sabe bastante sobre su farmacocinética.

3.21 Absorción.

En los alimentos, todos los flavonoides, excepto los flavanoles, se encuentran como glicósidos (unidos a diferentes azúcares), lo que influye en su absorción (aunque no en la proporción de sus metabolitos circulantes). Aunque en estudios anteriores no se había observado, Hollman *et al.* (1995) demostraron que quercetina era absorbida por los humanos. Quercetina y otros flavonoides puede ser absorbida en el estómago, pero no sus formas glicosiladas (Crespy *et al.*, 2002). Sólo las agliconas y algunos glucósidos pueden absorberse en el intestino delgado, otros, como los rhamnósidos, necesitan ser hidrolizados por las rhamnosidasas de la microflora colónica antes de absorberse, por lo que las agliconas y glucósidos se absorben más rápido, lo que está claro en el caso de quercetina. El pico máximo de absorción se da a las 0,5-0,7 horas tras la ingestión de quercetina 4'-glucósido, y tras 6-9 horas tras la ingestión de rutina (quercetina-3 β -rutósido) (Graerfe *et al.*, 2001). Los glucósidos de quercetina se absorben en el intestino delgado, y más eficazmente incluso que la aglicona sola debido probablemente a la existencia de un transportador de glucosa dependiente de sodio en la membrana de los

enterocitos, el SGLT1 (Hollman *et al.*, 1995), en los cuales serían hidrolizados por β -glucosidasas. La mayoría de los polifenoles son probablemente demasiado hidrofílicos para atravesar la pared intestinal por difusión pasiva, pero no se han identificado claramente los transportadores de membrana que deben estar implicados en su absorción. Así, la biodisponibilidad de quercetina varía según las diferentes fuentes alimenticias, dependiendo del tipo de glicósidos que contengan. Por ejemplo, las cebollas, que contienen glucósidos, son mejores fuentes de quercetina biodisponible que las manzanas o el te, que contienen rutina y otros azúcares.

Durante muchos años se discutió la presencia en plasma de glicósidos de quercetina, pero actualmente está aceptado que estos compuestos no se encuentran en el plasma a dosis nutricionales, y que prácticamente tampoco está presente como aglicona, sino en sus formas conjugadas (Graefe *et al.*, 2001; Sesink *et al.*, 2001).

3.22 Metabolismo.

El 20-40% de quercetina es metilada en la posición 3', formándose isorhamnetina (Day *et al.*, 2001). La catecol-O-metil transferasa (COMT) es la enzima que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la s-adenosil-l-metionina a polifenoles con una parte catecólica, y aunque está presente en numerosos tejidos, es sobre todo activa en el hígado y los riñones. Tras la ingestión de cebollas, ricas en quercetina, se encontraron en plasma los metabolitos quercetina-3-O-glucurónido, 3'-O-metilquercetina-3-O-glucurónido y quercetina-3'-O-sulfato mayoritariamente (Day *et al.*, 2001). Las sulfotransferasas catalizan la transferencia de un grupo sulfato de la 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato a un grupo hidroxilo en diversos substratos, como los flavonoides, lo que ocurre en el hígado (Piskula MK. *et al.*, 1998). Y las UDP-glucuronosiltransferasas, enzimas unidas a membrana en el retículo endoplásmico de numerosos tejidos, son las encargadas de catalizar la transferencia de un grupo

glucurónico desde el ácido UDP-glucurónico a la mayoría de los constituyentes de la dieta, como los flavonoides. En ratas, la glucuronidación de los polifenoles se da en el intestino delgado, en los enterocitos, antes de la posterior conjugación hepática (Crespy *et al.*, 2001), lo que probablemente se dé también en humanos.

Además de las transformaciones que se dan durante estos procesos, la microflora intestinal también puede producir ácidos fenólicos y aromáticos a partir de los flavonoides. Así, la degradación de quercetina produce principalmente ácido 3,4-dihidroxifenil acético, ácido 3-metoxi-4-hidroxifenil acético, ácido 3 hidroxifenil acético y quercetina 3'-O-sulfato (Aura *et al.*, 2002; Day *et al.*, 2001). La excreción urinaria de metabolitos microbianos fue de alrededor del 50% de la dosis en voluntarios tratados con 75 mg de rutina (Sawai *et al.*, 1987), lo que muestra la importancia de estos procesos.

3.23 Distribución.

La incubación *in vitro* de quercetina con plasma sanguíneo humano mostró que ésta se une ampliamente a proteínas plasmáticas (un 99% a concentraciones por encima de 15µM/L). También sus metabolitos se unen intensamente a proteínas plasmáticas en el plasma de ratas alimentadas con una dieta enriquecida en quercetina (Manach *et al.*, 1995), principalmente a albúmina. El efecto de la conjugación es desconocido, pero probablemente dependerá de la posición de la sustitución, y ya se demostró (Dangles *et al.*, 1999) que la parte catecol de la quercetina unida a albúmina permanecía accesible a agentes oxidantes, lo que sugiere que quercetina podría ejercer sus efectos, antioxidantes y demás, incluso unida a proteínas plasmáticas.

La partición de los polifenoles y sus metabolitos entre las fases acuosas y lipídicas es ampliamente favorable a la acuosa, por su hidrofilia y su unión a albúmina. Pero en algunos modelos de membranas lipofílicas, algunos polifenoles penetraron las membranas en diferentes grados. Quercetina mostró la interacción

más profunda, probablemente debido a su capacidad para adquirir una conformación planar (Van Acker *et al.*, 1996).

Las concentraciones plasmáticas obtenidas con quercetina son muy variadas dependiendo de los estudios. Las concentraciones medias para quercetina tras una noche de ayuno fueron de unos 50-80 nM/L, y los valores disminuyeron con una dieta pobre en polifenoles en voluntarios sanos (Erlund *et al.*, 2002). En otros estudios, la concentración en plasma alcanzó 1,5 μ M/L tras 28 días de suplementación con una alta dosis de quercetina (más de 1 g/día) (Conquer *et al.*, 1998), y 0,63 μ M/L tras la suplementación con 80 mg/día de quercetina durante 1 semana (Moon *et al.*, 2000). En el trabajo comparativo de 97 estudios de biodisponibilidad de polifenoles en humanos (Manach *et al.*, 2005), se determinó que la concentración máxima media en plasma para los glucósidos de quercetina era de $1,46 \pm 0,45 \mu$ M/L. Hay que señalar que hay una gran variación interindividual, ya que unas personas pueden absorber mejor que otras, posiblemente debido a polimorfismos de las enzimas intestinales o los transportadores.

Actualmente, sin embargo, la determinación de la biodisponibilidad de los polifenoles y sus metabolitos en los tejidos parece ser mucho más importante que el conocimiento de sus concentraciones plasmáticas, pero los datos son muy escasos, incluso en animales. A través de polifenoles marcados radiactivamente, se ha determinado que de 1 a 6 horas después de una única dosis en ratas o ratones, estos compuestos se encuentran distribuidos por sangre y tejidos del sistema digestivo, como estómago, intestino e hígado (Mullen *et al.*, 2002; Ueno *et al.*, 1983). Pero también se han detectado en muchos más tejidos, como cerebro, células endoteliales, corazón, riñones, páncreas y huesos (Youdim *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000). Las concentraciones en estos tejidos fueron de 30 a 3000 ng de aglicona/ g de tejido, dependiendo de la dosis administrada y el tejido considerado. Es importante señalar respecto a este tema que algunos tejidos son capaces de incorporar polifenoles mediante mecanismos específicos. Así, el endotelio parece ser uno de los principales lugares de acción de los

flavonoides, ya que incluso hay un rápido sistema de transporte activo en las células endoteliales aórticas para la entrada en ellas de flavonoides como morina (Schramm *et al.*, 1999). La naturaleza de los metabolitos en los tejidos podría ser distinta de los encontrados en sangre, debido a la entrada o eliminación específica tisular de algunos metabolitos o a un metabolismo intracelular. Aunque hay pocos estudios al respecto (Maubach *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2002), estos indican que las concentraciones plasmáticas de flavonoides no están directamente relacionadas con las concentraciones de éstos en los tejidos diana, y que la distribución entre sangre y tejidos también varía dependiendo de los polifenoles tratados.

Una característica de la biodisponibilidad de quercetina, que la diferencia de la mayoría de los flavonoides, es que la eliminación de sus metabolitos es muy lenta, con unas vidas medias de entre 11-28 horas (Graefe *et al.*, 2001), lo que facilita su acumulación en plasma y tejidos tras dosis repetidas o un consumo frecuente de productos vegetales, que alarga la duración de sus efectos.

3.24 Excreción.

Los polifenoles pueden ser excretados por la vía urinaria, o por la biliar los metabolitos más grandes o extensamente conjugados, dependiendo del polifenol en cuestión. La excreción biliar de estos compuestos en humanos no se ha examinado, por lo que todos los datos hacen referencia a animales de laboratorio. Las bacterias intestinales, gracias a sus β -glucuronidasas, pueden liberar las agliconas de los metabolitos conjugados secretados con la bilis, y estas agliconas pueden ser reabsorbidas, entrando en un ciclo enterohepático, lo que parece demostrado en ratas para la genisteína (Coldham *et al.*, 2000) y en humanos para hesperidina y las isoflavonas de la soja (Manach *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 1998).

Para quercetina y sus glicósidos la excreción urinaria es del 0,3-1,4% de la dosis ingerida (Graefe *et al.*, 2001), o $2,5 \pm 1,2\%$ según el resultado global de los 97 estudios sobre biodisponibilidad de flavonoides (Manach *et al.*, 2005). Estos

bajos valores no están muy alejados entre sí, e indican una importante excreción biliar lo que concuerda con su intenso metabolismo.

3.3 Efectos vasculares *in vitro* de quercetina.

Los efectos vasculares de varios flavonoides se han estudiado ampliamente en ensayos *in vitro*. Sin embargo, hay que tener mucho cuidado a la hora de extrapolar el resultado de estos estudios para explicar los efectos *in vivo*, puesto que la biodisponibilidad de los flavonoides no se conoce con exactitud.

Como ya se ha explicado en el apartado 3.2, quercetina se metaboliza intensamente, primero en los enterocitos y después en el hígado, por lo que se cree que muchos de sus efectos *in vivo* podrían deberse a sus metabolitos conjugados. Pero los estudios sobre los efectos de estos metabolitos es muy escasa y, hasta el momento, no se sabe qué efectos *in vitro* del flavonoide “madre” pueden corresponderse también con los de sus metabolitos.

3.31 Efecto directo sobre el tono del músculo liso y la proliferación de fibras musculares.

Tanto quercetina como otros flavonoides relacionados ejercen un efecto vasodilatador directo, no mediado por endotelio, en arterias aisladas (Duarte *et al.*, 1993; Duarte *et al.* 1993b; Fitzpatrick *et al.* 1993). Este efecto vasodilatador se da en arterias contraídas con diferentes agentes vasoconstrictores, como NA, ET-1, TXA₂, ésteres de forbol (activadores de PKC), y KCl. Los mecanismos moleculares involucrados podrían estar relacionados con diferentes acciones sobre proteínas-quinasas como la kinasa de cadenas ligeras de miosina (MLCK) y PKC. Es interesante resaltar que quercetina y sus metabolitos no conjugados son más potentes en arteria coronaria (Ibarra *et al.*, 2002) y en arterias de resistencia que en vasos de conductancia (como la aorta) (Pérez-Vizcaino *et al.*, 2002).

Distintos estudios han mostrado que quercetina (y otros polifenoles) inhibe la proliferación e hipertrofia de células del músculo liso vascular en cultivos celulares. Así, los efectos inhibidores de quercetina sobre la síntesis de ADN en células del músculo liso vascular estimuladas con TNF- α parecen estar relacionados con una menor actividad de ERK 1/2 (Moon *et al.*, 2003), una kinasa importante en la proliferación y diferenciación celulares. Sin embargo, en células de músculo liso vascular estimuladas con angiotensina II, tanto quercetina como sus metabolitos glucurono conjugados inhibieron la hipertrofia celular disminuyendo la vía de la JNK (Yoshizumi *et al.*, 2002). Quercetina bloquea el ciclo celular en la fase G1, como consecuencia de la regulación a la baja de ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y la regulación al alza de la expresión del inhibidor de CDK p21 en células del músculo liso vascular (Iijima *et al.*, 2002). Además, quercetina estimula la apoptosis de las células musculares lisas vasculares con fenotipo intimal, que predominan en el proceso de génesis de la placa de ateroma (Pérez-Vizcaino *et al.*, 2006)

3.32 Efectos sobre el óxido nítrico.

Se ha descrito un efecto vasodilatador dependiente de endotelio para numerosos flavonoides, como delfinidina y crisina (Duarte *et al.*, 2001b; Andriambeloso *et al.*, 1999), pero para otros, como quercetina, este efecto podría estar enmascarado por una vasodilatación directa, independiente de endotelio (Andriambeloso *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 1993). La vasodilatación dependiente de endotelio inducida por una mezcla de polifenoles del vino y por delfinidina es inhibida por inhibidores de NOS, indicando que está mediada por la vía del NO-cGMP. Este efecto parece estar relacionado con una mayor producción de NO más que con una protección del NO. Estos flavonoides aumentan los niveles citosólicos de Ca²⁺ (Andriambeloso *et al.*, 1999, 1998,1997), lo que activa la eNOS. Este aumento de Ca²⁺ en células endoteliales se inhibió con una mezcla de Cat y SOD, lo que indica que está relacionado con la generación de O₂⁻ inducida

por los polifenoles (Duarte *et al.*, 2004). Por el contrario, crisina provoca la activación de la eNOS por una vía independiente de calcio y relacionada con la fosforilación a través de la PKB (Villar *et al.*, 2005).

Los flavonoides, al captar O_2^- o disminuir su síntesis, protegen al NO de su inactivación por O_2^- , aumentando su vida media y sus efectos vasculares (López-López *et al.*, 2004). Debido a sus acciones antioxidantes, los flavonoides pueden proteger al cofactor de la eNOS, BH_4 de la oxidación y así evitar el desacoplamiento de la enzima y la generación de O_2^- por ésta. Así, cuando hay gran cantidad de O_2^- , los flavonoides aumentan los niveles de NO y la vasodilatación dependiente de endotelio, revirtiendo el estrés oxidativo que provoca la disfunción endotelial.

Sin embargo, los flavonoides, paradójicamente, también pueden captar NO (Van Acker *et al.*, 1995), o auto oxidarse en medios acuosos, produciendo O_2^- , lo que lleva también a la inactivación de NO (López-López *et al.*, 2004). Pero la velocidad de captación de NO por los flavonoides, entre ellos quercetina, es muy baja, menor incluso que la de hemoglobina, que es un captador fisiológico de NO.

El NO produce la vasodilatación arterial activando la GCs en las CMLV, aumentando así su contenido en cGMP (Warner *et al.*, 1994). Este cGMP es metabolizado por las PDEs, por lo que las acciones del NO y la vasodilatación dependiente de endotelio están muy influenciadas por la actividad de las estas enzimas. Así, la inhibición de PDEs, puede prevenir la disfunción endotelial en determinadas circunstancias (Vlachopoulos *et al.*, 2003). Muchos flavonoides se ha demostrado que inhiben numerosas isoformas de PDEs (Picq *et al.*, 1989), por lo que la inhibición de PDEs podría ser otro mecanismo por el cual los flavonoides prevendrían la disfunción endotelial .

Los flavonoides también pueden regular la actividad del NO influyendo sobre el ARNm de eNOS o sobre la expresión proteica de la enzima, como demuestra el hecho de que la incubación a largo plazo de células endoteliales con polifenoles del vino o con antocianidina, aumentó la expresión de eNOS aunque la mayoría de los flavonoides no tuvo efecto (Wallerath *et al.*, 2003).

3.33 Efectos antioxidantes.

Los efectos beneficiosos de los flavonoides suelen atribuirse generalmente a su gran capacidad antioxidante. Quercetina y otros flavonoides son potentes captadores de ROS, como el O_2^- , OH^- y H_2O_2 , a concentraciones micromolares (Ozgova *et al.*, 2003). También se ha demostrado que los metabolitos glucurónidos de quercetina tienen propiedades antioxidantes (Moon *et al.*, 2001). Pero aparte de estas propiedades como captadores de ROS, los flavonoides son capaces de inhibir numerosas enzimas generadoras de ROS, lo que puede ser aún más importante. Entre estas se incluyen la XO (Chang WS. *et al.*, 1993), la COX (Ferrandiz *et al.*, 1991) y la NAD(P)H oxidasa de membrana en neutrófilos (Tauber AI. *et al.*, 1984) y en CMLV (Lodi *et al.*, 2006). También pueden estimular otras con capacidad antioxidante, como Cat y SOD (Sudhees *et al.*, 1999). Al disminuir las concentraciones celulares de O_2^- a través de estos mecanismos, los flavonoides protegen el NO y aumentan su actividad biológica. Además, son potentes inhibidores de la oxidación de las LDL, un proceso clave en la patogénesis de la aterosclerosis. Las propiedades hidrofílicas de los flavonoides facilitan su localización en la fase acuosa y protegen a los lípidos, la vitamina E y las LDL del ataque inicial de radicales hidrofílicos. Además, los flavonoides previenen la citotoxicidad de las LDL oxidadas.

Sin embargo, los flavonoides también pueden ser pro-oxidantes, como ya se comentó en el apartado 1.32. Quercetina puede auto-oxidarse en soluciones acuosas y generar radicales libres (López-López *et al.*, 2004), además de disminuir los niveles de tioles intracelulares, como el glutatión. Pero este efecto pro-oxidante puede ser paradójicamente beneficioso, ya que podría jugar un papel positivo en la disfunción endotelial, porque la generación de O_2^- en las células endoteliales puede estimular la señal del Ca^{2+} y aumentar así la actividad eNOS y la liberación de EDHF (Duarte *et al.*, 2004).

3.34 Efectos sobre el factor hiperpolarizante derivado de endotelio.

Los flavonoides pueden también producir vasodilatación dependiente de endotelio estimulando la liberación del EDHF. Así, los polifenoles del vino tinto producen una relajación dependiente de endotelio e hiperpolarización en anillos de arteria coronaria porcina en presencia de una combinación de inhibidores de NOS y COX (Ndiaye *et al.*, 2003). Estos efectos se inhibieron con la combinación de charibdotoxina más apamina, y se redujo con antioxidantes, análogos de SOD permeable a membranas, y DPI, el inhibidor de enzimas con grupos flavín. Esto muestra que dichos polifenoles producen una relajación mediada por EDHF relacionada con mecanismos prooxidantes. La flavona crisina también se ha sugerido que libera EDHF además de NO en lecho vascular mesentérico perfundido (Villar *et al.*, 2004).

3.35 Efectos sobre endotelina-1.

Bajas concentraciones de polifenoles de vino tinto son suficientes para inhibir poderosamente la liberación de ET-1 y la transcripción de pre-pro-endotelina-1 en células endoteliales aórticas bovinas. Pero ninguno de los compuestos aislados (como quercetina o resveratrol) tuvo esa capacidad a esas concentraciones (Corder *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha visto que quercetina es capaz, a concentraciones de 0,5-50 μM , de inhibir la liberación de ET-1 en células endoteliales umbilicales humanas cultivadas (Zhao *et al.*, 1999). Aunque no hay datos disponibles de los efectos *in vivo* de flavonoides aislados sobre la producción de ET-1, nuestro equipo ha demostrado recientemente que la administración crónica de los polifenoles del vino tinto disminuyen los niveles plasmáticos de ET-1 en ratas con hipertensión DOCA-sal (Jiménez *et al.*, 2007).

3.36 Efectos sobre la apoptosis y la proliferación de células endoteliales.

La apoptosis de células endoteliales evidentemente influye sobre la permeabilidad del endotelio vascular, lo que puede facilitar el desarrollo de diversas patologías. Los flavonoides han demostrado tener un doble efecto en la apoptosis de estas células, ya que pueden ejercer efectos antiapoptóticos o proapoptóticos, para mantener la adecuada integridad y funcionalidad del endotelio.

In vitro, ejercen efectos que protegen de la apoptosis mediada por LDL oxidadas y H₂O₂ en células endoteliales de aorta bovina y fibroblastos (Vieira *et al.*, 1998), lo que parece estar relacionado con la homeostasis del calcio. También otro flavonoide del vino, delphinidina, protege a las células endoteliales de la apoptosis además de aumentar la expresión de eNOS a través de un mecanismo sensible a la inhibición de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Martin *et al.*, 2003).

También se ha observado que algunos flavonoides promueven la apoptosis de células tumorales (Pan *et al.*, 2000), y pueden modular el nivel de expresión de proteínas protectoras (Bcl-2, Bcl-xL, A1) o factores proapoptóticos (Bax, Bid, Bak) (Nam *et al.*, 2001).

Hay pocos estudios sobre los efectos de los flavonoides en la proliferación endotelial, aunque en general se consideran inhibidores de este proceso. Tanto quercetina, resveratrol como delphinidina han mostrado ser inhibidores de este proceso (Favot *et al.*, 2003; Igura *et al.*, 2001).

3.4 Efectos *in vivo* y *ex vivo* de quercetina.

3.41 Sobre la función endotelial en la hipertensión.

La elevación de la presión sanguínea es un factor importante y común en las principales enfermedades cardiovasculares, como enfermedad coronaria, infarto cerebral, enfermedad arterial periférica, enfermedad renal e insuficiencia cardíaca (Kannel 2000). Es bien conocido el efecto antihipertensivo de la dieta rica en frutas y vegetales en pacientes hipertensos (Appel *et al.*, 1997), y se ha atribuido principalmente a los antioxidantes presentes en estos alimentos, entre los que abunda, como hemos visto, quercetina.

Así, el tratamiento crónico con quercetina (5 o 10 mg/Kg/día) disminuyó la presión arterial en todos los modelos de hipertensión ensayados, incluyendo SHR, ratas deficientes en NO (tratadas crónicamente con L-NAME), ratas hipertensas DOCA-sal, ratas hipertensas Dahl sensibles a la sal, y ratas hipertensas Goldblatt dos riñones un clip (Manach *et al.*, 2006; García-Saura *et al.*, 2005; Galisteo *et al.*, 2004; Aoi *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2001). Es interesante señalar que estos importantes efectos antihipertensivos son independientes del nivel de estrés oxidativo, el daño renal, el NO y el estatus del sistema renina-angiotensina. También produjo una protección en los órganos diana de la hipertensión en estos animales, reduciendo los índices cardíacos y renales, la proteinuria y el remodelado vascular asociado a la hipertensión. Estos efectos preventivos sobre cambios estructurales podrían deberse a la reducción de la presión sanguínea y la consiguiente disminución del efecto trófico de las fuerzas hemodinámicas, pero también podrían deberse al efecto antiproliferativo directo de quercetina ya antes mencionado (apartado 1.36).

Estos modelos experimentales de hipertensión y la hipertensión esencial humana se asocian a una disminuida vasodilatación dependiente de endotelio. En SHR, DOCA-sal y ratas Goldblatt, el tratamiento crónico con quercetina mejoró

la función vasodilatadora endotelial, analizada mediante la respuesta relajante a la acetilcolina. También se encontraron altos niveles de metabolitos de NO (nitritos y nitratos) en la orina de estos animales tratados con quercetina. Todos estos modelos se asocian con un elevado estrés oxidativo, tanto plasmático como vascular y hepático, medido a través de los niveles de MDA plasmáticos y tisulares o isoprostano en orina. Quercetina también redujo estos parámetros (García-Saura *et al.*, 2005; Galisteo *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2001). Así, el conjunto de estos datos apunta hacia la menor inactivación de NO por O_2^- , explicada anteriormente (apartados 1.32 y 1.33).

Además, pueden darse cambios aparentes en la vasodilatación dependiente de endotelio como consecuencia de la reducción en la liberación de prostanoïdes vasoconstrictores derivados de endotelio (Auch-Schweld *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 2003). El tratamiento crónico con quercetina no modificó la vasoconstricción dependiente de endotelio en SHR (Duarte *et al.*, 2001), pero sí en ratas deficientes en NO y en ratas Goldblatt (García-Saura *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2002). Pero es interesante señalar que la producción aórtica del vasoconstrictor derivado de endotelio TXA_2 estaba aumentada en los tres modelos respecto a sus controles normotensos, y quercetina redujo estos niveles aórticos de TXA_2 en las ratas deficientes en NO y en las ratas Goldblatt, pero no, como la vasoconstricción, en las SHR (García-Saura *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2002).

Pese a todos estos efectos, quercetina tuvo efectos mínimos o nulos sobre la presión arterial y la función endotelial en los animales normotensos, lo que concuerda con la falta de efecto sobre la presión arterial de una alta dosis de quercetina en sujetos sanos (Conquer *et al.*, 1998), y el mínimo efecto de una dieta rica en frutas y verduras en personas normotensas (Appel *et al.*, 1997). Esto parece indicar que quercetina (y flavonoides relacionados), podría ejercer sus efectos sobre la función endotelial específicamente cuando dicha función endotelial se encuentra disminuida y la presión sanguínea elevada.

Recientemente se ha publicado que el consumo de una dieta suplementada con quercetina (1,5 g/Kg de dieta) en SHR de 5 semanas de edad durante un

periodo de 5 a 11 semanas, no reduce la presión arterial ni las complicaciones orgánicas asociadas, entre ellas la disfunción endotelial. Por el contrario, la administración mediante sonda gastroesofágica de 10 mg/kg de quercetina durante 4 días consiguió disminuir la presión arterial. Estos datos indican que el modo de administración es un determinante crítico de los beneficios cardiovasculares de quercetina, posiblemente relacionados con los niveles plasmáticos alcanzados de quercetina y/o sus metabolitos (Carlstrom *et al.*, 2007).

Hasta el momento no se han publicado estudios con pacientes hipertensos y tratados con flavonoides aislados, como quercetina. Pero hay algunos sobre los efectos de alimentos ricos en flavonoides, como el coco y los zumos de frutas. En un estudio con 12 pacientes hipertensos a los que se les administró alternativamente durante 5 semanas un zumo rico en flavonoides, y otro pobre en ellos, se vio que el primero redujo significativamente la presión sanguínea en estos sujetos (Reshef *et al.*, 2005). En otro estudio se demostró que el chocolate negro, rico en flavonoides, redujo significativamente la presión sanguínea y la resistencia a la insulina, y mejoró la vasodilatación dependiente de endotelio (determinada a través de la vasodilatación inducida por flujo), comparado con el chocolate blanco, pobre en flavonoides. Esto sugiere que los alimentos ricos en flavonoides ejercen un efecto beneficioso sobre la presión arterial y la función endotelial en pacientes hipertensos.

3.42 Sobre la oxidación de LDL y aterosclerosis.

Uno de los mecanismos ya mencionado (apartado 1.33) responsable de la disfunción endotelial es el aumento de la oxidación de las LDL. Los flavonoides, gracias a su acción antioxidante, reducen la sensibilidad de los lípidos a la oxidación. En hámster, los polifenoles del vino y el mosto de uva redujeron las concentraciones plasmáticas de lípidos (Vinson *et al.*, 2001), lo que concuerda con estudios en humanos. El consumo de vino tinto durante 2 semanas produjo una reducción del 20% en la tendencia del plasma sanguíneo a sufrir peroxidación en

sujetos sanos (Fuhrman *et al.*, 1995). La ingestión a corto plazo de mosto de uva mostró una reducción en la susceptibilidad de las LDL a oxidarse en pacientes con enfermedad coronaria (Stein *et al.*, 1999). Sin embargo, en otros estudios en humanos, la oxidación de las LDL no se vio modificada por el consumo de flavonoides (de Rijke *et al.*, 1996), por lo que el efecto de los flavonoides sobre la oxidación de las LDL podría variar dependiendo de su estructura, la fuente y la dosis. Además de esto, numerosos flavonoides han demostrado prevenir el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas en ratones deficientes en Apo E, sin afectar a los niveles LDL-colesterol o HDL-colesterol (Hayek *et al.*, 1997).

3.43 Sobre las enfermedades coronarias.

La patofisiología de la enfermedad isquémica cardíaca y los síndromes coronarios agudos implica múltiples alteraciones tanto en la reactividad como en la estructura vascular y en las interacciones entre la pared del vaso y los elementos sanguíneos circulantes (Libby 2001).

Los efectos antiaterogénicos y antihipertensivos descritos de los flavonoides (apartados 1.43 y 1.42) podrían prevenir el desarrollo de enfermedades coronarias, y sus propiedades antiagregantes plaquetarias (Gryglewski *et al.*, 1987), reductoras de la expresión de MMP-2 y MMP-9 (Huang *et al.*, 1999) y sus efectos vasodilatadores coronarios (Ibarra *et al.*, 2002) podrían ser mecanismos protectores contra los accidentes coronarios agudos.

La disfunción endotelial en la enfermedad coronaria es conocida desde hace tiempo (Ludmer *et al.*, 1986). La baja biodisponibilidad de NO endotelial está relacionada con la génesis, desarrollo y las complicaciones de la aterosclerosis coronaria. Así, enfermos coronarios tratados con mosto de uva o té, mostraron un aumento en la vasodilatación coronaria (Stein *et al.*, 1999).

3.44 Sobre el infarto cerebral.

La causa principal de infarto cerebral es la interrupción del flujo sanguíneo cerebral que se da durante una obstrucción venosa o arterial (por un émbolo, como un fragmento de placa de ateroma, o por una trombosis local), o durante un paro cardíaco. Los flavonoides podrían usarse tanto tratamientos preventivos como agudos de estos sucesos (Simonyi *et al.*, 2005), ya que, como se ha dicho, previenen la disfunción endotelial (apartado 1.32) responsable de la aterosclerosis y la trombosis, y disminuyen la presión arterial (apartado 1.41) y el colesterol sanguíneo (apartado 1.42). Quercetina ha demostrado ser capaz de eliminar los aniones O_2^- liberados durante la reperfusión (el retorno del flujo sanguíneo) tras la isquemia cerebral en un modelo de oclusión de cuatro vasos en ratas (Dajas *et al.*, 2003). Consecuentemente, también disminuyó significativamente el volumen infartado tras la ligadura de la arteria cerebral media en un modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media en ratas. También se han investigado los efectos protectores de los polifenoles del vino en un modelo de isquemia cerebral localizada en ratas. Así, una semana de tratamiento oral con un extracto de polifenoles de vino tinto antes de la inducción de la isquemia, mostró que aunque estos no modificaron el metabolismo energético ni el estrés oxidativo, sí redujeron la excitotoxicidad inhibiendo la liberación masiva de glutamato y aspartato. También aumentaron el flujo sanguíneo residual tanto durante la oclusión como durante la rápida reperfusión. Además, pueden inducir un remodelado vascular, con un aumento del diámetro interno de los vasos cerebrales. Y reducir el tamaño de la zona cerebral infartada, lo que se relaciona con la inhibición de la excitotoxicidad inducida por la isquemia y con el aumento del flujo sanguíneo cerebral (Curin *et al.*, 2005; Curin *et al.*, 2004). Todos estos datos sostienen la idea de los efectos protectores de los polifenoles en general frente al infarto cerebral.

Justificación y objetivos.

Justificación y objetivos del trabajo.

Los flavonoides abarcan un amplio grupo dentro de los compuestos polifenólicos, encontrándose distribuidos extensamente en las plantas y presentándose en cantidades variables en las verduras y la fruta que ingerimos como parte de nuestra dieta (Rice-Evans y Packerl., 1998). El consumo diario medio estimado del ser humano de flavonoides es de 20-25 mg (flavonoles más flavonas), del que quercetina representa alrededor de un 60-75% (Hertog *et al.*, 1993a). El meta-análisis de siete estudios prospectivos de cohorte sobre la ingesta de flavonoides dietéticos concluyó que los individuos incluidos en el tercil superior de ingesta de flavonoles se asocia a un menor riesgo de mortalidad por enfermedad cardiaca coronaria con respecto a los incluidos en el tercil inferior, después del ajuste para los factores de riesgo conocidos y otros componentes dietéticos (Huxley y Neil, 2003).

Los efectos protectores cardiovasculares de la quercetina se han relacionado con una gama muy amplia de acciones biológicas, entre las que se incluyen la antioxidante, antiagregante plaquetaria y vasodilatadora (Rice-Evans y Packerl., 1998; Duarte *et al.*, 1993a). Además, varios estudios han encontrado que el tratamiento crónico con quercetina reduce la presión arterial en modelos animales de hipertensión, tales como la rata SHR (Duarte *et al.*, 2001b), la rata deficiente en óxido nítrico (tratada crónicamente con L-NAME) (Duarte *et al.*, 2002), la rata con hipertensión DOCA-sal (Galisteo *et al.*, 2004), la rata hipertensa Dahl sensible a la sal (Aoi *et al.*, 2004) y la rata hipertensa Goldblatt 2R-1C (García-Saura *et al.*, 2005). Estos efectos antihipertensivos estaban asociados a una reducción en los marcadores plasmáticos y urinarios de estrés oxidativo, a una reducción de hipertrofia tanto cardíaca como renal y a la mejora de la función endotelial.

La disfunción endotelial, caracterizada por una vasodilatación dependiente del endotelio deteriorada y un estado protrombótico y proinflamatorio de las células endoteliales, es un marcador temprano y independiente de mal pronóstico en la

mayoría de las formas de la enfermedad cardiovascular (Endemann y Schiffrin, 2004b), incluyendo la hipertensión esencial (Panza *et al.*, 1993a). La principal característica fisiopatológica de la disfunción endotelial es la disminuida actividad biológica del NO derivado del endotelio debido a una menor actividad eNOS y/o a una mayor metabolización por su interacción con el O_2^- producido en la pared vascular por los sistemas enzimáticos generadores de ROS, tales como la NAD(P)H oxidasa (Cai y Harrison, 2000).

Por lo tanto, **el primer objetivo** de este estudio será analizar los mecanismos implicados en la mejora de la función endotelial en SHR después de la administración crónica de una dosis diaria oral de quercetina (10 mg/kg). Esta dosis de quercetina ha sido elegida en función de criterios dietéticos y corresponde con el consumo de flavonoles de los individuos situados en el tertíl/quartil más alto en los estudios epidemiológicos % (Hertog *et al.*, 1993a), corregida por los principios de escala entre especies (Mordenti y Chappell, 1989). Además, esta dosis ha demostrado su eficacia hipotensora y su capacidad de mejorar la función endotelial en un estudio previo en SHR (Duarte *et al.*, 2001b). Suponemos que la quercetina administrada en edad prehipertensiva a SHR (5 semanas de vida) podría prevenir el desarrollo de hipertensión y de disfunción endotelial en estos animales, tal como se ha demostrado en el modelo de hipertensión por administración crónica de L-NAME (Duarte *et al.*, 2002) y por tratamiento con DOCA y sal (Galisteo *et al.*, 2004). Además, los beneficios sobre la función endotelial podrían estar relacionados con cambios en la expresión proteica y/o actividad de eNOS o del sistema NAD(P)H oxidasa en la pared arterial. Utilizaremos ratas Wistar Kyoto (WKY) como controles normotensos.

La rata SHR constituye un modelo de hipertensión caracterizado por la activación del sistema renina-angiotensina, en el que la Ang II juega un papel crucial. La administración de quercetina reduce el estado oxidativo sistémico y vascular, aunque los mecanismos implicados no están suficientemente clarificados, puesto que pueden ser debidos a un efecto directo sobre la pared vascular,

secundarios a su efecto reductor de la presión arterial, o debidos a efectos neurohumorales de quercetina y/o sus metabolitos.

Los tejidos humanos y animales, excepto la línea de células del tracto intestinal, se exponen a los polifenoles a través de la sangre. Los flavonoides se modifican durante la absorción por un efecto de primer paso de deglicosilación (Nemeth *et al.*, 2003) y las formas que alcanzan la circulación sistémica son las glucuronizadas, sulfatadas y metiladas. Existen pocos datos sobre las acciones de estos metabolitos. Las geninas libres y los glicósidos de quercetina están en pequeña concentración o ausentes en el plasma (Day *et al.*, 2001). Sin embargo, es posible que las geninas libres sean generadas localmente *in vivo* a partir de sus metabolitos por acción de glucuronidasas y sulfatasas (O'Leary *et al.*, 2001; Shimoi *et al.*, 2001) y ejercer su acción en esa zona.

La Ang II aumenta la presión arterial, deteriora la función endotelial, induce la hipertrofia del músculo liso vascular y la expresión de múltiples sustancias vasoactivas e inflamatorias, desempeñando un papel dominante en la patofisiología de enfermedades cardiovasculares, no sólo en la hipertensión sino también en la aterosclerosis y la insuficiencia cardíaca (Kim e Iwao, 2000). Existen numerosas evidencias del papel fundamental que desempeña la producción de ERO, como el O_2^- y el H_2O_2 , en la transducción de la señal de An gII (García-Saura *et al.*, 2005; Endemann y Schiffrin, 2004; Cai y Harrison, 2000; Panza *et al.*, 1993a). La fuente principal de ROS intracelulares en las células vasculares es el sistema NAD(P)H oxidasa, un complejo enzimático formado por varias subunidades que incluye dos subunidades unidas a la membrana citoplasmática, Nox (que bien puede ser, Nox-1, Nox-2 (también llamada gp91^{phox}), Nox-4 o Nox-5) y p22^{phox}, que son reguladas por subunidades citoplásmicas, tales como p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y una proteína G de bajo peso molecular (rac 2 o rac 1) (Lyle y Griending, 2006). El desplazamiento de la subunidad citosólica p47^{phox} a la membrana es esencial en el proceso de ensamblaje de este complejo y desempeña un papel importante en actividad de la NAD(P)H oxidasa en las células cardiovasculares (Touyz *et al.*, 2003; Touyz *et al.*, 2002). La Ang II activa la

NAD(P)H oxidasa en músculo liso vascular por inducir la fosforilación de p47^{phox} y por aumentar la síntesis *de novo* de esta proteína y de otras subunidades del sistema NADPH oxidasa (Kim e Iwao, 2000; Rajagopalan *et al.*, 1996; Touyz *et al.*, 2002).

El **segundo objetivo** de esta Tesis Doctoral es investigar los efectos de quercetina y de su principal metabolito plasmático, isorhamnetina, en forma de genina, sobre la disfunción endotelial inducida por Ang II *in vitro*, y su relación con la producción vascular de O₂⁻ y la expresión de p47^{phox}.

Material y métodos.

Material y métodos.

4. Efectos preventivos de quercetina sobre la hipertensión genética.

4.1 Animales de experimentación.

En el tratamiento *in vivo* con quercetina utilizamos ratas macho SHR y WKY de cinco semanas de edad obtenidas de Harlan Laboratories (Barcelona). Antes de iniciar el tratamiento hubo un periodo de aclimatación de una semana para los animales. Las ratas se mantuvieron en el animalario del departamento, cinco por cada jaula, y a una temperatura constante de 24 ± 1 °C, con un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad, y libre acceso a comida (dieta estándar) y agua. Los animales se repartieron entre cuatro grupos: Veinte ratas WKY se dividieron al azar entre el grupo control (10 ratas), al que se le administraba vehículo (1 ml de metilcelulosa al 1%), y el grupo tratado (10 ratas), al que se le administraba una dosis de quercetina de 10 mg/Kg mezclada con 1 ml de vehículo (metilcelulosa al 1%). Diecinueve SHR se dividieron asimismo en los correspondientes grupos control (10 ratas) y tratado (9 ratas). Los fármacos se administraron mediante sonda gastroesofágica diariamente durante las 13 semanas de tratamiento. El peso corporal se controló semanalmente. El tratamiento con quercetina se detuvo 2 días antes de finalizar el experimento a fin de estudiar únicamente los efectos a largo plazo del flavonol, sin que influyesen los posibles efectos de la administración aguda. Cuatro ratas control y cuatro tratadas con quercetina, tanto WKY como SHR, se reservaron al final del estudio para la medida directa de la presión sanguínea, y las restantes de cada grupo fueron utilizadas para el análisis de la función vascular y la obtención de tejidos.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las Normas Institucionales para el trato ético de los animales.

4.2 Medida de la presión sanguínea.

La medida de la presión sistólica (SBP) se tomó semanalmente 18-20 horas antes de la administración del tratamiento, con las ratas conscientes y precalentadas a 37 °C , mediante pletismografía en la cola (Digital Pressure Meter Le 5000, Letica S.A., Barcelona). En cada sesión se realizaron al menos 7 determinaciones y la media de los tres valores más bajos con una diferencia no mayor de 5 mmHg se tomó como valor de presión sistólica.

Al finalizar la 13ª semana se determinó la presión sanguínea mediante registro directo en ratas conscientes WKY y SHR. Para ello las ratas fueron anestesiadas con 2,5 ml/Kg de equitensina (cuya composición para 500 ml es la siguiente: 43% hidrato de cloral en 81 ml de etanol; 4,86 mg de nembutal; 198 ml de propilenglicol; 10,63 mg de MgSO₄; y agua destilada c.s.p.). Se insertó en la arteria femoral izquierda un catéter de polietileno (PE-50) que contenía 100 U. de heparina en una solución isotónica y estéril de NaCl para la medida de la presión sanguínea intra-arterial y la frecuencia cardíaca. El catéter se insertó subcutáneamente, se exteriorizó a través de la piel en la parte dorsal del cuello. A las ratas se les permitió recuperarse de la intervención durante 24 horas y, tras conectar el catéter a un transductor a un registro de dos canales (TRA-021 y Letigraph 2000, respectivamente; Letica S.A., Barcelona), la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca se registraron durante 1 hora.

4.3 Parámetros morfológicos.

Al finalizar el período experimental, los animales fueron anestesiados con éter etílico. Se realizó una incisión en el abdomen para visualizar y tener acceso la aorta

abdominal, a través de la cual se extrajo la sangre utilizando un jeringa heparinizada. Posteriormente se obtuvo al plasma mediante centrifugación de la sangre a 3000 r.p.m durante 10 minutos. El plasma se alicuotó y se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

Seguidamente tras la exanguinación de los animales, se extrajeron los riñones, la aorta torácica y el corazón. A excepción de la aorta, que se utilizó inmediatamente para las pruebas de reactividad vascular que se describirán en detalle más adelante (ver apartado 4.4), estos órganos se lavaron en solución de Krebs fría y se secaron para ser pesados. Tras pesar el corazón se eliminaron las aurículas y el ventrículo derecho, para quedarnos con el ventrículo izquierdo limpio (más el septo), que se pesó de nuevo.

Mediante los datos de peso de estos órganos, y el peso de cada animal antes de su sacrificio, calculamos los diferentes índices morfológicos, dividiendo el peso del órgano en cuestión por el peso del animal, en gramos, y multiplicado por 100 para obtener el %. Así se obtuvieron el Índice de peso cardiaco (I.P.C.), Índice de peso de ventrículo izquierdo (I.P.V.I.) e Índice de peso renal (I.P.R.) de cada animal para su posterior análisis estadístico.

Los órganos fueron divididos, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C para su posterior utilización.

4.4 Estudios de reactividad vascular.

Las pruebas se llevaron a cabo en anillos de aorta torácica de las ratas WKY y SHR, según la técnica de Duarte y cols. (2001a,b).

Tras el sacrificio de los animales y posterior exanguinación, la arteria aorta fue cuidadosamente extraída desde el cayado aórtico hasta el diafragma y depositada en una placa Petri que contenía solución de Krebs (con una composición en mM de: NaCl 118, KCl 4,75, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1,2, CaCl₂ 2, KH₂PO₄ 1,2 y glucosa 11). Seguidamente se eliminaron los restos de tejido conjuntivo y adiposo

adheridos a la aorta y ésta se dividió en segmentos de unos 3 mm de longitud para proceder a su montaje en un sistema de baño de órganos. Para ello se introdujeron en el lumen de dichos anillos dos alambres rígidos de acero inoxidable con forma de L, de 0,2 mm de diámetro, uno de los cuales se fijó a la pared del baño y el otro, que podía desplazarse paralelo al anterior hacia arriba y abajo, se conectó a un transductor isométrico de fuerza-desplazamiento (Letigraph 2000, Cibertec S.A., Madrid). Los baños de órganos contenían 5 ml de la solución de Krebs, mantenida a 37 °C y constantemente burbujeadada con O₂ al 95% y CO₂ al 5% (gas carbógeno) para mantener un pH comprendido entre 7,3 y 7,4. Los anillos fueron sometidos a una tensión de 2 g y se dejaron estabilizar durante 60-90 minutos antes de la adición de los fármacos. Posteriormente fueron retensionados según las necesidades para mantener la tensión final estable de 2 g.

En algunos experimentos se eliminó el endotelio de los anillos de forma mecánica mediante una ligera fricción de éstos con un alambre de acero inoxidable insertado en el lumen.

Protocolos experimentales.

4.41 Para evaluar la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, se realizaron curvas concentración-respuesta de relajación a acetilcolina (10^{-8} M - 10^{-5} M) añadida de forma acumulativa a los baños, en anillos precontraídos con fenilefrina (10^{-7} M). Los resultados se expresaron como % de relajación respecto a la precontracción inicial con fenilefrina.

4.42 Con el fin de estudiar la respuesta vasodilatadora no dependiente de endotelio, se llevaron a cabo curvas concentración-respuesta de relajación a nitroprusiato sódico (10^{-9} M - 10^{-5} M) añadido a los baños de forma acumulativa. Este experimento se realizó en oscuridad en anillos a los que se les eliminó previamente el endotelio, como se ha descrito con anterioridad, y precontraídos con noradrenalina (10^{-6} M). Los resultados se expresaron como % de relajación respecto a la precontracción inicial con noradrenalina.

4.43 Para estudiar la respuesta contráctil dependiente de endotelio se realizaron curvas concentración-respuesta a acetilcolina en anillos inicialmente estimulados con KCl 80 mM para obtener una contracción de referencia. Tras lavar con solución de Krebs la preparación para eliminar el KCl y volver a la situación inicial de estabilidad, se incubaron los anillos aórticos durante 30 minutos con el inhibidor de la NOS L-NAME (10^{-4} M), y posteriormente la acetilcolina se fue añadiendo de forma acumulativa (10^{-8} M - 10^{-4} M). En estos experimentos las respuestas contráctiles a acetilcolina se expresaron como porcentaje de la respuesta inducida por KCl.

4.5 Medida de la actividad vascular de la Óxido Nítrico Sintasa (NOS).

La actividad NOS en homogenados aórticos se determinó mediante la conversión de L-[3 H]arginina a L-[3 H]citrulina (Mitchell y cols. 1991). Anillos aislados de aorta torácica fueron homogenizados, sobre hielo, en un tampón cuya composición era: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico (HEPES, 10 mM) (pH 7,4), sacarosa (0,32 M), ácido etilendiamino tetracético (EDTA, 100 μ M), ditiotreitól (1 mM), fluoruro de metilsulfonilo (1 mg/ml) y leupeptina (10 μ M). Los homogenados de las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 minutos en un tampón de reacción: TRIS (50 mM, pH 7,4), NADPH (1 mM), L-valina (10 mM) y una mezcla de L-[3 H]arginina (10 μ M, 1 μ Ci/ml) y L-arginina no marcada. La reacción se detuvo con la adición de 1 ml de tampón de parada: HEPES (20 mM) (pH 5,5), EGTA (1mM) y EDTA (1mM). La L-[3 H]citrulina fue separada de la L-arginina añadiendo 1,5 ml de una suspensión 1:1 de resina intercambiadora de iones (Dowex AG50 W-X8, Sigma Chemical, Alcobendas, Madrid) en agua. La radiactividad se midió en el sobrenadante mediante la adición de líquido de centelleo. La actividad de la NOS dependiente de Ca^{2+} fue determinada mediante la diferencia entre la L-[3 H]citrulina producida por muestras que contenían Ca^{2+} y

muestras sin Ca^{2+} y EGTA (1 mM). Los resultados fueron expresados como picomoles de L-citrulina/mg de proteína en 30 minutos.

4.6 Determinación del nivel de peroxidación lipídica.

Utilizamos el método descrito por Esterbauer y Cheeseman (1990) para medir malonildialdehido (MDA) en plasma, un indicador de la peroxidación lipídica sufrida por los tejidos.

Se hicieron reaccionar en un eppendorf mantenido en hielo, 100 μl de plasma de muestra (obtenidos previamente por centrifugación durante 10 minutos a 3000 r.p.m. de la sangre extraída de cada rata al ser sacrificada y congelados inmediatamente y conservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), con 250 μl de reactivo cromogénico (solución de 1-metil-2-fenilindol 1,03 mM en acetonitrilo) y 75 μl de ácido clorhídrico al 35% (v/v), agitando cada eppendorf.

La mezcla se incubó durante 40 minutos en un baño a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, y posteriormente se volvió a mantener en hielo, para ser centrifugada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos a 14000 r.p.m. Posteriormente, en una placa de 96 pocillos, se cargaron 100 μl de cada mezcla y se midió su absorbancia a 586 nm en un lector de placas (Microplate Reader Model 680XR, Bio-Rad). El cálculo del contenido de MDA se realizó mediante la interpolación de los valores obtenidos con una curva patrón de 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

4.7 Determinación de la producción vascular de Tromboxano B_2 (TXB_2).

Para determinar la producción de TXB_2 , anillos aórticos de los diferentes grupos experimentales, con el endotelio intacto, fueron colocados en 2 ml de solución de Krebs e incubados con L-NAME (10^{-4} M) durante 15 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una mezcla gaseosa de O_2 al 95% y CO_2 al 5%. Al terminar ese tiempo, 500 μl

del medio fueron recogidos y el TXB₂ medido mediante un kit de enzimoimmunoensayo (Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido).

4.8 Detección de la producción vascular de O₂⁻.

La producción de O₂⁻ en anillos aórticos intactos se cuantificó mediante quimioluminiscencia con lucigenina, como se describió previamente por Ohara y cols (1993). Anillos aórticos de todos los grupos experimentales fueron incubados durante 30 min. a 37 °C en una solución salina fisiológica (pH 7,4) de la siguiente composición (en mM): NaCl 119, HEPES 20, KCl 4,6, MgSO₄ 1, Na₂HPO₄ 0,15, KH₂PO₄ 0,4, NaHCO₃ 1, CaCl₂ 1,2 y glucosa 5,5. La producción aórtica de O₂⁻ fue estimulada en algunos anillos mediante la adición de NADPH (100 μM). Los anillos fueron posteriormente colocados para la medida en tubos que contenían solución salina fisiológica, con o sin NADPH, tal y como se incubaron, y la lucigenina fue inyectada automáticamente a una concentración final de 5 μM. Los cambios en la liberación de O₂⁻ se determinaron midiendo la luminiscencia de la lucigenina mediante un luminómetro (Lumat LB 9507, Berthold, Alemania) durante 200 segundos en intervalos de 5 segundos. Luego los anillos fueron desecados y se determinó su peso seco. La producción de O₂⁻ se expresó como unidades relativas de luminiscencia (RLU)/minuto/mg de tejido seco.

4.9 Expresión vascular de eNOS, caveolina-1 y p47^{phox} mediante Western Blot.

Anillos aórticos de los diferentes grupos, conservados a -80 °C, fueron homogeneizados en frío mediante un potter de cristal. Para la determinación de eNOS y caveolina-1, la composición del tampón de homogeneización utilizado (pH 7.4) fue: HEPES 10 mM, sacarosa 320 mM, EDTA 100 μM, ditioneitol (DTT) 1 mM, fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 0.5 mM y leupeptina 4

µg/ml. Para la determinación de la subunidad p47^{phox} de la enzima NAD(P)H oxidasa, la composición del tampón de homogeneización (pH 8) fue: HEPES 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, aprotinina 40 µg/ml, leupeptina 4 µg/ml, N-α-para-tosil-L-lisina clorometilamina 4 µg/ml, NaF 5 mM, Na₂MoO₄ 10 mM, Na₃VO₄ 1 mM, PMSF 0,5 mM y ácido okadaico 10 nM.

Los homogenados aórticos para medir p47^{phox} fueron separados en fracción citosólica (proteína dispersa en el interior celular) y particulada (proteína unida a membrana celular). Primero se centrifugaron a 14000 r.p.m. durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente se separó y almacenó adecuadamente el sobrenadante resultante, siendo la fracción citosólica de la muestra, y el pellet sobrante se resuspendió en su correspondiente tampón de homogeneización con detergente igepal al 1% y se mantuvo en agitación durante 30 minutos para disgregar las membranas celulares y separar de ellas la proteína asociada. Las muestras se volvieron a centrifugar a 14000 r.p.m. durante 1 hora a 4 °C y se volvió a obtener y recoger el sobrenadante, siendo éste la fracción particulada de la muestra.

Para medir la cantidad total de p47^{phox} en la muestra, algunas de ellas no fueron divididas en fracción citosólica y particulada, sino que se homogeneizaron añadiendo inicialmente al tampón de homogeneización el detergente igepal al 1%, procediendo después como se describió anteriormente. Con la muestra de total de proteína se trabajó de la misma forma que en las fracciones citosólica y particulada.

La expresión proteica de eNOS y de caveolina-1 fue medida en el sobrenadante de sus homogenados aórticos tras 30 minutos de centrifugación a 14000 r.p.m a 4 °C, y la expresión proteica de p47^{phox} se determinó en las fracciones citosólica, particulada y total.

Los western blots se llevaron a cabo con 40 µg de proteína para eNOS, 25 µg para caveolina-1 y 30 µg para p47^{phox}. La cantidad de proteína por muestra se determinó mediante la técnica de Bradford (1976). Las proteínas fueron entonces suspendidas en tampón de carga y desnaturalizadas mediante calor durante 5 minutos.

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida, al 8% para eNOS, 15% para caveolina-1 y 10% para 47^{phox}, y se realizó en un sistema minigel (Bio-Raid Laboratorios, Hercules, California, EE.UU.). Después, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y se incubaron con tampón de bloqueo [tampón Tris salino tamponado al 0.1% de Tween 20 (TBS-T) con leche desnatada en polvo al 5%] durante 2 horas. Luego las membranas fueron lavadas durante 15 minutos con TBS-T, cambiando la solución cada 5 minutos. Posteriormente, fueron incubadas con anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-eNOS toda una noche a 4 °C (dilución 1:1000, Transduction Laboratories, San Diego, California, EE.UU.), anti-p47^{phox} (dilución 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE.UU.) o con anticuerpo monoclonal de ratón anti-caveolina-1 (dilución 1:600, Transduction Laboratories). Las membranas se lavaron de nuevo durante 15 minutos con TBS-T cambiando cada 5 minutos la solución, y se incubaron con anticuerpo secundario caprino anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:2000, Santa Cruz Biotechnolgy) para determinar eNOS o p47^{phox}, y con anticuerpo secundario caprino anti-ratón conjugado con peroxidasa (1:2000, Santa Cruz Biotechnolgy) para caveolina-1, diluidos todos ellos en TBS-T al 5% de leche en polvo desnatada. Todas estas incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras lavar de nuevo las membranas de la forma arriba descrita, la unión del anticuerpo a la proteína se detectó mediante su incubación durante un minuto con un sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) y una película auto radiográfica para ver la quimioluminiscencia. Las películas se escanearon y se realizó en estas imágenes un análisis densitométrico usando el software Scion Image-Release Beta 4.02. (<http://www.scioncorp.com>). Los resultados se expresaron como porcentaje de la intensidad de banda de proteína frente a la expresión basal de proteína en aortas del grupo control WKY.

4.10. Análisis histológico cardíaco mediante tricrómico de Masson.

Para estudiar los cambios estructurales en el corazón debidos a la presión arterial, utilizamos la técnica del tricrómico de Masson. Mediante esta tinción podemos observar el citoplasma celular de color rojo-rosado, los núcleos celulares de color azul-negruzco y las fibras de colágeno y reticulina en azul claro.

Se obtuvieron secciones cardíacas del ventrículo izquierdo procedentes de ratas de cada grupo. Los ventrículos izquierdos fueron inmediatamente colocados en formol 40% tamponado, posteriormente fijados mediante líquido de Bouin y deshidratados sumergiéndolos en un gradiente ascendente de concentraciones de etanol. Una vez deshidratados y aclarados en xilol durante 10 minutos, las muestras fueron incluidas en parafina para poder obtener los cortes con el microtomo y almacenadas.

A la hora de realizar la tinción para el tricrómico de masson, inmediatamente antes los cortes de las secciones ventriculares fueron desparafinados bañándolos en xilol 10 minutos, rehidratados sumergiéndolos en un gradiente descendente de concentraciones de etanol un par de minutos cada vez y finalmente en agua destilada 5 minutos y se procedió a la tinción propiamente dicha. Los cortes fueron teñidos durante 10 minutos con hematoxilina férrica de Weigert (con una composición: Solución a) hematoxilina 0,5 gr en 50 ml de etanol 100° madurada 4 semanas; Solución b) cloruro férrico (20% P/V 2 ml, agua destilada 47,5 ml y ácido clorhídrico concentrado 0,5 ml.). Se lavaron en agua corriente y se les aplicó rojo Masson (escarlata-fucsina ácida) 10 minutos (composición: fucsina 0,4 gr, orange G 1,6 gr, ácido acético glacial 0,8 ml y agua destilada 99,2 ml). Transcurrido ese tiempo volvieron a ser lavadas con agua corriente, y se procedió a la diferenciación mediante ácido fosfotungstico 1% (ácido fosfotungstico 1 gr, agua destilada 100 ml) durante otros 10 minutos. Se lavó de nuevo con agua corriente y se contratiñeron con una solución de verde-luz durante 5 minutos (composición:

verde luz 0,3 gr, ácido acético glacial 0,3 ml y agua destilada 99,7 ml), lavando de nuevo posteriormente con agua corriente. Las muestras fueron de nuevo deshidratadas, aclaradas y montadas para su observación y fotografía.

4.11. Análisis estadístico.

Los resultados fueron expresados como la media aritmética \pm el error estándar de la media (SEM).

La evolución de la presión sistólica en la cola durante el tiempo de tratamiento se comparó usando un diseño anidado, con el tratamiento y días como factores fijos y la rata como el factor al azar. Cuando la diferencia total fue significativa, las comparaciones se realizaron usando el método de Bonferroni con un error apropiado. El análisis del diseño anidado también se llevó a cabo con grupos y concentraciones para comparar las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina. El resto de las variables se compararon usando un diseño de dos vías, donde el grupo y el tratamiento fueron factores efectivos fijos con desigual tamaño de muestra en los diferentes grupos. Cuando la interacción fue significativa se usó el método de Bonferroni para aparear comparaciones. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Las curvas concentración-respuesta fueron ajustadas a la ecuación:

$E = E_{\max} / (1 + 10^{-k * ([\text{fármaco}] - pD_2)})$, donde E_{\max} es el efecto máximo, k es un factor que representa la pendiente de la curva y pD_2 es la concentración del fármaco que exhibe el 50% del E_{\max} expresado como logaritmo molar negativo.

5. Efecto de quercetina e isorhamnetina sobre la disfunción endotelial inducida por angiotensina II *in vitro*.

5.1 Animales de experimentación.

Todos los animales utilizados eran ratas WKY macho de entre 200-250 g de peso, obtenidas de Harlan Laboratories, Barcelona. Fueron mantenidas en el animalario cinco ratas por batea, con libre acceso a dieta estándar y agua, con un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad y a una temperatura constante de 24 ± 1 °C.

Para la realización de los experimentos, las ratas fueron sacrificadas mediante la administración de una dosis letal de pentobarbital sódico (120 mg/Kg intraperitoneal). La aorta torácica descendiente fue extraída y cortada en anillos tal como se describió con anterioridad (ver apartado 4.4). Estos anillos fueron incubados en solución de Krebs durante 2, 4, 6 u 8 horas en un incubador de células en ausencia o presencia de angiotensina II (10^{-6} M) y en presencia de quercetina (10^{-6} M o 10^{-5} M), vehículo, dimetil sulfóxido (DMSO, 0,1%), isorhamnetina (10^{-6} M o 10^{-5} M), losartán (10^{-5} M) o apocinina (10^{-4} M). La aorta fue inmediatamente usada para pruebas de reactividad vascular, o congelada en nitrógeno líquido y almacenada a -80 °C para realizar los western blots, o incluida en OCT (Tissue-Teck® OCT compound, Sakura) y después congelada en nitrógeno líquido y almacenada a -80 °C para posteriormente llevar a cabo las pruebas inmunohistoquímicas o el análisis de la producción *in situ* de O_2^- .

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las Normas Institucionales para el trato ético de los animales.

5.2 Pruebas de reactividad vascular.

Tras el periodo de incubación descrito anteriormente, los anillos aórticos se montaron en un sistema convencional de baño de órganos de manera análoga a como se describió en el apartado 4.4.

Protocolos experimentales.

5.21 Para estudiar el posible efecto como promotora de disfunción endotelial de angiotensina II, se evaluó la capacidad vasodilatadora dependiente de endotelio inducida por acetilcolina. Para ello, después de un periodo de incubación, las arterias fueron estimuladas con fenilefrina (10^{-6} M) para obtener la precontracción y una vez conseguida y estable (aproximadamente 5 minutos) se realizó una curva concentración-respuesta mediante la adición acumulativa al baño de acetilcolina (10^{-9} M - 10^{-4} M).

5.22 Para evaluar la capacidad vasodilatadora independiente de endotelio se examinó la respuesta de anillos aórticos a nitroprusiato sódico (NPS) (10^{-10} M - 10^{-5} M) añadido de forma acumulativa al baño. Esta prueba se realizó en oscuridad y habiendo eliminado mecánicamente el endotelio previamente a su montaje en los baños. La precontracción se realizó con noradrenalina (10^{-6} M).

5.23 Para estudiar los posibles efectos de los radicales libres, principalmente anión superóxido generado por NAD(P)H oxidasa, en la disfunción endotelial inducida por angiotensina II, los anillos aórticos fueron incubados con polietilenglicol-superóxido dismutasa (PEG-SOD, 100 U/ml) o con el inhibidor de NAD(P)H oxidasa, apocinina (10^{-4} M) 1 hora antes de la adición al baño de fenilefrina para inducir la precontracción, y posteriormente se llevó a cabo la curva concentración-respuesta de relajación a acetilcolina como en 5.21.

5.24 También quisimos evaluar el posible papel de los diferentes receptores de angiotensina II en la génesis de la disfunción endotelial inducida por ésta, por lo que en otro experimento, anillos aórticos con el endotelio intacto fueron

incubados durante 6 horas en las condiciones descritas con angiotensina II (10^{-6} M), o el inhibidor de receptores AT-1 de angiotensina II, losartán (10^{-5} M), o el inhibidor de receptores AT-2 de angiotensina II, PD123,319 (10^{-5} M), o losartán (10^{-5} M) más PD123,319 (10^{-5} M), o con la combinación de angiotensina II (10^{-6} M) más losartán (10^{-5} M), o angiotensina II (10^{-6} M) más PD123,319 (10^{-5} M), o la combinación de los tres, angiotensina II (10^{-6} M) más losartán (10^{-5} M) más PD123,319 (10^{-5} M). Posteriormente fueron montados en los baños de órganos como se ha descrito con anterioridad y se realizaron las curvas concentración-respuesta de relajación a acetilcolina como en 5.21.

5.25 Para estudiar el posible papel de los receptores PPAR- γ en una mejora de la disfunción endotelial inducida por angiotensina II, incubamos durante 6 horas, en las condiciones ya descritas, anillos aórticos con el endotelio intacto más angiotensina II (10^{-6} M), o angiotensina II (10^{-6} M) más quercetina (10^{-5} M), o angiotensina II (10^{-6} M) más isorhamnetina (10^{-5} M), o angiotensina II (10^{-6} M) más el antagonista de receptores PPAR- γ GW9662 (10^{-6} M), o la combinación de angiotensina II (10^{-6} M) más quercetina (10^{-5} M) más GW9662 (10^{-6} M), o angiotensina II (10^{-6} M) más isorhamnetina (10^{-5} M) más GW9662 (10^{-6} M), para posteriormente montarlos en baños de órganos como se ha descrito y llevar a cabo la correspondiente curva concentración-respuesta de relajación a acetilcolina.

5.3 Expresión vascular de p47^{phox}.

Las aortas de WKY adultas fueron extraídas, cortadas en anillos, congeladas, homogeneizadas y divididas en fracciones citosólica, particulada y total como se describió en el apartado 4.9. Los Western blots fueron realizados con 30 μ g de proteína de sobrenadante por pocillo, suspendidas en tampón de carga y desnaturalizadas. La electroforesis en SDS-poliacrilamida (10%) fue llevada a cabo en un sistema de minigel (Bio-Rad). Las proteínas fueron luego transferidas de los geles a membranas de nitrocelulosa. Éstas se incubaron con tampón de bloqueo

(tampón Tris salino tamponado al 0,1% de Tween 20 (TBS-T) con leche desnatada en polvo al 5%) durante 2 horas. Se lavaron luego 3 veces durante 15 minutos, cambiando la solución, en TBS-T y posteriormente se incubaron con anticuerpo primario policlonal de conejo anti-p47^{phox} (dilución 1:1000, SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.) en TBS-T con leche en polvo desnatada al 5% durante toda la noche a 4 °C. Se lavaron de nuevo 3 veces durante 15 minutos en TBS-T y se incubaron con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1:2000, SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.) en TBS-T con leche en polvo desnatada al 5% durante otras 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo las membranas otras 3 veces durante 15 minutos con TBS-T, la unión al anticuerpo se detectó mediante un sistema de ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, Reino Unido) y una película auto radiográfica para ver la quimioluminiscencia.. Las películas fueron escaneadas y el análisis densitométrico se realizó en esas imágenes escaneadas usando el software Scion Image-Release Beta 4.02 (<http://www.scioncorp.com>).

Como control adicional las muestras fueron reutilizadas para ver la expresión de la α -actina esquelética. Para ello, se procedió con las muestras de la forma en que se ha descrito, pero como anticuerpo primario usamos anticuerpo de ratón anti α -actina (dilución 1:2000, DHSB, Iowa City, EE.UU) incubándolo a 4 °C durante toda una noche, y como anticuerpo secundario anticuerpo caprino anti-ratón conjugado con peroxidasa (dilución 1:2000, Santa Cruz Biotechnolgy). Se calculó la relación cantidad de proteína/ α -actina y los resultados se expresaron como comparaciones a esa relación en aorta del grupo control en el mismo gel, expresado como 100%.

5.4 Detección *in situ* de la producción vascular de O_2^- .

Utilizamos Dihidroetidio (DHE) para localizar O_2^- en secciones aórticas. El DHE entra en las células y es oxidado por el O_2^- para formar etidio, que se une al ADN para producir una fluorescencia brillante de color rojo.

Anillos aórticos (de 2 -3 mm) sin fijar de WKY y SHR de cada grupo fueron criopreservados mediante incubación con suero fisiológico salino (PBS) 0,1 M que contiene 30% de sacarosa durante 1-2 horas, incluidos en OCT, congelados a -80 °C y después cortados en secciones de 10 μ m de espesor en un criostato (Microm international Modelo HM500 OM). Las secciones fueron incubadas en cámara húmeda durante 30 minutos en solución tamponada de HEPES con una composición en mM de: NaCl 130, KCl 5, MgCl₂ 1,2, glucosa 10 y HEPES 10, (pH 7,3 ajustado con NaOH) a 37 °C. Después las secciones fueron de nuevo incubadas 30 minutos en oscuridad en solución tamponada de HEPES conteniendo DHE (10^{-5} M). Luego las preparaciones fueron coincubadas con el marcador nuclear dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (3×10^{-7} M) durante 5 minutos a 37 °C aún en oscuridad, posteriormente fueron lavadas con 1 ml de solución tamponada de HEPES dos veces y selladas con cubreobjetos.

Cuatro secciones de cada preparación fueron examinadas en un microscopio de fluorescencia (Leica DM IRB, Wetzlar, Alemania) usando un objetivo de 40x con los siguientes pares de filtros de excitación/emisión: 340-380 nm/425 nm de longitud de onda para visualizar la fluorescencia azul del DAPI, BP450-490 nm/515 nm para visualizar la autofluorescencia verde de la elastina y 540-30 nm/ 610-75 nm para visualizar la fluorescencia roja del etidio. Las secciones fueron fotografiadas con una cámara digital a color Leica DC300F, y las imágenes se grabaron para posterior análisis. Las condiciones de microscopio y cámara fueron mantenidas constantes para todas las preparaciones.

Las fluorescencias de etidio y DAPI fueron cuantificadas usando ImageJ (ver 1.32j, NIH, <http://rsb.info.nih/ij/>). La producción de O_2^- fue calculada de la relación entre la fluorescencia de etidio/DAPI.

5.5 Inmunohistoquímica.

Secciones de 10 μ m de aorta se prepararon como se describió anteriormente para la determinación vascular de anión superóxido *in situ* (ver apartado 5.4), fijadas con para-formaldehído (PFA) 4% durante 1 hora y lavadas con PBS 5 veces 6 minutos cada vez. Las secciones fueron incubadas con PBS 0,1 M más Tween 20 al 0,3% más albúmina de suero bovino (BSA) al 5% durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Posteriormente se incubaron con anticuerpo primario policlonal de conejo anti-p47^{phox} (dilución 1:50, SantaCruz Biotechnology). Luego se lavaron de nuevo 5 veces, con PBS 0,1 M más Tween 20 al 0,3%, y se incubaron en oscuridad durante 2 horas con anticuerpo secundario de cabra conjugado con Cy3 anti-conejo (dilución 1:200, Jackson Immunoresearch Laboratories, Cambridgeshire, Reino Unido) y al finalizar este tiempo fueron de nuevo lavadas 5 veces. Entonces las preparaciones fueron coincubadas con DAPI (3×10^{-7} M) durante 5 minutos a 37 °C aún en oscuridad. Posteriormente fueron lavadas dos veces con 1 ml de PBS 0,1 M más Tween 20 al 0,3%, selladas con cubreobjeto y fotografiadas como se describió anteriormente para la técnica del DHE en la detección vascular *in situ* de O_2^- (apartado 5.4).

5.6 Reactivos.

Todos los productos y reactivos fueron obtenidos de Sigma-aldrich chemie, Steinheim, Alemania, o Panreac química s.a, Barcelona, España, excepto DAPI, de Calbiochem, Darmstadt, Alemania. Quercetina e isorhamnetina fueron

inicialmente disueltas en DMSO y todos los demás fármacos y posteriores diluciones en agua destilada.

5.7 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm el SEM, y *n* refleja el número de animales. Diferencias significativas entre grupos fueron calculadas mediante el test de la *t* de Students para observaciones desapareadas, o para múltiples comparaciones mediante test de ANOVA seguido de un test de Newman Keuls. $P < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa.

Resultados.

Resultados.

6. Efectos preventivos de quercetina sobre la hipertensión genética.

6.1 Efectos de quercetina sobre la presión arterial y frecuencia cardiaca.

La Figura 13 muestra los efectos de quercetina en la evolución de la presión sistólica medida en la cola, sobre la presión arterial media tomada durante el registro directo de la misma y la frecuencia cardiaca al finalizar el período de tratamiento. La administración a largo plazo de quercetina redujo el aumento de presión sistólica en SHR y este efecto adquirió significado estadístico tras la quinta semana de tratamiento, mientras que no se observaron cambios en las ratas WKY (Figura 13 A). Al finalizar las 13 semanas de tratamiento, la medida directa de la presión sanguínea en las ratas conscientes mostró que quercetina indujo una reducción significativa en la presión arterial media (-12%) y la frecuencia cardiaca en SHR pero no en WKY (Figura 13 B y C).

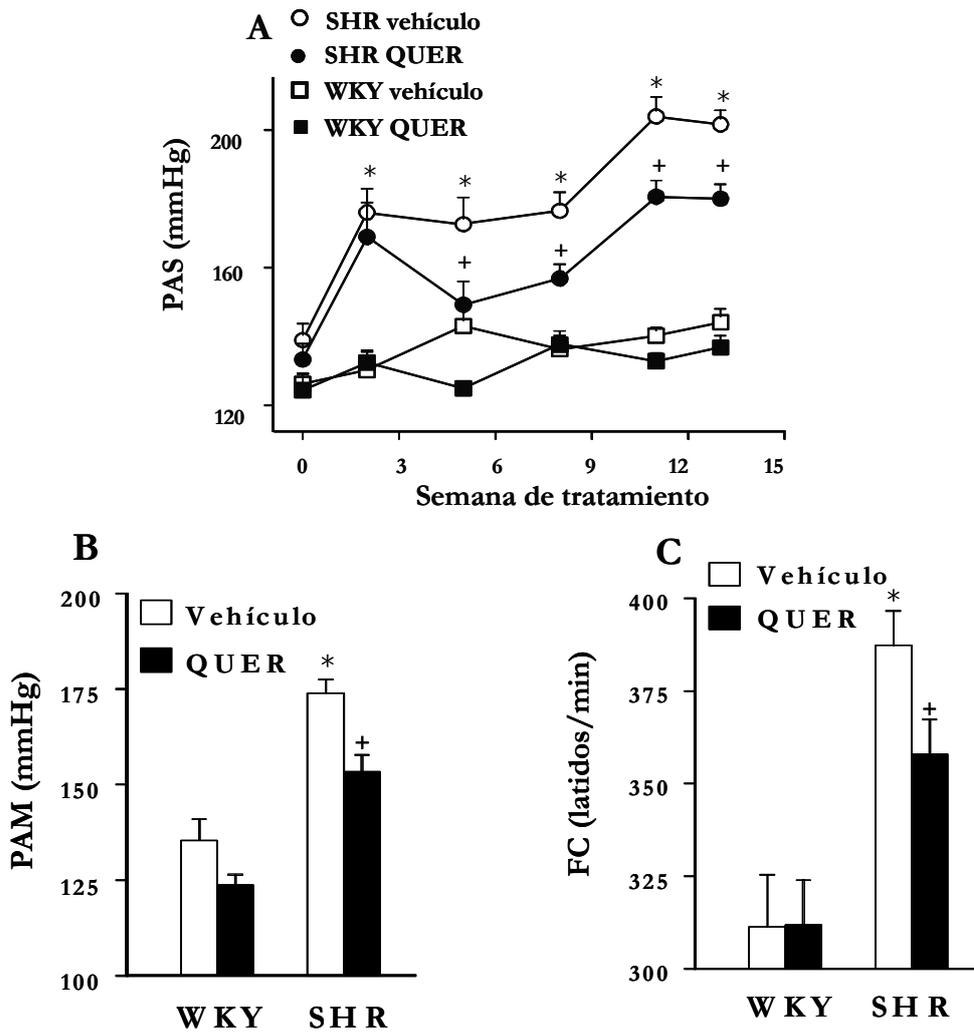


Figura 13. Efectos de quercetina sobre la presión arterial y la frecuencia cardiaca. La gráfica A representa la evolución de la presión arterial sistólica (PAS) medida mediante pletismografía en la cola en los grupos SHR vehículo (○, n = 9), SHR QUER (●, n = 9), WKY vehículo (□, n = 10) y WKY QUER (■, n = 10). Las gráficas B y C muestran respectivamente la medida directa de la presión arterial media (PAM) y la frecuencia cardiaca (FC) en los grupos vehículo (WKY y SHR n = 4) y quercetina (WKY y SHR n = 4). Los valores se expresan como medias \pm error estándar medio. * P < 0,05 vs. el grupo WKY vehículo, + P < 0,05 vs. el grupo SHR vehículo.

6.2 Efectos de quercetina sobre el peso y los índices corporales.

El tratamiento con quercetina no modificó el peso corporal ni en las ratas WKY ni en las SHR. Los índices de peso cardíaco (PCar/PC) y de peso de ventrículo izquierdo (PVI/PC) en SHR fueron significativamente mayores que en las WKY, señal de una hipertrofia cardíaca debida a la hipertensión arterial. En las SHR tratadas con quercetina el índice de peso de ventrículo izquierdo fue significativamente menor comparado con las ratas SHR tratadas sólo con vehículo (Tabla 1).

Tabla 1. Peso corporal e índices cardíacos y renales.

Grupo	PC (g) ^a	Pcar (mg) ^a	PVI (mg) ^a	PR (mg) ^a	Pcar/PC Ratio ^a	PVI/PC Ratio ^{a,b}	PR/PC Ratio
WKY vehículo (n = 10)	348 ± 4	1058 ± 18	776 ± 21	973 ± 20	3,04 ± 0,04	2,23 ± 0,05	2,80 ± 0,05
WKY quercetina (n = 10)	347 ± 6	1104 ± 34	775 ± 19	941 ± 19	3,18 ± 0,08	2,23 ± 0,04	2,71 ± 0,03
SHR vehículo (n = 9)	313 ± 12	1132 ± 46	872 ± 39	880 ± 34	3,62 ± 0,06	2,82 ± 0,03	2,83 ± 0,04
SHR quercetina (n = 9)	312 ± 11	1120 ± 21	845 ± 19	861 ± 32	3,61 ± 0,06	2,72 ± 0,03*	2,76 ± 0,06

PC: Peso corporal.

Pcar: Peso cardíaco.

PVI: Peso de ventrículo izquierdo.

PR: Peso renal.

^a P < 0,05 WKY vs. SHR, ^b P < 0,05 vehículo vs. quercetina (ANOVA dos colas)

* P < 0,05 (Bonferroni) vs. SHR vehículo.

6.3 Efectos de quercetina en las respuestas vasodilatadoras de la aorta torácica.

Las aortas de SHR tratadas con vehículo mostraron una reducción significativa en la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio a acetilcolina en arterias estimuladas con fenilefrina, comparadas con las aortas de WKY control (Figura 14A). Sin embargo, no se observaron diferencias en la respuesta vasodilatadora independiente de endotelio al dador de NO nitroprusiato sódico en vasos precontraídos con noradrenalina (Figura 14B).

En las ratas SHR tratadas con quercetina, ésta produjo un aumento significativo en la relajación a acetilcolina a 10^{-7} M y 10^{-6} M, no teniendo efecto en ratas WKY (Figura 14A). Sin embargo, quercetina no modificó la respuesta relajante a nitroprusiato sódico (Figura 14B). El inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, apocinina (10^{-3} M), adicionada al baño de órganos aumentó significativamente la relajación inducida por acetilcolina en anillos procedentes de SHR control, sin afectar a los de WKY (Figura 14C).

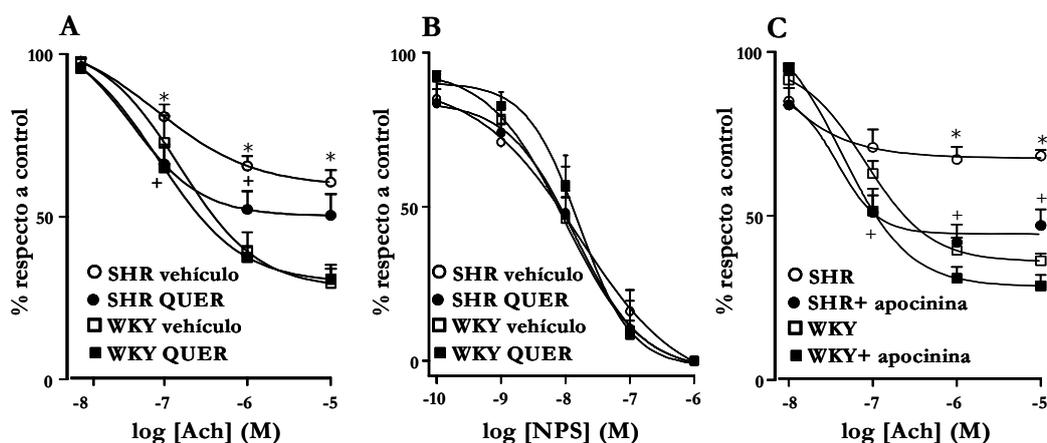


Figura 14. *Relajaciones dependientes de endotelio inducidas por acetilcolina (ACh) (A) y relajaciones independientes de endotelio inducidas por nitroprusiato sódico (NPS) (B) en aorta de los grupos SHR vehículo (○, n = 5), SHR QUER (●, n = 5), WKY vehículo (□, n = 6) y WKY QUER (■, n = 6). Las relajaciones inducidas por ACh se llevaron a cabo en arterias contraídas con fenilefrina 10^{-6} M, y las relajaciones a NPS en anillos precontraídos con noradrenalina 10^{-6} M. * $P < 0,05$ vs. el grupo WKY vehículo, + $P < 0,05$ vs. el grupo SHR vehículo. (C) Efectos de apocinina (10^{-3} M) añadida al baño en la relajación inducida por acetilcolina en anillos aórticos de SHR y WKY (n = 6-8). * $P < 0,05$ vs. anillos WKY, + $P < 0,05$ vs. anillos de SHR sin tratar con apocinina.*

6.4 Efectos de quercetina en la vasoconstricción dependiente de endotelio en aorta torácica.

En presencia de L-NAME (10^{-4} M), las aortas de SHR mostraron un aumento en la respuesta vasoconstrictora dependiente de endotelio a acetilcolina comparadas con sus controles normotensas WKY (Figura 15). La coincubación de los vasos con SQ 29.548 (10^{-7} M), antagonista de los receptores TP de prostanoideos, prácticamente abolió estas contracciones, sugiriendo que están mediadas por la liberación de un vasoconstrictor prostanoideo. Sin embargo, el tratamiento con quercetina no tuvo efecto en la vasoconstricción dependiente de endotelio inducida por acetilcolina (Figura 15).

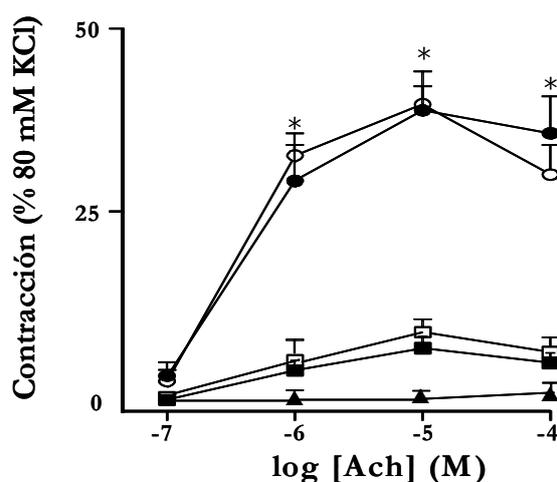


Figura 15. Contracciones dependientes de endotelio inducidas por acetilcolina (ACh) en aorta de los grupos SHR vehículo (○, $n = 5$), SHR quercetina (●, $n = 5$), WKY vehículo (□, $n = 6$) y WKY quercetina (■, $n = 6$). Las contracciones inducidas por ACh se llevaron a cabo en arterias tratadas con L-NAME (10^{-4} M) y se expresaron como porcentaje de respuesta a una contracción previa con KCl 80 mM. En algunos anillos del grupo SHR vehículo se añadió SQ 29.548 (10^{-7} M) treinta minutos antes que la ACh (▲, $n = 5$). Los valores se expresan como medias \pm error estándar medio. * $P < 0,05$ vs. el grupo WKY vehículo.

6.5 Efecto de quercetina sobre la producción de TXB_2 en aorta torácica.

El TXB_2 es el metabolito estable del prostanoide vasoconstrictor y proagregante plaquetario TXA_2 , por eso la producción de TXB_2 se usó para estimar la síntesis de TXA_2 . La producción media de TXB_2 fue significativamente mayor en el medio de incubación de los anillos de SHR que en el de WKY (Figura 16). Sin embargo, el tratamiento con quercetina no tuvo efecto en la producción de TXB_2 en ninguno de los casos.

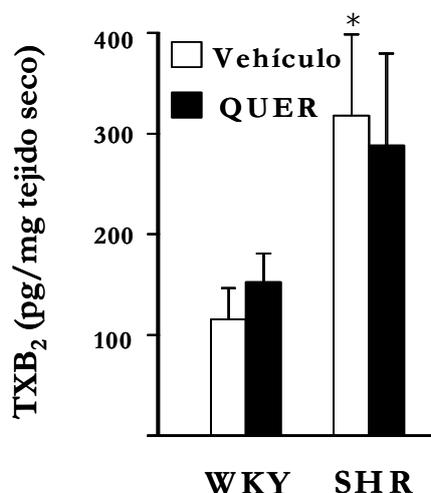


Figura 16. Niveles de TXB₂ medidos en el medio de incubación de anillos aórticos de los grupos SHR vehículo ($n = 5$), SHR QUER ($n = 5$), WKY vehículo ($n = 6$) y WKY QUER ($n = 6$). Los valores se expresan como medias \pm error estándar medio. * $P < 0,05$ vs. el grupo WKY vehículo.

6.6 Efectos de quercetina en la actividad vascular de eNOS y en la expresión proteica de eNOS y caveolina-1.

Comparado con el grupo WKY control, las SHR no tratadas mostraron una reducción de la actividad eNOS en aorta (Figura 17A). Paradójicamente, la expresión proteica de eNOS fue mayor, y la de caveolina-1 menor en la aorta de SHR que en el correspondiente grupo WKY (Figura 17B). Tras el tratamiento con quercetina durante 13 semanas, en el grupo de las SHR la actividad eNOS estaba aumentada mientras que la expresión proteica de eNOS se redujo y la de caveolina-1 aumentó. Con estos cambios debidos al tratamiento, la actividad eNOS, la expresión de eNOS y la expresión de caveolina-1 en aorta de SHR tratadas con quercetina fueron similares a las de las normotensas WKY.

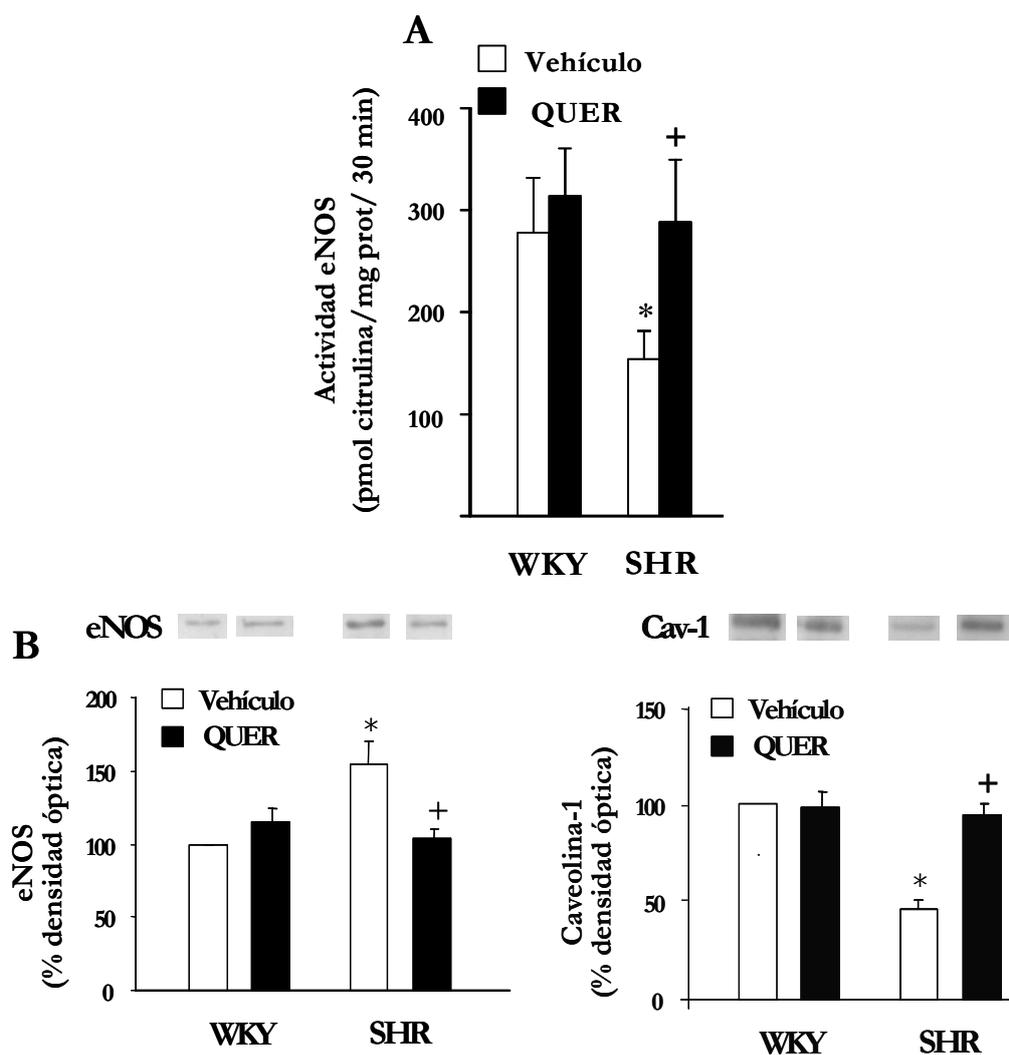


Figura 17. (A) Actividad eNOS medida mediante la conversión de L- 3 H] arginina a L- 3 H] citrulina en homogenados aórticos de los grupos SHR vehículo ($n = 9$), SHR QUER ($n = 9$), WKY vehículo ($n = 10$) y WKY QUER ($n = 10$). (B) Western blots de las proteínas eNOS y caveolins-1 en aorta (representativos de 3 experimentos) de los distintos grupos experimentales. Los valores se expresan como medias \pm error estándar medio. * $P < 0,05$ vs. el grupo WKY vehículo, $^+ P < 0,05$ vs. el grupo SHR vehículo (test de Bonferroni).

6.7 Efecto de quercetina en la producción vascular de O_2^- .

No se encontraron diferencias significativas en la producción basal de O_2^- , medida por quimioluminiscencia, entre los grupos (Figura 18). La incubación

aórtica con NADPH (100 μ M) aumentó la generación de O_2^- en ambos casos, pero el aumento fue significativamente mayor en SHR que en las ratas control WKY. En una serie de experimentos en SHR sin tratar y WKY de similar edad, la preincubación del segmento de vaso con SOD (150 U/ml) disminuyó las señales quimioluminiscentes de la lucigenina a niveles basales y el inhibidor de NAD(P)H oxidasa DPI (10 μ M) suprimió el aumento inducido por NADPH (datos no mostrados). El tratamiento crónico con quercetina indujo una disminución significativa de la producción de O_2^- sólo en SHR, no teniendo efecto en las ratas WKY.

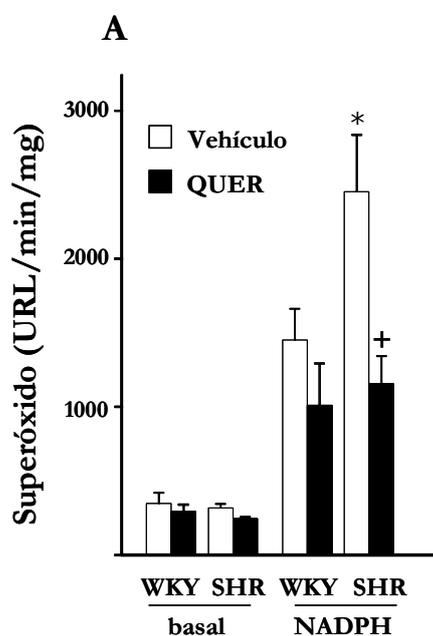


Figura 18. Liberación de superóxido (O_2^-) cuantificada por quimioluminiscencia con lucigenina, en anillos aórticos intactos de los grupos SHR vehículo ($n = 5$), SHR QUER ($n = 5$), WKY vehículo ($n = 6$) y WKY QUER ($n = 6$), en condiciones basales y estimulados por NADPH (100 μ M). Los valores se expresan como medias \pm error estándar medio. * $P < 0,05$ vs. el grupo WKY vehículo, ⁺ $P < 0,05$ vs. el grupo SHR vehículo.

6.8 Efecto de quercetina en la expresión vascular de p47^{phox}.

La sobreexpresión de los componentes de membrana de NAD(P)H oxidasa se ha asociado con un aumento en la generación de O₂⁻ en ciertas condiciones patofisiológicas (Calo *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2003; Ulker *et al.*, 2003). Por eso estudiamos la expresión proteica de p47^{phox}, la subunidad de NAD(P)H oxidasa que se sabe está regulada el alza en la hipertensión. Como se esperaba, en aortas de SHR no tratadas encontramos mayores niveles de proteína de este componente de NAD(P)H oxidasa en ambas fracciones, citosólica y particulada, que en las aortas de WKY. El tratamiento crónico con quercetina disminuyó los niveles de esta proteína en ambas fracciones de aorta de SHR (Figura 19).

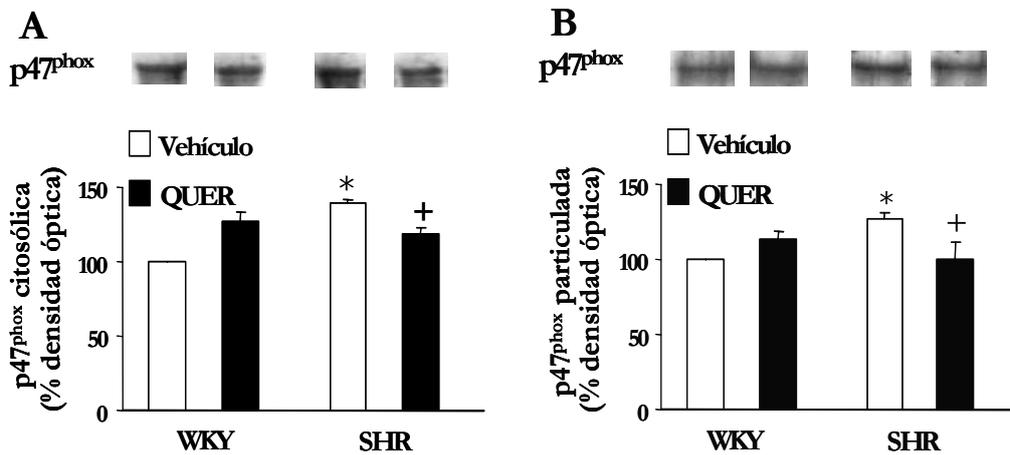


Figura 19. Western blots de proteína p47^{phox} en fracciones (A) citosólica y (B) particulada de aorta de los diferentes grupos (representativos de 3 experimentos). Los valores se expresan como medias \pm error estándar medio. * $P < 0,05$ vs. el grupo WKY vehículo, ⁺ $P < 0,05$ vs. el grupo SHR vehículo.

6.9 Efectos de quercetina sobre la morfología cardiaca asociada a la hipertensión.

Para estudiar los posibles cambios en la estructura y composición cardiacas se tiñeron mediante la técnica del tricrómico de Masson secciones de ventrículo izquierdo de los distintos grupos, pudiendo observarse de esta manera la infiltración de tejido conjuntivo (colágeno y reticulina), los núcleos celulares y el citoplasma celular.

En las SHR se observó un aumento de tejido conjuntivo (color azul) alrededor de los vasos y entre los cardiomiocitos (fibrosis) comparadas con sus controles WKY (Figura 20). También se observó citomegalia (citoplasma en rojo, muy aumentado), debido a la hipertrofia de las células miocárdicas. El tratamiento crónico con quercetina evitó el aumento de tejido fibroso alrededor de los vasos y fibras musculares y previno la hipertrofia celular en las SHR, manteniendo una estructura cardiaca semejante a la de los controles normotensos, y sin producir variaciones morfológicas apreciables en las ratas WKY tratadas.

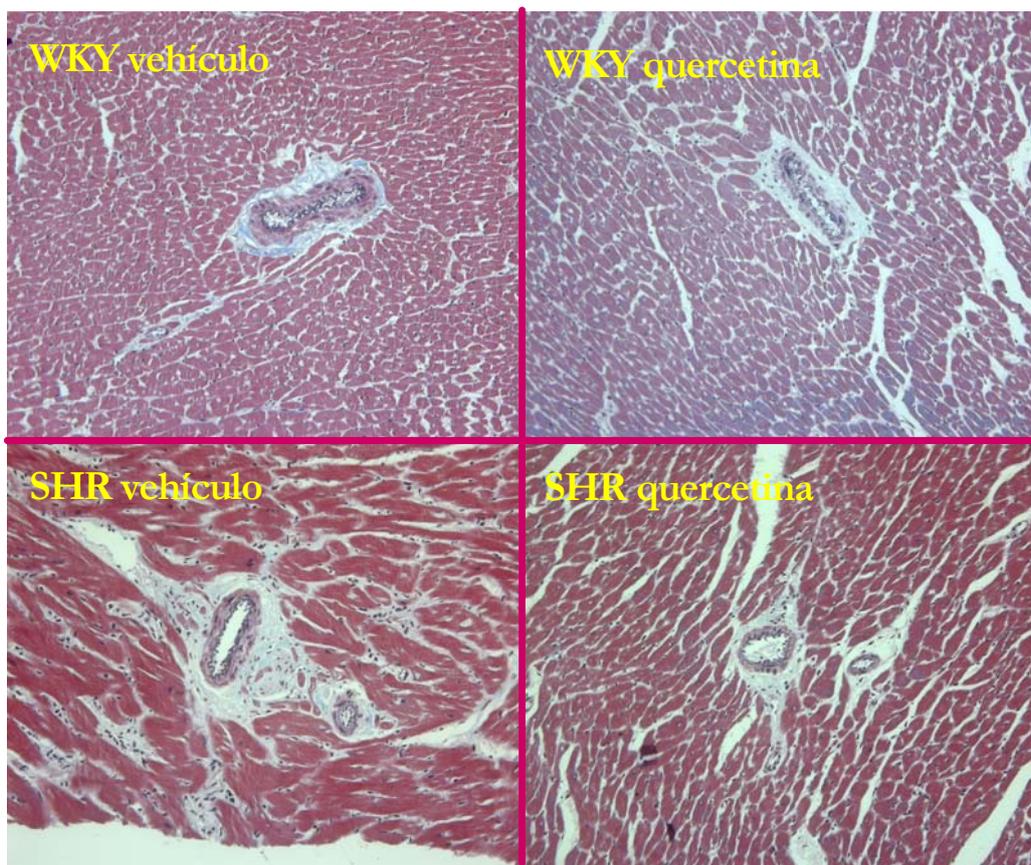


Figura 20. El tratamiento con quercetina previno el incremento de tejido conjuntivo (color azul) y la hipertrofia celular cardíaca debidas a la hipertensión en SHR, conservando una morfología similar a la de las ratas normotensas WKY, sin producir cambios en las WKY tratadas . Las imágenes son representativas de 5-6 secciones de dos ratas de cada grupo.

7. Efecto de quercetina e isorhamnetina sobre la disfunción endotelial inducida por angiotensina II *in vitro*.

7.1 Disfunción endotelial.

La incubación de los anillos aórticos en solución de Krebs durante 2, 4, 6 u 8 horas en ausencia de angiotensina II no produjo cambios significativos en la respuesta contráctil a fenilefrina ni en la relajación en respuesta a acetilcolina (Figura 21, Tabla 2). Pese a que angiotensina II no produjo cambios significativos en la respuesta contráctil a fenilefrina, su incubación condujo a un desarrollo progresivo de disfunción endotelial, evidenciada por la reducción del máximo efecto relajante a acetilcolina. La inhibición fue máxima a las 6 horas, por lo que se escogió este intervalo de tiempo para llevar a cabo los experimentos posteriores. La coincubación con losartán (10 μ M), antagonista AT-1, previno la disfunción endotelial inducida por angiotensina II (Figura 22). En aortas preincubadas con angiotensina II, tanto PEG-SOD (una forma de SOD permeable a las membranas) (100 U/ml, añadida al baño de órganos) como el inhibidor de NAD(P)H oxidasa, apocinina (100 μ M, añadido al baño de órganos) aumentaron la respuesta vasodilatadora a acetilcolina (Figura 22).

La incubación con quercetina o isorhamnetina (1 o 10 μ M) durante 6 horas no tuvo un efecto significativo en la respuesta contráctil a fenilefrina ni en las arterias control ni en las tratadas con angiotensina II (Tabla 3). Sin embargo, ambos flavonoides previnieron la disfunción endotelial inducida por angiotensina II (Figura 23, Tabla 3). La relajación a acetilcolina fue significativamente aumentada por quercetina 1 y 10 μ M y por isorhamnetina 10 μ M.

No se observaron diferencias en la respuesta vasodilatadora independiente de endotelio al vasodilatador dador de NO, y por tanto independiente de endotelio,

NPS (Figura 24) en los anillos aórticos tratados con vehículo, angiotensina II, angiotensina II más quercetina, o angiotensina II más isorhamnetina.

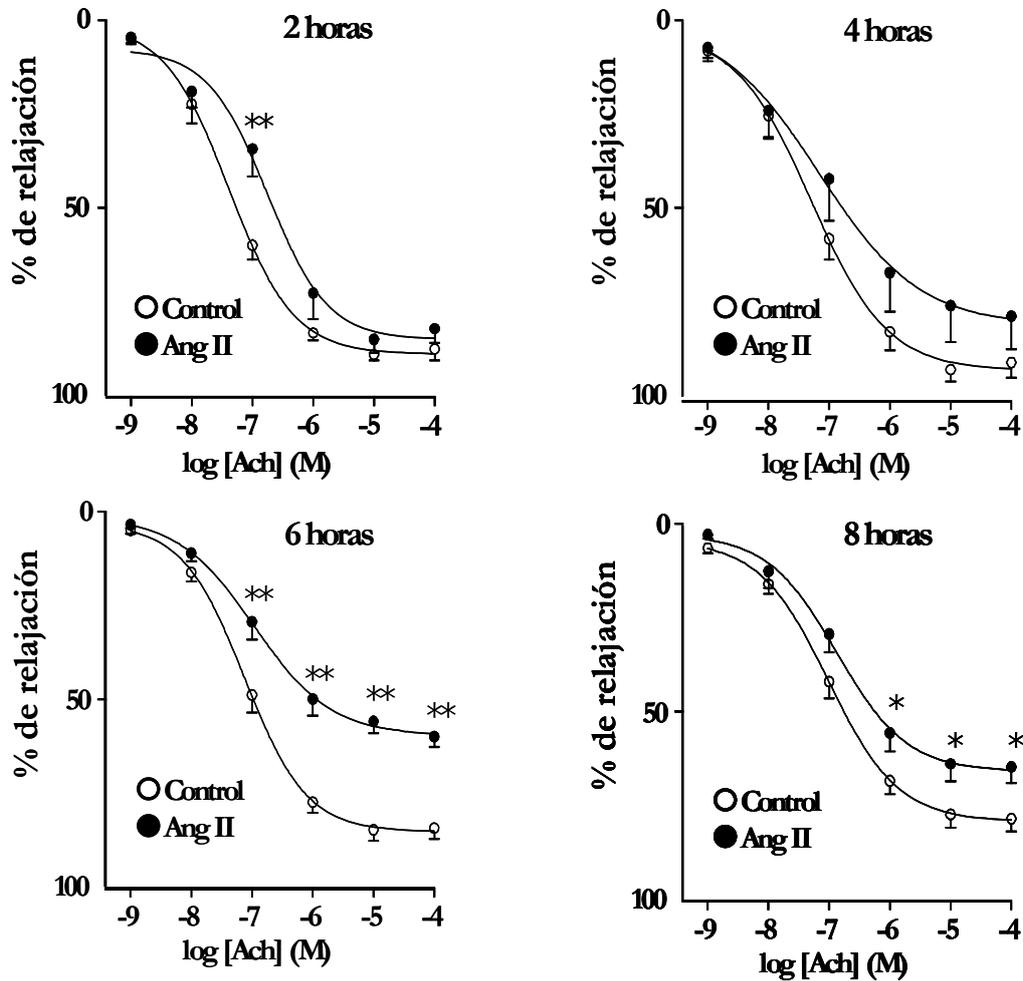


Figura 21. Evolución de la disfunción endotelial inducida por angiotensina II. Efectos de la incubación durante 2, 4, 6 u 8 horas con o sin Ang II (100 nM) en la relajación dependiente de endotelio inducida por acetilcolina (ACh) en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina 1 μ M. Los resultados se muestran como medias \pm error estándar medio de 9-14 experimentos. * P < 0,05, ** P < 0,01 vs. anillos control.

Tabla 2. Respuestas contráctiles a fenilefrina ($1 \mu\text{M}$) y valores de pD_2 y E_{max} para relajaciones inducidas por acetilcolina en anillos aórticos incubados con angiotensina II ($1 \mu\text{M}$) durante 0, 2, 4, 6 u 8 h calculados a partir de los datos de la Figura 9.

Tiempo	n	Contracción a fenilefrina (mg)	Relajación a Ach	
			pD_2	E_{max} (%)
0 h	8	1612 \pm 123	7,13 \pm 0,12	82,0 \pm 4,1
2 h	11	1565 \pm 162	7,35 \pm 0,08	87,7 \pm 3,0
2 h + Ang II	13	1876 \pm 143	7,00 \pm 0,17	82,3 \pm 3,8
4 h	11	1632 \pm 136	7,35 \pm 0,14	91,3 \pm 4,0
4 h + Ang II	10	1946 \pm 250	6,85 \pm 0,35	78,9 \pm 8,8
6 h	12	1639 \pm 109	7,10 \pm 0,09	84,4 \pm 2,9
6 h+ Ang II	14	1822 \pm 159	6,83 \pm 0,12	60,0 \pm 2,8*
8 h	11	1555 \pm 139	7,09 \pm 0,09	78,6 \pm 3,4
8 h + Ang II	9	1792 \pm 115	6,91 \pm 0,20	64,8 \pm 4,3*

Los valores son medias \pm error estándar medio. * $p < 0,05$ vs. arterias sin tratar con angiotensina II.

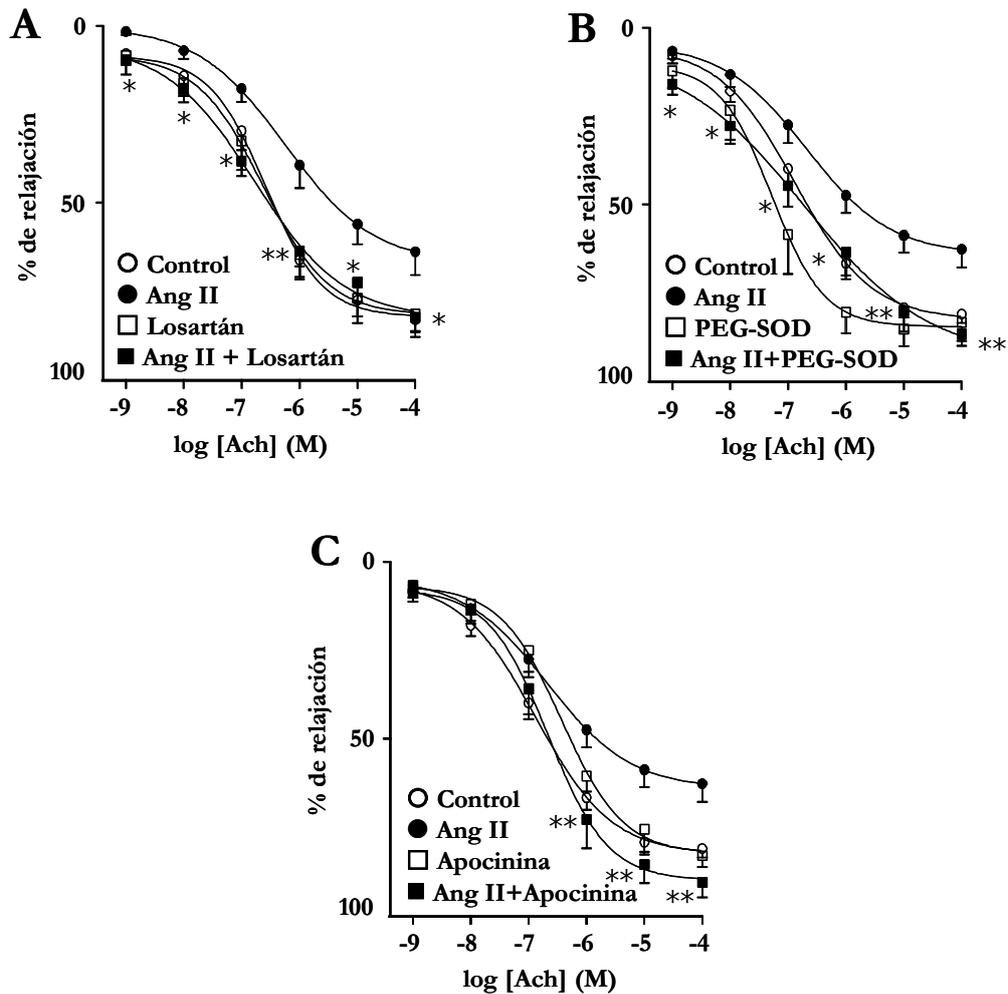


Figura 22. Inhibición de la disfunción inducida por angiotensina II (*Ang II*) debido al antagonismo de receptores *AT-1* y la captación o disminución en la producción de aniones superóxido. Los anillos aórticos se incubaron durante 6 horas con o sin *Ang II* ($1 \mu\text{M}$) y después se montaron en baños de órganos en ausencia o presencia de (A) losartán ($10 \mu\text{M}$), (B) polietilenglicol superóxido dismutasa (PEG-SOD, 100 U/ml) o (C) apocinina ($100 \mu\text{M}$) durante 1 hora. Los anillos se estimularon con fenilefrina ($1 \mu\text{M}$) y la relajación dependiente de endotelio se indujo con acetilcolina. Los resultados son medias \pm error estándar medio de 7-10 experimentos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ angiotensina II + tratamiento vs. angiotensina II sola.

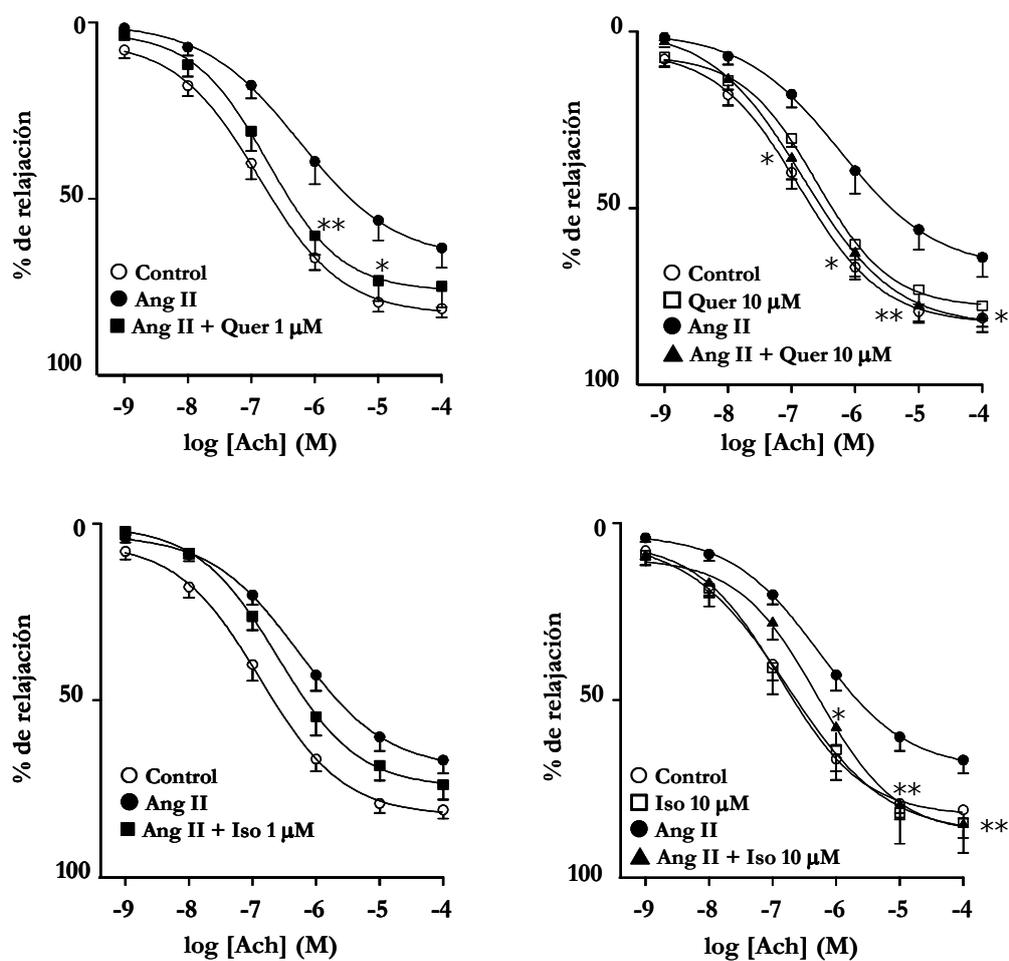


Figura 23. Prevención de la disfunción endotelial inducida por angiotensina II mediante quercetina e isorhamnetina. Los anillos aórticos se incubaron con o sin quercetina (Quer 1 o 10 μM) o isorhamnetina (Iso 1 o 10 μM) y con o sin angiotensina II (1 μM) durante 6 horas y luego montados en baños de órganos. Se estimularon con fenilefrina (1 μM) y se llevaron a cabo las relajaciones dependientes de endotelio con acetilcolina. Los resultados son medias \pm error estándar medio de 10-14 experimentos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ angiotensina II + flavonoide vs. angiotensina II sola.

Tabla 3. Respuestas contráctiles a fenilefrina (1 μ M) y valores de pD_2 y E_{max} para las relajaciones inducidas por acetilcolina en anillos aórticos incubados con angiotensina II (1 μ M) durante 6 h en presencia de vehículo dimetil sulfóxido (DMSO), losartán, quercetina (Quer) o isorhamnetina (Iso) calculados a partir de los datos de la Figura 11 y otros experimentos.

Tratamiento	n	Contracción a fenilefrina (mg)	Relajación a Ach	
			pD_2	E_{max} (%)
DMSO	6	1998 \pm 339	6,75 \pm 0,18	83,2 \pm 3,2
Ang II + DMSO	13	1806 \pm 227	6,68 \pm 0,20	63,9 \pm 5,6
Losartán (10 μ M)	5	1614 \pm 235	6,83 \pm 0,23	81,5 \pm 5,2
Ang II + Losartán (10 μ M)	7	1653 \pm 192	7,03 \pm 0,25	82,6 \pm 5,4*
GW9662 (1 μ M)	8	1725 \pm 198	6,88 \pm 0,13	80,3 \pm 3,9
Ang II + GW9662 (1 μ M)	9	2166 \pm 405	6,78 \pm 0,09	66,0 \pm 6,3
Quercetina (10 μ M)	12	1759 \pm 177	6,77 \pm 0,10	77,6 \pm 3,6
Ang II + Quercetina (1 μ M)	13	1829 \pm 227	6,64 \pm 0,09	74,6 \pm 5,6
Ang II + Quercetina (10 μ M)	14	1493 \pm 150	6,77 \pm 0,15	81,1 \pm 4,0*
Isorhamnetina (10 μ M)	5	1561 \pm 209	6,92 \pm 0,19	84,7 \pm 8,6
Ang II + Iso (1 μ M)	10	1820 \pm 212	6,65 \pm 0,11	74,0 \pm 4,2
Ang II + Iso (10 μ M)	10	1630 \pm 160	6,62 \pm 0,17	85,3 \pm 3,7**

Los valores son medias \pm error estándar medio. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs arterias tratadas con angiotensina II + DMSO.

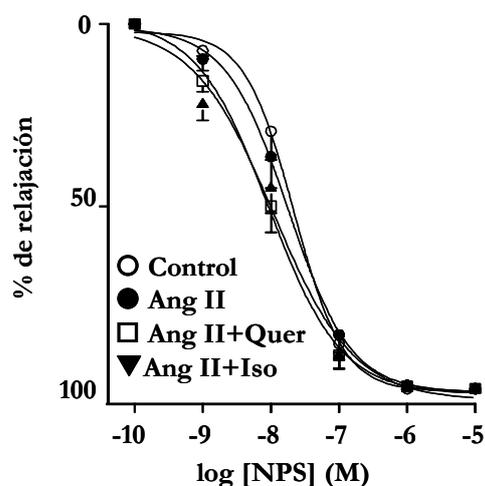


Figura 24. La relajación independiente de endotelio a nitroprusiato sódico (NPS) no se ve afectada por angiotensina II, quercetina o isorhamnetina. Los experimentos se llevaron a cabo como en la Figura 23, excepto que la relajación se indujo con NPS. Quercetina e isorhamnetina se usaron a la concentración de 10 μ M. Los resultados son medias \pm error estándar medio de 5-9 experimentos.

7.2 Localización de la producción *in situ* de O_2^- .

Con el fin de detectar y localizar en la pared vascular la producción de O_2^- analizamos la fluorescencia roja del etidio en secciones de aortas incubadas con DHE, ya que éste se transforma en etidio debido a la oxidación producida por el O_2^- . Observamos núcleos de fluorescencia roja en la adventicia, la capa media y las células endoteliales (Figura 25A). La fluorescencia roja se cuantificó y los datos fueron normalizados mediante la fluorescencia azul del marcador nuclear DAPI (Figura 25B). A las 6 horas angiotensina II había inducido un aumento en la producción de O_2^- , que fue más evidente en la capa media del vaso. Quercetina e isorhamnetina (10 μ M) no alteraron la producción de O_2^- en las arterias control, pero ambas previnieron el aumento inducido por angiotensina II.

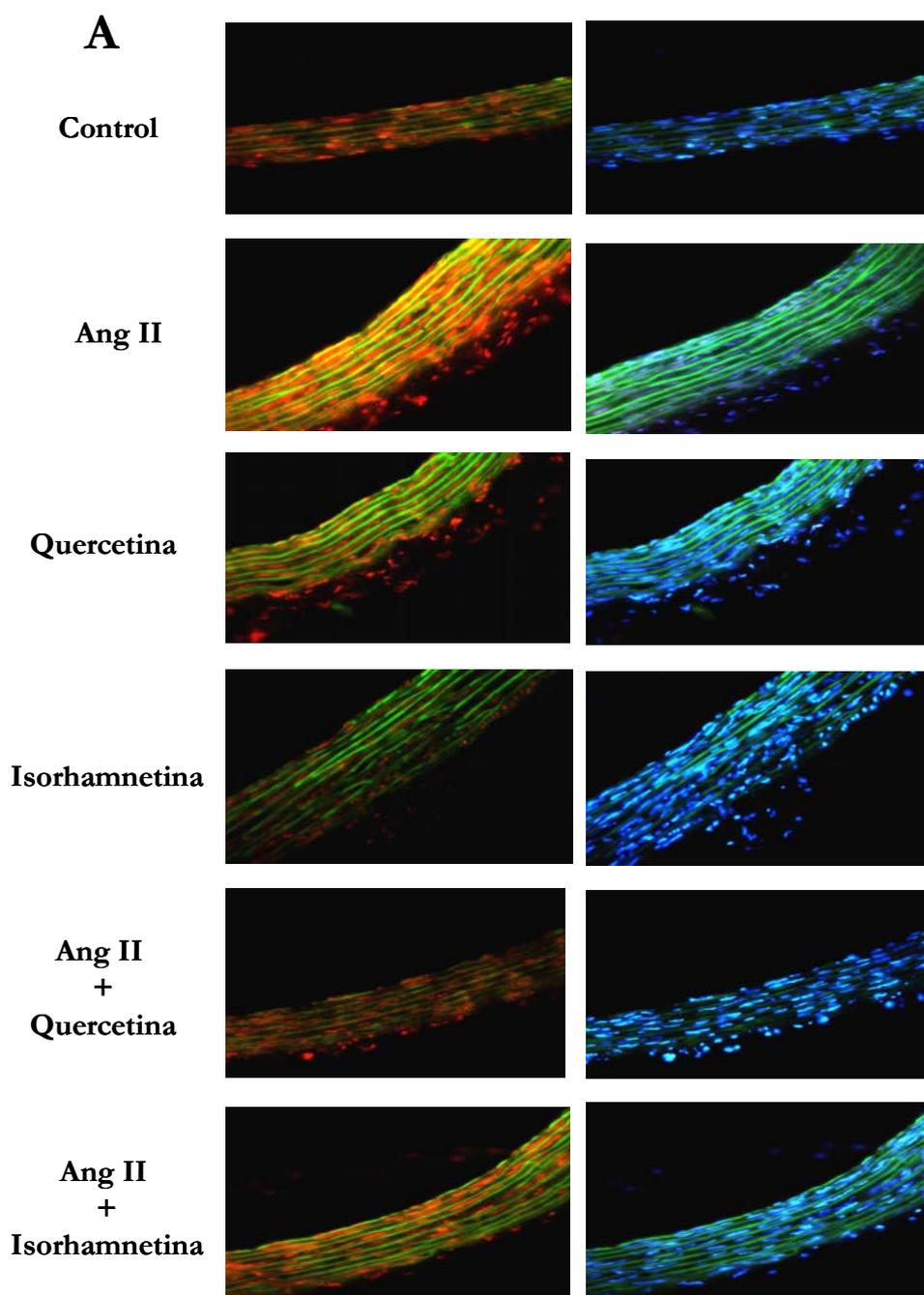


Figura 25A. Efecto de quercetina e isorhamnetina en la sobreproducción de O_2^- inducida por angiotensina II. Las imágenes de la izquierda muestran arterias incubadas en presencia de DHE, que produce fluorescencia roja cuando es oxidado por O_2^- a etidio, y las imágenes de la derecha muestran la fluorescencia azul del marcador nuclear DAPI. Ambas clases de imágenes están superpuestas con la autofluorescencia verde de la elastina ($\times 400$ aumentos). Las imágenes son representativas de 5-6 secciones de al menos 3 aortas diferentes.

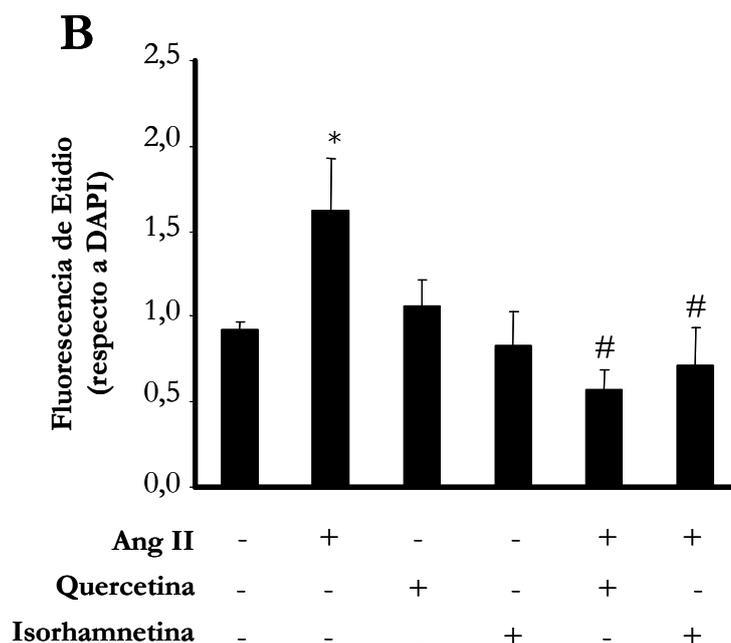


Figura 25B. Efecto de quercetina e isorhamnetina en la sobreproducción de O_2^- inducida por angiotensina II. Valores de la fluorescencia roja del etidio normalizados con la fluorescencia azul del DAPI. Los anillos aórticos se incubaron con o sin quercetina o isorhamnetina ($10 \mu\text{M}$) y con o sin angiotensina II ($1 \mu\text{M}$) durante 6 horas. Los resultados son medias \pm error estándar medio de 4-5 secciones de tres aortas de cada grupo analizadas. * $P < 0,05$ vs. Control, # $P < 0,05$ vs. angiotensina II (prueba t de Student's de una cola desapareada).

7.3 Expresión y localización de la proteína p47^{phox}.

En los anillos aórticos, la incubación con angiotensina II durante 6 horas aumentó la expresión de p47^{phox} determinada mediante western blot (Figura 26). Estudios preliminares habían mostrado que este aumento era máximo a las 6 u 8 horas. La coincubación con quercetina o isorhamnetina previno este aumento inducido por angiotensina II.

El análisis inmunohistoquímico mostró que la sobreexpresión de p47^{phox} ocurrió principalmente en la capa media vascular, y fue también prevenido por quercetina e isorhamnetina ($10 \mu\text{M}$) (Figura 27).

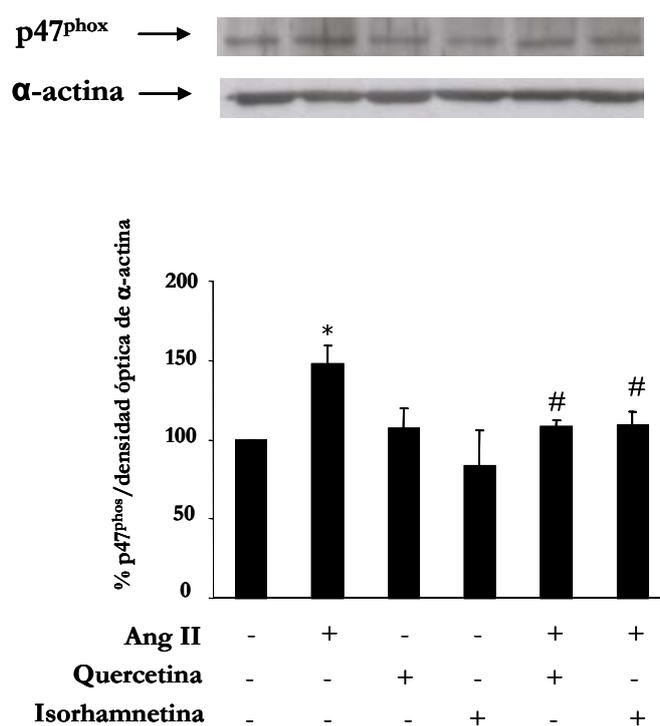


Figura 26. Expresión de proteína p47^{phox} en fracción citosólica de aorta. La inducción de p47^{phox} por angiotensina II es prevenida por quercetina e isorhamnetina. Las aortas se incubaron durante 6 horas en ausencia o presencia de angiotensina II (1 μM), quercetina (10 μM) o isorhamnetina (10 μM) y la expresión de la proteína se analizó mediante western blot. Los valores son medias ± error estándar medio (n = 4) de valores densitométricos normalizados con α-actina y expresados como porcentaje de control. *P < 0,05 vs. control, #P < 0,05 vs. angiotensina II (prueba t de Student's de una cola desapareada).

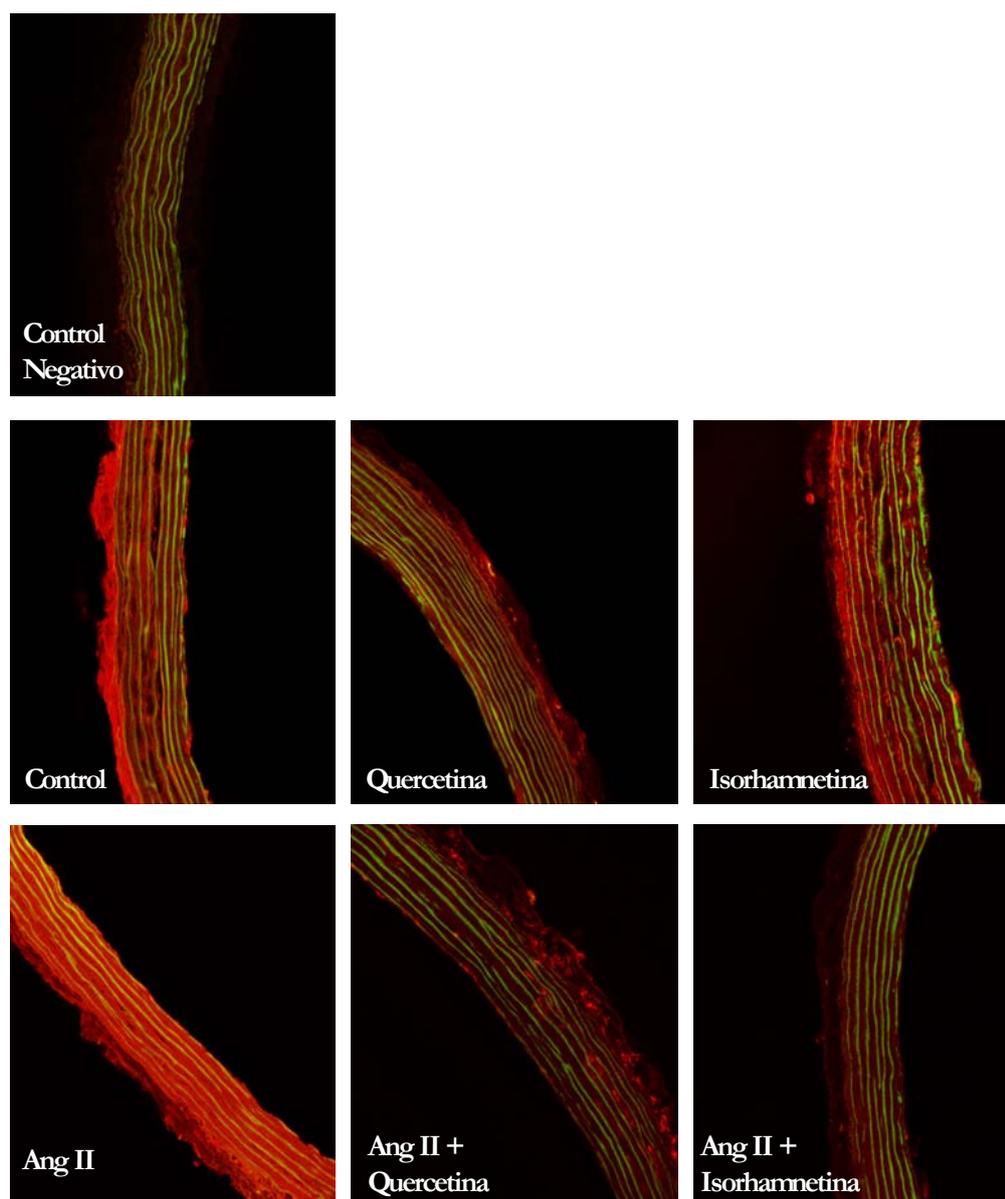


Figura 27. Localización inmunohistoquímica de $p47^{phox}$. Las aortas se incubaron durante 6 horas en ausencia o presencia de angiotensina II ($1 \mu M$), quercetina ($10 \mu M$) o isorhamnetina ($10 \mu M$). Las imágenes muestran la proteína $p47^{phox}$ (fluorescencia roja) superpuesta con la autofluorescencia verde de la elastina. También se muestra el control negativo en ausencia de anticuerpo primario. Las imágenes son representativas de 10-12 secciones de al menos 3 aortas diferentes.

7.4 Papel de los receptores de PPAR- γ .

El antagonista de receptores de PPAR- γ GW9662 (1 μ M) (Fu *et al.*, 2001) no modificó la relajación inducida por acetilcolina en arteria control y no previno la disfunción endotelial inducida por angiotensina II (Figura 28). Además la mejora en la relajación a acetilcolina, debida a quercetina e isorhamnetina, no se vio afectada por GW 9662 (Figura 28).

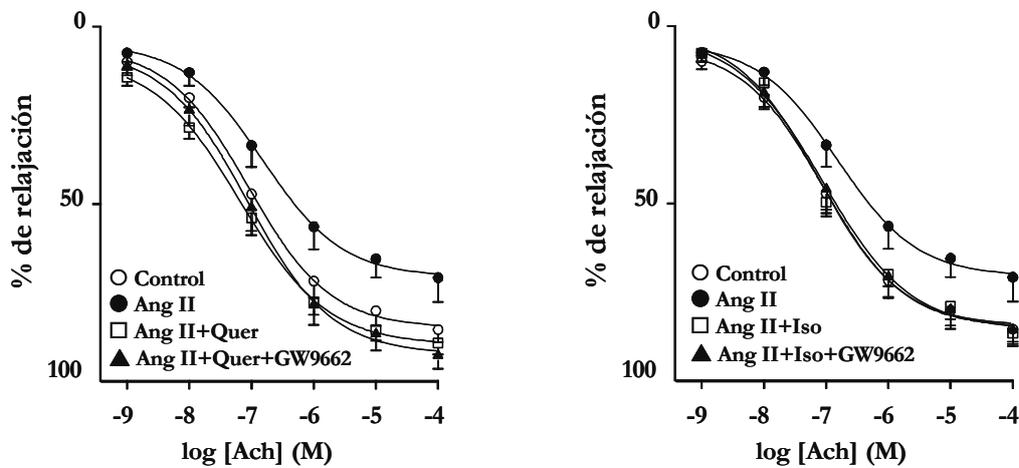


Figura 28. La restauración de la función endotelial inducida por quercetina e isorhamnetina no se ve afectada por el antagonista de receptores PPAR- γ GW9662. Los experimentos se llevaron a cabo como en la Figura 14, y los anillos aórticos se incubaron durante 6 horas en ausencia o presencia de GW9662 (1 μ M). Los resultados son medias \pm error estándar medio de 8-10 experimentos.

Discusión.

Discusión.

8. Efectos preventivos de quercetina sobre la hipertensión genética.

En estudios anteriores se ha demostrado que quercetina reduce la presión sanguínea en todos los modelos experimentales de hipertensión en los que se ha ensayado, incluyendo SHR con hipertensión establecida (Duarte *et al.*, 2001a), en ratas deficientes en NO (Duarte *et al.*, 2002), en ratas tratadas con acetato de deoxicorticosterona más sal (DOCA-sal) (Galisteo *et al.*, 2004), en ratas Goldblatt dos riñones, un clip (García-Saura *et al.*, 2005) y en ratas Dahl hipertensas sensibles a la sal (Aoi *et al.*, 2004). En esta Tesis Doctoral hemos demostrado por vez primera que quercetina previene el desarrollo de la hipertensión cuando se administra a SHR de 5 semanas de edad. Estos modelos se asocian con disfunción endotelial aórtica, y en todos ellos quercetina mejoró la vasodilatación dependiente de endotelio (con la excepción de las ratas Dahl, en las que no se evaluó). Sin embargo, los mecanismos subyacentes implicados no han sido analizados con detalle hasta el momento.

En el presente estudio mostramos que la mejora de la función endotelial inducida por el tratamiento crónico con quercetina se asocia con un aumento de la actividad eNOS y una reducida expresión de p47^{phox} con la subsiguiente reducción de la actividad NAD(P)H oxidasa.

En aorta de rata la vasodilatación dependiente de endotelio se debe casi completamente a la liberación endotelial de NO y la subsiguiente activación de la guanilato ciclasa soluble en las células del músculo liso vascular (Ulker *et al.*, 2003). La vasodilatación independiente de endotelio inducida por el activador de la guanilato ciclasa, nitroprusiato sódico, fue similar en SHR y WKY, y no se vio afectada por quercetina, indicando que la disfunción endotelial y su mejora por

quercetina se debe a cambios en la biodisponibilidad de NO derivado de endotelio, más que a cambios en la sensibilidad del músculo liso vascular a NO. Además, pueden ocurrir cambios aparentes en la vasodilatación dependiente de endotelio, debidos a la liberación de vasoconstrictores producidos y liberados por el endotelio, que originan efectos opuestos al NO (Nagao *et al.*, 1992a,b; Auch-Schwelk *et al.*, 1990). De hecho, de acuerdo con datos anteriores (Nagao *et al.*, 1992a), las SHR mostraron una vasoconstricción dependiente de endotelio inducida por acetilcolina aumentada respecto a sus controles normotensos WKY en arterias tratadas con el inhibidor de la eNOS, L-NAME. Esta respuesta fue abolida por el antagonista del receptor de tromboxano-endoperóxido SQ-29,548 (Auch-Schwelk *et al.*, 1990), lo que indica que la acetilcolina provoca también la liberación endotelial de prostanoïdes vasoconstrictores que modulan la vasodilatación mediada por NO. Sin embargo, en el modelo objeto de esta tesis, quercetina no modificó la vasoconstricción dependiente de endotelio inducida por acetilcolina, lo que sugiere que el efecto protector de quercetina en la función endotelial no tiene relación con cambios en la vasoconstricción dependiente de endotelio. Estos resultados no descartan sin embargo un posible efecto de quercetina en la vasoconstricción derivada de endotelio en otros modelos de hipertensión en ratas. De hecho, la vasoconstricción inducida por acetilcolina fue inhibida por el tratamiento crónico con quercetina en ratas deficientes en NO (Duarte *et al.*, 2002) y en ratas Goldblatt (García-Saura *et al.*, 2005). Además, los datos mostrados en esta tesis indican que la producción aórtica de TXA₂ estaba aumentada en SHR, lo que también se vio en ratas deficientes en NO (Duarte *et al.*, 2002) y en ratas Goldblatt (García-Saura *et al.*, 2005) comparadas con sus controles normotensos. Sin embargo, quercetina redujo los niveles aórticos de TXA₂ en ratas deficientes en NO y Goldblatt pero no en SHR. Vistos en conjunto estos datos sugieren firmemente que quercetina restaura la función endotelial en SHR debido al aumento de la biodisponibilidad de NO.

Los potenciales mecanismos por los que quercetina mejora las respuestas a NO derivado de endotelio pueden estar relacionados con:

1. Cambios en la actividad y/o en la expresión de eNOS:

La menor síntesis de NO asociada a disfunción endotelial puede ser causada por numerosos factores, como por ejemplo, una disminuida expresión de eNOS, la enzima que lo sintetiza en el endotelio vascular, a una modificación post-transduccional de la enzima (como su fosforilación o modificaciones por ácidos grasos), a interacciones con proteína de estrés calórico 90 (hsp 90) y caveolinas, o a concentraciones por debajo del nivel óptimo del sustrato de la enzima, L-arginina, o de su cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄) (Yang *et al.*, 2003).

En concordancia con los datos publicados por Vaziri y colaboradores (1998), nosotros hemos encontrado que la actividad basal de eNOS en SHR es significativamente menor que la de WKY, lo que concuerda con las relajaciones dependientes de endotelio disminuidas y los mayores niveles de presión arterial obtenidos. Quercetina aumentó la actividad eNOS en SHR, lo que podría explicar, al menos parcialmente, la mejora en la relajación dependiente de endotelio. Este efecto no se observó en WKY lo que sugiere que quercetina no interfiere con la actividad eNOS en sí misma, sino con su expresión, la abundancia de cofactores u otras proteínas que interactúan. Los actuales datos sobre la regulación molecular de la expresión vascular de eNOS en SHR son bastante conflictivos, ya que se ha señalado tanto una menor (Huang, 2003) como una mayor expresión de la enzima (Khan *et al.*, 2002; Vaziri *et al.*, 1998) respecto a WKY. Los datos obtenidos en esta tesis muestran, en contraste con una menor actividad eNOS, que la expresión aórtica de eNOS estaba aumentada y la de su proteína inhibitoria caveolina-1 reducida en SHR comparadas con WKY. Este fenómeno concuerda con anteriores estudios, en los que se demuestra que el NO ejerce un efecto de retroalimentación negativa en la regulación de la expresión de eNOS (Chou *et al.*, 1998). Así, los cambios coordinados en la expresión de eNOS y su regulador alostérico caveolina-1, pueden observarse tal vez como un mecanismo compensatorio para mantener la producción de NO en una situación de estrés oxidativo aumentado. De hecho, nuestros datos avalan esta hipótesis, puesto que

quercetina reduce el estrés oxidativo y previene estos cambios compensatorios en la expresión proteica de eNOS y caveolina-1 en SHR.

2. Un descenso en los niveles vasculares de O_2^- , lo que disminuiría la inactivación de NO:

Se ha sugerido que los niveles de O_2^- tras el tratamiento crónico con quercetina en modelos experimentales de hipertensión están reducidos, basándose en medidas de marcadores de estrés oxidativo sistémico. Así, la excreción urinaria de 8-isoprostaglandina F_{2x} , malonildialdehído en plasma, o sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico en plasma fueron disminuidas por quercetina en SHR (Piech *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2001a), ratas deficientes en NO (Duarte *et al.*, 2002), ratas tratadas DOCA-sal (Galisteo *et al.*, 2004; Vaziri *et al.*, 1999) o ratas Goldblatt dos riñones, un clip (García-Saura *et al.*, 2005). Sin embargo, los efectos directos de quercetina en la producción vascular de O_2^- eran desconocidos hasta ahora. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que quercetina disminuyó los niveles vasculares de O_2^- , lo que podría deberse a su capacidad para: 1) captar especies reactivas de oxígeno; 2) regular enzimas generadoras de radicales libres, o 3) regular enzimas antioxidantes como la SOD, que metaboliza radicales libres.

Numerosos estudios han mostrado efectos beneficiosos en la presión sanguínea y la función endotelial mediante el tratamiento con antioxidantes como la coenzima hidrosoluble Q10 (Duarte *et al.*, 2001b) o las vitaminas C y E (Maeda *et al.*, 2003). Los efectos como antioxidante y captador de O_2^- de quercetina y sus metabolitos glucurónicos están bien documentados (Galisteo *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2001; Rice-Evans y Packer, 1998). Pero a pesar de que estos mecanismos pueden contribuir a la mejora de las relajaciones dependientes de endotelio *in vivo*, no parece que puedan jugar un papel en el presente estudio *ex vivo* ya que los experimentos se llevaron a cabo 48 h después de la última administración de quercetina, cuando sus niveles en plasma y los de sus metabolitos decayeron por debajo del 25% de sus niveles máximos (Naderi *et al.*, 2003).

La NAD(P)H oxidasa es un complejo enzimático de múltiples subunidades responsable de la reducción monoelectrónica del oxígeno para producir O_2^- a

expensas de NAD(P)H (Ozgova *et al.*, 2003). De forma similar a la oxidasa de los neutrófilos, la NAD(P)H oxidasa vascular comprende un flavocitocromo b558 heterodimérico unido a membrana (formado por gp91^{phox} [nox 2] u homólogos de gp91^{phox} [nox 1 y nox 4], y p22^{phox}) y 3 subunidades citoplasmáticas, p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox} (Ozgova *et al.*, 2003) Este complejo enzimático es considerado la fuente más importante de O₂⁻ en la pared vascular (Manach *et al.*, 2005). Un exceso en la generación de O₂⁻ sintetizado por NAD(P)H oxidasa se relaciona de forma crucial con la disminución de NO asociado a disfunción endotelial en hipertensión clínica y experimental (Li y Sha, 2003; Cai y Harrison., 2000; Griendling *et al.*, 2000a; Babior, 1999; Rajagopalan *et al.*, 1996; Ohara *et al.*, 1993). Los resultados por nosotros obtenidos indican que la generación de O₂⁻ inducida por NAD(P)H oxidasa estaba aumentada en aorta de SHR y que este efecto era inhibido por quercetina. Estos resultados sugieren que la disminución de O₂⁻ derivado de NAD(P)H oxidasa y así la menor inactivación de NO podría ser un importante mecanismo que contribuyese a la prevención de la disfunción endotelial por quercetina.

Numerosos y recientes estudios han sugerido que la subunidad p47^{phox} de NAD(P)H oxidasa juega un papel esencial en el estrés oxidativo vascular y la presión sanguínea en respuesta a angiotensina II *in vivo* (Virdis *et al.*, 2004; Touyz 2001). De hecho, el inhibidor de NAD(P)H oxidasa, apocinina, que impide la unión de las subunidades p47^{phox} y p67^{phox} con el complejo de membrana de la NAD(P)H oxidasa (Meyer y Schmitt, 2000), redujo la presión sanguínea y la disfunción endotelial en ratones perfundidos con angiotensina II (Griendling *et al.*, 2000a) y la disfunción endotelial en SHR *in vitro* (datos del presente estudio). Los resultados de esta tesis muestran que en SHR hay mayores niveles de esta proteína componente de NAD(P)H oxidasa en ambas fracciones aórticas, tanto en citosólica, como en unida a membrana, particulada, que en las aortas de WKY. Este aumento en la expresión proteica de p47^{phox} concuerda con la mayor producción de O₂⁻ encontrada en aorta SHR estimulada con NADPH. El tratamiento con quercetina disminuyó los niveles de esta proteína en ambas

fracciones de aorta SHR, sin un efecto significativo en WKY, sugiriendo que quercetina redujo la producción de O_2^- inducida por NAD(P)H oxidasa disminuyendo la expresión de la subunidad p47^{phox} de NAD(P)H oxidasa vascular.

3. Regular enzimas antioxidantes, incluyendo SODs, que metabolizan radicales libres (datos no incluidos en esta tesis, pero recogidos en artículos publicados citados en la bibliografía).

Junto con estos datos vasculares, en SHR observamos un mayor índice de ventrículo izquierdo en relación con las WKY. Esta alteración del tamaño miocárdico se acompaña con una marcada hipertrofia de los cardiomiocitos y la gran infiltración de fibras de tejido conectivo en el músculo cardiaco. Estos cambios en la estructura y la composición del ventrículo izquierdo parecen estar relacionados con una mayor producción de ROS (Jiang Y *et al.*, 2007; Kai *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2005; Higashi M *et al.*, 2003). De hecho, se ha demostrado recientemente (Yamamoto *et al.*, 2006) que el tratamiento de SHR-SP durante 4 semanas con el inhibidor del sistema NADPH oxidasa apocinina redujo ligeramente la presión arterial; sin embargo suprimió la hipertrofia cardíaca y el exceso de depósitos de colágeno. Estos últimos efectos se acompañaron con una reducción de la actividad NADPH oxidasa ventricular y de la generación de O_2^- . De manera análoga, el tratamiento crónico de forma oral con quercetina redujo el remodelado cardíaco en SHR hasta mostrar una morfología cardíaca similar a la de las ratas normotensas WKY. Este efecto protector podría deberse, como se ha señalado, a su efecto antihipertensor conjuntamente con un posible efecto reductor del estrés oxidativo en el corazón relacionado con su capacidad de inhibir el sistema NADPH oxidasa.

La principal conclusión que se puede obtener de este estudio es que el tratamiento oral con el flavonoide quercetina resultó en un aumento de la actividad eNOS y una menor generación de O_2^- mediado por NAD(P)H oxidasa asociada a una reducida expresión de p47^{phox} (Figura 29). Estos hallazgos proporcionan nuevas evidencias para entender cómo quercetina mejora la función

endotelial vascular y disminuye la presión arterial sanguínea en la hipertensión y además refuerzan la idea de los efectos beneficiosos de este componente de la dieta en enfermedades cardiovasculares asociadas con disfunción endotelial, como sugieren estudios epidemiológicos.

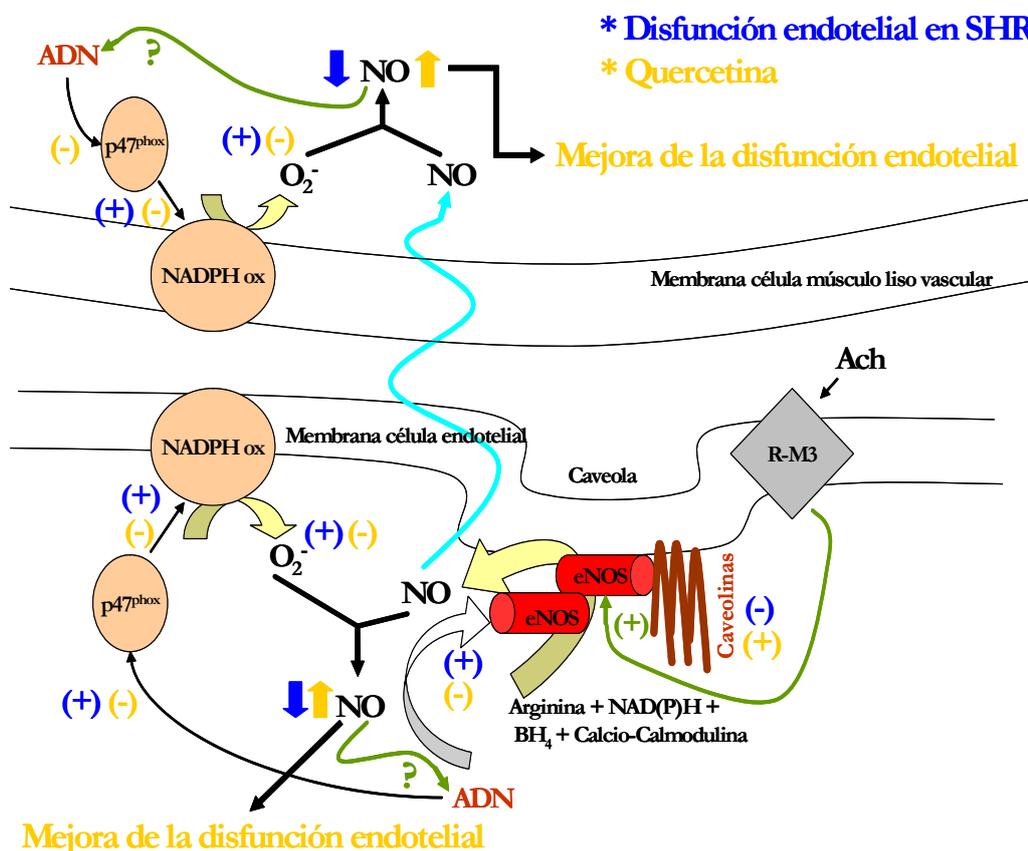


Figura 29. Esquema celular de disfunción endotelial en SHR. En SHR encontramos una mayor expresión de la subunidad p47^{phox} de NAD(P)H oxidasa, una mayor producción estimulada por parte de esta enzima de anión superóxido (O₂⁻) y, paradójicamente, una mayor expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) productora de óxido nítrico (NO), y una menor expresión de una de sus proteínas inhibitorias, caveolina-1, lo que conduce a una mayor interacción de O₂⁻ con NO, la consiguiente disminución en la biodisponibilidad de este vasodilatador y así a la disfunción endotelial (flechas en azul). Quercetina e isorhamnetina reducen la sobre expresión de p47^{phox}, disminuyen la producción de anión superóxido, aumentan la expresión de caveolina-1, normalizan la expresión de eNOS, con todo lo cual aumentan la biodisponibilidad de NO, mejorando la disfunción endotelial (flechas en naranja). Abreviaturas y símbolos: Ach: acetilcolina. R-M3: Receptor muscarínico de acetilcolina 3. R-AT1: Receptor de angiotensina II 1. (+): Activación. (-): Inhibición. ↑: Aumento. ↓: Disminución. ?: Mecanismo exacto desconocido.

9. Efecto de quercetina e isorhamnetina sobre la disfunción endotelial inducida por angiotensina II *in vitro*.

Se sabe que angiotensina II es un desencadenante de estrés oxidativo, y que el consiguiente O_2^- creado produce la inactivación de NO, lo que desempeña un importante papel en la génesis clínica de la disfunción endotelial y la hipertensión (Calo *et al.*, 2005; Cai y Harrison, 2000). La disfunción endotelial está presente en animales con hipertensión inducida mediante la perfusión de angiotensina II, así como en ratones que de forma crónica sobre expresan renina y angiotensinógeno (Chabrashvili *et al.*, 2003; Didion *et al.*, 2000; Rajagolapan *et al.*, 1996). El hecho de que angiotensina II pueda inducir también disfunción endotelial *in vitro* en arteria carótida de ratón (Didion *et al.*, 2005) y, como muestran nuestros resultados, en aorta de rata, indica que estos cambios son debidos a efectos directos de angiotensina II sobre la pared vascular, independientemente de hormonas circulantes, mecanismos neurogénicos o cambios en la presión arterial. En esta Tesis, esta alteración se suprimió mediante la coincubación con el antagonista de receptores de angiotensina II AT-1, losartán, demostrando que la disfunción endotelial está mediada por la activación de estos receptores AT-1. Como se indicó en el apartado 1, la administración crónica de forma oral de quercetina disminuye la presión arterial y la disfunción endotelial en numerosos modelos animales de hipertensión (García-Saura *et al.*, 2005; Galisteo *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2002, 2001a,b), sin embargo, no está claro si los efectos sobre la función endotelial en estos modelos se debieron a un efecto directo sobre la pared vascular, a la reducción de la presión arterial, o a mecanismos neurohumorales de quercetina y sus metabolitos. Los resultados de esta tesis muestran que tanto quercetina como isorhamnetina fueron efectivos *in vitro*, disminuyendo la disfunción endotelial en anillos aórticos. Además, cabe señalar que la concentración efectiva de quercetina fue menor de 1 μ M, lo que está en el rango

de concentración alcanzada en plasma tras una comida con el contenido estándar de flavonoides (Manach *et al.*, 2005), lo que indica que este efecto parece ser fisiológicamente relevante.

Ya se señaló que la excesiva generación de O_2^- está íntimamente relacionada con la disminución de NO asociada a la disfunción endotelial en anillos aórticos de ratas perfundidas con angiotensina II (Chabrashvili *et al.*, 2003; Rajagolapan *et al.*, 1996). En los experimentos llevados a cabo, la presencia de SOD en el baño de órganos restauró la relajación inducida por acetilcolina en anillos aórticos expuestos a angiotensina II. De forma análoga, la sobre expresión de SOD previno, mientras que la disminución de SOD potenció, la disfunción endotelial inducida por angiotensina II (Didion *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos también muestran que angiotensina II aumentó la producción intracelular de O_2^- , determinado mediante la fluorescencia roja del etidio, principalmente en las células de músculo liso de la capa media vascular, y que quercetina e isorhamnetina redujeron este aumento en la producción de O_2^- en dichas células. También hay que hacer notar que la vasodilatación independiente de endotelio inducida por el activador de la guanilato ciclasa soluble, nitroprusiato sódico, fue similar en anillos control y tratados con angiotensina II, y no se vio afectada por los flavonoides, lo que indicaría que la disfunción endotelial se debe a cambios en la biodisponibilidad del NO derivado del endotelio, más que a posteriores efectos en el músculo liso vascular, al igual que se vio en las pruebas tras el tratamiento oral con quercetina.

El efecto máximo de angiotensina II se observó a las 6-8 horas de incubación, y hay que tener en cuenta que angiotensina II no estaba presente durante las pruebas con acetilcolina. De igual forma, quercetina e isorhamnetina estuvieron presentes durante la incubación con angiotensina II, pero no durante las pruebas de función endotelial. Estos lentos y persistentes cambios inducidos por angiotensina II concuerdan con cambios relacionados con la expresión génica de determinadas enzimas, como NAD(P)H oxidasa. Apocinina, el inhibidor de NAD(P)H oxidasa, además de reducir la disfunción endotelial en ratones

perfundidos con angiotensina II (Griendling *et al.*, 2000a) como se ya se dijo en el anterior apartado, también lo hizo como se muestra en esta tesis, en SHR y anillos aórticos expuestos a angiotensina II *in vitro*. Estos resultados sugieren firmemente que el O_2^- generado por NAD(P)H oxidasa está también relacionado con la alteración de la función endotelial inducida por la incubación *in vitro* con angiotensina II. Además de en experimentos *in vivo* (Li *et al.*, 2004; Landmesser *et al.*, 2003), los cambios inducidos por angiotensina II en la expresión y fosforilación de p47^{phox} han sido ampliamente analizados en cultivos de células de músculo liso (Lyle y Griendling, 2006). En esta tesis se muestra que, en aortas incubadas durante 6 horas con angiotensina II se encontraron mayores niveles de esta proteína componente de NAD(P)H oxidasa, medidos mediante western blot, que en aortas control. El análisis inmunohistoquímico reveló que esta sobre expresión de p47^{phox} se daba principalmente en la capa media del vaso. Este aumento en la expresión proteica de p47^{phox} concuerda con el aumento en la producción de O_2^- encontrado en aortas estimuladas con angiotensina II. La coincubación con quercetina o isorhamnetina disminuyó los niveles de esta proteína en ambas fracciones aórticas tratadas con angiotensina II, así como su detección inmunohistoquímica, sin un efecto significativo en los anillos control, lo que parece sugerir que tanto quercetina como su metabolito metilado isorhamnetina redujeron la producción de anión superóxido disminuyendo la expresión de la subunidad p47^{phox} de la NAD(P)H oxidasa vascular estimulada por angiotensina II, lo que concuerda con los resultados que se obtuvieron en el tratamiento de SHR mediante la administración crónica de quercetina de forma oral. En conjunto estos resultados apuntan a que una menor cantidad de O_2^- derivado de NAD(P)H oxidasa, y consiguientemente una menor inactivación de NO y su mayor biodisponibilidad, podría ser un mecanismo importante que contribuyese a la prevención de la disfunción endotelial por quercetina, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Recientemente se ha sugerido que quercetina muestra efectos como agonista de receptores PPAR γ (Liang *et al.*, 2001). Como los ligandos agonistas de receptores PPAR γ reducen la generación de O_2^- estimulado por angiotensina II en

células endoteliales de arteria coronaria humana (Mehta *et al.*, 2003) y fibroblastos cardiacos (Chen y Mehta, 2006), se pensó que quercetina e isorhamnetina podrían prevenir la disfunción endotelial a través de la activación de estos receptores. Sin embargo, el antagonista de receptores PPAR γ GW9662 no modificó los efectos inducidos por quercetina e isorhamnetina, lo que parece indicar que estos efectos protectores no están relacionados con la activación de receptores PPAR γ . Dos mecanismos potenciales pueden estar involucrados en los efectos de quercetina. Primero, las especies reactivas de oxígeno pueden activar su propia producción incrementando la expresión de las subunidades del sistema NAD(P)H oxidasa (Cai, 2005). Por tanto, quercetina e isorhamnetina, mediante su efecto captador de especies reactivas de oxígeno, podrían inhibir este mecanismo de retroalimentación positivo. Adicionalmente, varias proteínas quinasas (por ejemplo, proteína quinasa C, proteína quinasa activada por mitógeno, y Src) han sido implicadas en la activación del sistema NAD(P)H oxidasa inducida por Ang II (Lassegue y Clempus, 2003). Como quercetina y otros flavonoides relacionados son conocidos inhibidores de proteínas quinasas (Middleton *et al.*, 2000), es posible que este efecto pueda estar involucrado en la prevención de la disfunción endotelial inducida por AngII.

En conjunto estos resultados indican que tanto quercetina como isorhamnetina previenen la disfunción endotelial inducida mediante Ang II al inhibir la sobre expresión de p47^{phox} y el subsiguiente aumento en la producción de O₂⁻, lo que finalmente se traduce en un aumento de la biodisponibilidad de óxido nítrico (Figura 30).

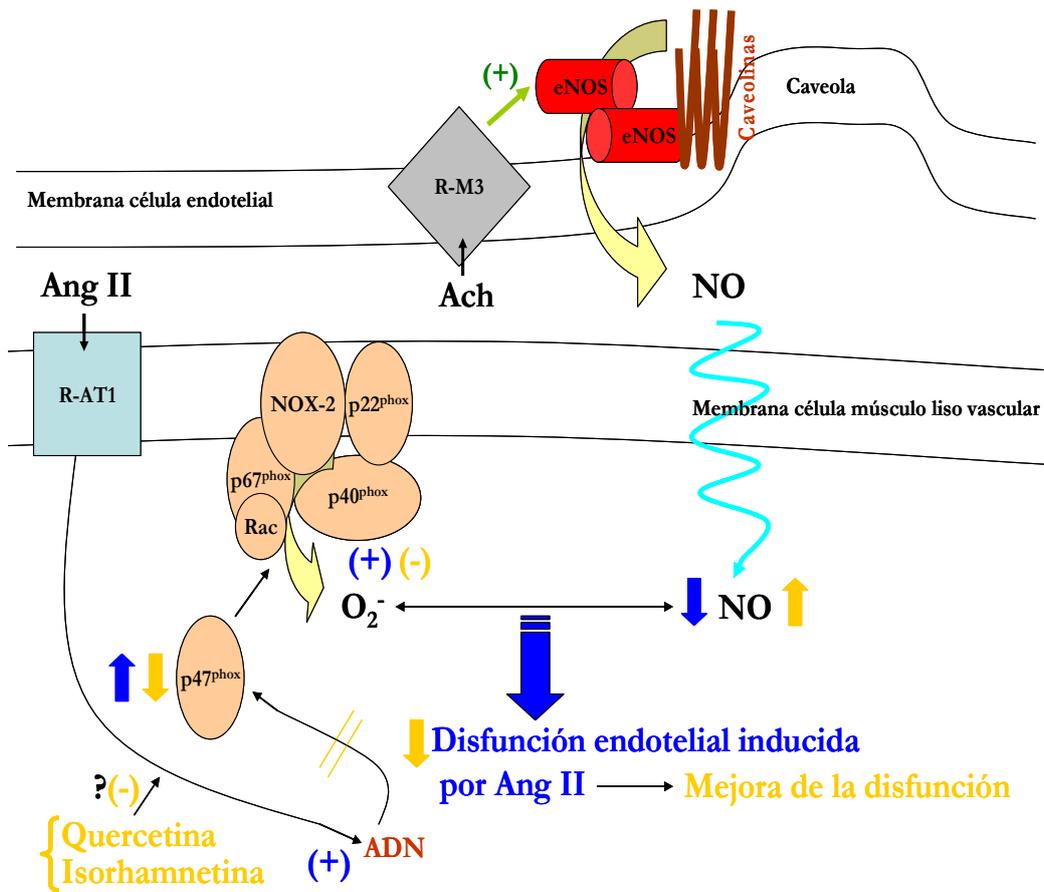


Figura 30. Esquema celular de disfunción endotelial inducida por angiotensina II (Ang II) y efecto sobre ella de los flavonoides quercetina e isorhamnetina. Encontramos una mayor expresión de la subunidad p47^{phox} de NAD(P)H oxidasa en las células del músculo liso vascular (capa media), junto con una mayor producción de anión superóxido (O₂⁻), por lo que se produce mayor interacción con el óxido nítrico (NO) sintetizado por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) de las células endoteliales, disminuyendo la biodisponibilidad de NO y produciéndose la disfunción endotelial (flechas en azul). Quercetina e isorhamnetina reducen la sobre expresión de p47^{phox}, disminuyen la producción de anión superóxido y así aumentan la biodisponibilidad de NO, mejorando la disfunción endotelial (flechas en naranja). Abreviaturas y símbolos: Ach: acetilcolina. R-M3: Receptor muscarínico de acetilcolina 3. R-AT1: Receptor de angiotensina II. En azul, efectos debidos a disfunción endotelial. En amarillo, efectos debidos a los flavonoides. (+): Activación. (-): Inhibición. ↑: Aumento. ↓: Disminución. ?: Mecanismo exacto desconocido.

Conclusiones.

Conclusiones.

1. El tratamiento crónico con el flavonol quercetina a la dosis de 10 mg/Kg por vía oral en SHR prehipertensas, previene el desarrollo de hipertensión, disfunción endotelial e hipertrofia cardíaca. La mejora de la función endotelial se debe a que produce un aumento de la actividad eNOS y una menor expresión de la subunidad citosólica del sistema NAD(P)H oxidasa p47^{phox}, lo que conduce a una menor generación de O₂⁻ y un aumento de la biodisponibilidad de NO.

2. Tanto quercetina como su principal metabolito, isorhamnetina, previenen la disfunción endotelial *in vitro*, en aortas de WKY, inducida por Ang II, al inhibir la sobre expresión de p47^{phox} en la túnica media del vaso, con el consiguiente descenso en la producción de O₂⁻ por la NAD(P)(H) oxidasa.

3. Estos resultados concuerdan con los datos epidemiológicos que muestran una correlación inversa entre la ingesta de flavonoides en la dieta y el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, demostrando el papel protector de quercetina así como de isorhamnetina. Y que los efectos inhibidores de estos flavonoles sobre la NAD(P)H oxidasa vascular, principal generadora de estrés oxidativo en la vasculatura, son cruciales para sus beneficiosos efectos cardiovasculares.

Bibliografia.

Bibliografia.

Aalkjaer C, Heagerty AM, Petersen KK, Swales JD, Mulvany MJ. Evidence for increased media thickness, increased neuronal amine uptake, and depressed excitation-contraction coupling in isolated resistance vessels from essential hypertensives. *Circ Res* 1987;61(2):181-186.

Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1455-1459.

Ago T, Kitazono T, Kuroda J, Kumai Y, Kamouchi M, Ooboshi H, Wakisaka M, Kawahara T, Rokutan K, Ibayashi S, Iida M. NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells. *Stroke* 2005; 36:1040-1046.

Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H, Iida M. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 2004;109:227-233.

Ahluwalia A, Hobbs AJ. Endothelium-derived

natriuretic peptide: more than just a hyperpolarizing factor. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26:162-167.

Ajay M, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Direct effects of quercetin on impaired reactivity of spontaneously hypertensive rat aortae: comparative study with ascorbic acid. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006 Apr;33(4):345-350.

Ajay M and Mustafa MR. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005; 46(1):36-40

Andriambeloson E, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:248-254.

Andriambeloson E, Magnier C, Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr* 1998; 128:2324-2333.

Angus JA, Cocks TM. Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol Ther.* 1989;41:303-352.

Aoi W, Niisato N, Miyazaki H, Marunaka Y. Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315:892-896.

Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH, Karanja N. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *N Engl J Med* 1997;33: 1117-1124.

Aura AM, O'Leary KA, Williamson G, et al. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *J Agric Food Chem* 2002;50: 1725-1730.

Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension* 1990; 15:699-703.

Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1989;13(6 Pt 2):859-864.

Awe SO, Tsakadze NL, D'Souza SE, Adeagbo AS. Tert-butyl hydroperoxide-mediated vascular responses in DOCA-salt

hypertensive rats. *Vascul Pharmacol* 2003;40:51-57.

Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res.* 1996;78:750-758.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93:1464-1476.

Babior BM, The respiratory burst oxidase. *Curr Opin Hematol* 2 1995; 55-60.

Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, Matthaei S, Rett K, Haring HU. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance *Circulation.* 2000;101:1780-1784.

Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demarex N, Krause KH. A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 2001;276:37594-37601.

Barnes P, Liu S. Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol Rev.* 1995;47:87-131.

Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I, Busse R. Nitric

oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation*. 1996;94:3341-7.

Baumbach GL, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* 1989;13(6 Pt 2):968-972.

Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA, Keaney JF Jr, Creager MA. Oral antioxidant therapy improves endothelial function in type 1 but not type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H2392-H2398.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007;87(1):245-313.

Bengtson SHM, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:849-854.

Bennett-Richards K, Kattenhorn M, Donald A, Oakley G, Varghese Z, Rees L, Deanfield JE. Does oral folic acid lower total homocysteine levels and improve endothelial function in children with chronic renal failure? *Circulation*. 2002;105:1810-1815.

Berry CE and Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular

disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 2004;555:589-606.

Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, Magill FG, Berg GA, McMurray JJV, Dominiczak AF. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation* 2000;101: 2206-2212.

Best LC, Martin TJ, Russel RG, Preston FE. Prostacyclin increases cyclic AMP activity in platelets. *Nature*. 1977;267:850-852.

Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchel A, Grinpukel S. Growth factor activity of endothelin in vascular smooth muscle. *Am J Physiol*. 1990; 258:C408-C415.

Boger RH, Lentz SR, Bode-Boger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci*. 2001;100:161-167.

Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA). A novel risk factor for endothelial dysfunction: Its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998;98:1842-1847.

Bogle RG, Macallister RJ, Whitley GSJ, Vallance P. Induction of NG-monomethyl-L-arginine uptake: a mechanism for differential inhibition of NO synthases? *Am J Physiol Cell Physiol.* 1995;269:C750-C756.

Bolton CH, Downs LG, Victory JG, Dwight JF, Tomson CR, Mackness MI, Pinkney JH. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: Roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16:1189-1197.

Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T. Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J Physiol.* 1984; 351:549-572.

Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium derived nitric oxide. *J Clin Invest.* 1990;85:587-590.

Bregestovski P, Bakhramov A, Danilov S, Moldobaeva A, Takeda K. Histamine-induced inward currents in cultured endothelial cells from human umbilical vein. *Br J Pharmacol.* 1988;95:429-436.

Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and

reduces inflammation. *Nat Med.* 2000;6:1362-1367.

Buchan KW, Martín W. Bradykinin induces elevations of cytosolic calcium through mobilization of intracellular and extracellular pools in bovine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1991;102:35-40.

Bund SJ, West KP, Heagerty AM. Effects of protection from pressure on resistance artery morphology and reactivity in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Circ Res* 1991;68(5):1230-1240.

Busse R, Mulsch A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett* 1990 Jun 4;265(1-2):133-136.

Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension.* 2000;35:746-751.

Cai H. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res* 2005 Apr 29;96(8):818-822.

Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidase as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2003 Sep;24(9):471-478.

- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-844.
- Calo LA, Davis PA, Pagnin E, Semplicini A, Pessina AC. NADPH oxidase, superoxide overproduction and nitric oxide bioavailability in essential hypertension. *J Hypertens* 2005; 23:665-666.
- Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 1996;78:415-423.
- Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO 3rd, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension.* 1997;30:57-63.
- Carlstrom J, Symons JD, Bruno RS, Litwin SE, Jalili T. A quercetin supplemented diet does not prevent cardiovascular complications in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr.* 2007. Mar; 137(3): 628-633.
- Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS. Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285: R117-R124.
- Chamseddine AH, Miller JFJ. gp91phox Contributes to NADPH oxidase activity in aortic fibroblasts, but not smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H2284–H2289.
- Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR. Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 2000;130:1963-1970
- Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res* 1993;13: 2165–2170.
- Chatziantoniou C, Daniels FH, Arendshorts WJ. Exaggerated renal vascular reactivity to angiotensin and thromboxane in young genetically hypertensive rats. *Am J Physiol* 1990;259(2 Pt 2):F372-F382.
- Chen J, Mehta JL. Angiotensin II-mediated oxidative stress and procollagen-1 expression in cardiac fibroblasts: blockade by pravastatin and pioglitazone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 Oct;291(4):H1738-H1745.
- Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* 2001;38(3 Pt 2):606-611.

Chen ZP, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest.* 1999a;103:401-406.

Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 1999b;443:285-289.

Chen Y, Sin Y, Lin J, Zhou A, Wang H. Research on the mechanism of endothelin inflammatory effects on human mesangial cells. *Chin Med J* 1997. Jul;110(7):530-534.

Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol.* 1988;95:1165-1174.

Cherry P, Furchgott RF, Zawadzki JV. The endothelium dependent relaxation of vascular smooth muscle by unsaturated fatty acids. *Fed Proc.* 1982;42:619.

Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 1998;31:643-648.

Cocks TM, Angus JA. Endothelium-dependent relaxation of coronary

arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature.* 1983;305:627-630.

Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Frazziano G, Cobeno L, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Serotonin inhibits voltage-gated K⁺ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT_{2A} receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization. *Circ Res* 2006;98: 931-938.

Cohen R, Weisbrod R, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina V. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of stores-operated Ca²⁺ influx. *Circ Res.* 1999;84:210-219.

Coldham NG, Sauer MJ. Pharmacokinetics of [(14)C] Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 164:206-215.

Conquer JA, Maiani G, Azzini E, Raguzzini A, Holub BJ. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *J Nutr* 1998;128:593-597.

Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood

vessel growth. *Cardiovasc Res.* 2001;49:507-521.

Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Viseu Dos Santos AC, Wood EG, Carrier MJ. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* 2001;414:863–864.

Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Luscher TF. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest* 1998;101(7):1530-1537.

Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension* 1994;23(2):229-235.

Cowan CL, Cohen RA. Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and independent responses. *Am J Physiol.* 1991;261:H830-H835.

Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, Remesy C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J Agric Food Chem* 2002;50:618-621.

Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, Remesy C. Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin

and their glucosides in rats. *J Nutr* 2001;131:2109-2114.

Cross AR, Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1657:1–22.

Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS, Black C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 590–595.

Curin Y, Ratajczak P, Dupont A, Ritz M-F, Mendelowitsch A, Pinet F, Andriantsitohaina R. Identification par analyse protéomique des déterminants moléculaires de la neuroprotection induite par les polyphénols dans l'ischémie cérébrale. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005;98:392.

Curin Y, Ritz M-F, Cam E, Andriantsitohaina R, Mendelowitsch A. Chronic treatment with red wine polyphenolic compounds protects against vascular and neuronal excitotoxicity in response to focal cerebral ischemia in male rats. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2004;97:417.

Dajas F, Rivera F, Blasina F, Arredondo F, Echeverry C, Lafon L, Morquio A, Heizen H. Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotox Res* 2003;5:425–432.

Danaoglu Z, Kultursay H, Kayikcioglu M, Can L, Payzin S. Effect of statin therapy added to ACE-inhibitors on blood pressure control and endothelial functions in normolipidemic hypertensive patients. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2003;3:331-337.

Dangles O, Dufour C, Bret S. Flavonol-serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin. *J Chem Soc [Perkin 1]* 1999;2:737-744.

Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:III27-III32.

Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MR, Williamson G. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res* 2001;35:941-952.

Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang BY, Tsao S, Kimoto M, Vallance P, Patterson AJ, Cooke JP. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation.* 2003;108:3042-3047.

de Andrade RL, Meirelles LM, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effect of enalapril in spontaneously

hypertensive rats cardiac remodeling with nitric oxide synthesis blockade. *J Cell Mol Med* 2002;6:599-608.

de Rijke YB, Demacker PN, Assen NA, Sloots L M, Katan MB, Stalenhoef AF. Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoproteins in volunteers. *Am J Clin Nutr* 1996;63:329-334.

Delbosc S, Cristol JP, Descomps B, Mimran A, Jover B. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension.* 2002;40:142-147.

Deng LY, Schiffrin EL. Effects of endothelin-1 and vasopressin on resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1992;5(11):817-822.

Didion SP, Kinzenbaw DA, Faraci FM. Critical role for CuZn-superoxide dismutase in preventing angiotensin II-induced endothelial dysfunction. *Hypertension* 2005;46:1147-1153.

Didion SP and Faraci FM. Angiotensin II produces superoxide-mediated impairment of endothelial function in cerebral arterioles. *Stroke* 2003;34:2038-2042.

Didion SP, Sigmund CD, Faraci FM. Impaired endothelial function in transgenic mice expressing both

- human renin and human angiotensinogen. *Stroke* 2000;31:760-764.
- Dolor RJ, Hurwitz LM, Mirza Z, Strauss HC, Whorton AR. Regulation of extracellular calcium entry in endothelial cells. Role of the intracellular calcium pool. *Am J Physiol.* 1992;262:C161-C181.
- Doni MG, Whittle BJR, Palmer RMJ, Moncada S. Actions of nitric oxide on the release of prostacyclin from bovine endothelial cells in culture. *Eur J Pharmacol.* 1988;151:19-25.
- Doyle AE, Black H. Reactivity to pressor agents in hypertension. *Circulation* 1955;12(6):974-980.
- Duarte J, Andriambelison E, Diebolt M, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilatation. *Physiol Res* 2004;53:595-602.
- Duarte J, Jimenez R, O'Valle F, Galisteo M, Perez-Palencia R, Vargas F, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J Hypertens* 2002;20: 1843-1854.
- Duarte J, Galisteo M, Ocete MA, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 2001a; 221:155-160.
- Duarte J, Perez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2001b;133:117-124.
- Duarte J, Jimenez R, Villar IC, Perez-Vizcaino F, Jimenez J, Tamargo J. Vasorelaxant effects of the bioflavonoid chrysin in isolated rat aorta. *Planta Med* 2001c;67:567-569.
- Duarte J, Perez-Vizcaino F, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol* 1993a;24: 857-862.
- Duarte J, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Jimenez J, Tamargo J. Vasodilator effects of quercetin on isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1993b;239:1-7.
- Edwards G, Dora K, Gardener M, Weston A. K⁺ is a_{2n} endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature.* 1998;396:269-271.
- Emori T, Hirata Y, Ohta K, Kano K, Eguchi S. Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension.* 1991;18:165-170.

Endemann D, Pu Q, de Ciuceis C, Savoia C, Virdis A, Neves MF, Touyz RM, Schiffrin EL. Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on antihypertensive treatment. *Hypertension*. 2004a;43:399-404.

Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J am soc nephrol* 2004b; 15:1983-1992.

Engler MM, Engler MB, Malloy MJ, Chiu EY, Schloetter MC, Paul SM, Stuehlinger M, Lin KY, Cooke JP, Morrow JD, Ridker PM, Rifai N, Miller E, Witztum JL, Mietus-Snyder M. Antioxidant vitamins c and e improve endothelial function in children with hyperlipidemia: endothelial assessment of risk from lipids in youth (early) trial. *Circulation*. 2003;108:1059-1063.

Ercan E, Tengiz I, Ercan HE, Nalbantgil I. Left ventricular hypertrophy and endothelial functions in patients with essential hypertension. *Coron artery dis*. 2003;14:541-544.

Erlund I, Silaste ML, Alfthan G, Rantala M, Kesaniemi YA, Aro A. Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *Eur j clin nutr* 2002;56:891-898.

Favotl, martin s, keravis t, andriantsitohaina r, lugnier c. Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis. *Cardiovasc res* 2003;59:479-487.

Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarisation of canine coronary smooth muscle. *Br j pharmacol*. 1988;93:515-524.

Fenoy FJ, Milicic I, Smith RD, Wong PC, Timmermans PB, Roman R. Effects of dup 753 on renal function of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am j hypertens* 1991 apr;4(4 pt 2):321s-326s.

Ferrandiz ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents actions* 1991; 32: 283-288.

Fleming I, Bauersachs J, Schafer A, Scholz D, Aldershvile J, Busse R. Isometric contraction induces the ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proc natl acad sci u s a*. 1999;96:1123-1128.

Fliser D, Kielstein JT, Haller H, Bode-Boger SM. Asymmetric dimethylarginine: a cardiovascular risk factor in renal disease? *Kidney Int Suppl*. 2003;84:S37-S40.

Folkow B. The fourth Volhard lecture: cardiovascular structural adaptation; its role in the initiation and maintenance of primary hypertension. *Clin Sci Mol Med Suppl* 1978;4:3s-22s.

Folkow B, Johansson B, Oberg B. The stimulation threshold of different sympathetic fibre groups as correlated to their functional differentiation. *Acta Physiol Scand* 1958;44(2):146-156.

Forstermann U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem* 2006 Dec; 387(12): 1521-1533.

Forstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 1995;352:351-364.

Fortuno A, Tisaire J, Lopez R, Bueno J, Diez J. Angiotensin converting enzyme inhibition corrects Na^+/H^+ exchanger overactivity in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1997;10(1):84-93.

Fu M, Zhang J, Zhu X, Myles DE, Willson TM, Liu X, Chen YE. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering

with Smad3. *J Biol Chem* 2001;276: 45888-45894.

Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 1995;61:549-554.

Fujimoto T. Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol.* 1993;120:1147-1157.

Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q 4th, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK.T. Fukui et al., p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res* 1997;80:45-51.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999;399:597-601.

Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor and contracting factor. *FASEB J.* 1989;3:2007-2018.

Furchgott RF. The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries to acetylcholine and some

other nitrovasodilators. *Trends Pharmacol Sci.* 1981;2:173-176.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-376.

Galisteo M, García-Saura MF, Jimenez R, Villar IC, Zarzuelo A, et al. Effects of chronic quercetin treatment on antioxidant defence system and oxidative status of deoxycorticosterone acetate-salt-hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 2004; 259:91-99.

Galis ZS and Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251–262.

Galisteo M, Garcia-Saura MF, Jimenez R, Villar IC, Wangenstein R, Zarzuelo A, Vargas F, Duarte J. Effects of quercetin treatment on vascular function in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Comparative study with verapamil. *Planta Med* 2004;70:334-341.

Gallagher G, Sumpio BE. Vascular endothelial cells. In: Sumpio BE, Sidawy AS, eds. *Basic Science of Vascular Disease*. Mt. Kisco: Futura Publishing Co., 1997;151-186.

Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004; 93:105-113

Galley HF, Blaylock MG, Dubbels AM, Webster NR. Variability in E-selectin expression, mRNA levels and sE-selectin release between endothelial cell lines and primary endothelial cells. *Cell Biol Int.* 2000;24:91-99.

Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem.* 1997;272:25437-25440.

Garcia-Saura MF, Galisteo M, Villar IC, Bermejo A, Zarzuelo A, Vargas F, Duarte J. Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. *Mol Cell Biochem* 2005;270:147-155.

Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T, Davenport AP, Edvinsson L. Effects of an ET1-receptor antagonist, FR139317, on regional haemodynamic responses to endothelin-1 and [Ala11,15] Ac-endothelin-1 (6-21) in conscious rats. *Br J Pharmacol.* 1994;112:477-486.

Garland CJ, McPherson GA. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarisation and relaxation to acetylcholine in the rat small mesentery artery. *Br J Pharmacol.* 1992;105:429-435.

Ge T, Vanhoutte PM, Boulanger CM. Increased response to

prostaglandin H2 precedes changes in PGFsynthase 1 expression in the SHR aorta. *Acta Pharmacol Sinica.* 1999;20:1087-1092.

Ge T, Hughes H, Junquero DC, Wu KK, Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H2 in the SHR aorta. *Circ Res.* 1995;76:1003-1010.

Gebremedhin D, Ma YH, Falck JR, Roman RJ, Van Rollins M, Harder DR. Mechanism of action of cerebral epoxyicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 1992;263:H519-H525.

Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75; 880-886.

Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, Vita JA. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:1769-1775.

Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative

cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation.* 2002;105:1567-1772.

Golfman LS, Hata T, Beamish RE, Dhalla NS. Role of endothelin in heart function in health and disease. *Can J Cardiol.* 1993;9:635-653.

Gong KW, Zhu GY, Wang LH, Tang CS. Effect of active oxygen species on intimal proliferation in rat aorta after arterial injury. *J Vasc Res* 1996;33(1):42-46.

Gonzalez-Pacheco FR, Caramelo C, Castilla MA, Deudero JJ, Arias J, Yague S, Jimenez S, Bragado R, Alvarez-Arroyo MV. Mechanism of vascular smooth muscle cells activation by hydrogen peroxide: role of phospholipase C gamma. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:392-398.

Gorman RR, Bunting S, Miller OV. Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin. *Prostaglandins.* 1977;13:377-388.

Graefe EU, Wittig J, Mueller S, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol* 2001;41:492-499.

Grassi D, Necocione S, Lippi C, Croce G, Valeri L, Pasqualetti P, Desideri G, Blumberg JB, Ferri C. Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation

in hypertensives. *Hypertension* 2005;46:398-405.

Green DJ, Walsh JH, Maiorana A, Best MJ, Taylor RR, O'Driscoll JG. Exercise-induced improvement in endothelial dysfunction is not mediated by changes in CV risk factors: Pooled analysis of diverse patient populations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H2679-H2787.

Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* 2004;90:491-493.

Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003;108:1912-1916.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000a;86:494-501.

Griendling KK, Sorescu D, Lassege B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000b; 20:2175-83.

Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 1995;57:707-736.

Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, Schieffer B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res*. 2003;92:e80- e86.

Grover AK, Samson SE, Robinson S, Kwan CY. Effects of peroxynitrite on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in pig coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284:C294-C301.

Grunfeld M, Deis A, Sorensen TI, Becker U, Schnohr P, Jensen G. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer or spirits. *BMJ* 1995;310(6988):1165-169.

Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1987;36:317-322.

Guo W, Adachi T, Matsui R, Xu S, Jiang B, Zou MH, Kirber M, Lieberthal W, Cohen RA. Quantitative assessment of tyrosine nitration of manganese superoxide dismutase in angiotensin II-infused rat kidney. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H1396-H1403.

Hajjar DP, Weksler BB, Falcone DJ, Heffron JM, Tack-Goldman K, Minick CR. Prostacyclin modulates cholesteryl ester hydrolytic activity

by its effects on cAMP in rabbit aorta. *J Clin Invest.* 1982;70:479-485.

Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation.* 2002;106:653-658.

Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001; 37:529-534.

Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2744-2752.

Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual process of remodeling and growth. *Hypertension* 1993;21(4):391-397.

Heinonen M. Anthocyanins as dietary antioxidants. In: Voutilainen S, Salonen JT, eds. Third international conference on natural antioxidants and anticarcinogens in

food, health, and disease (NAHD), June 6-9, 2001, Helsinki, Finland. Helsinki: Kuopion Yliopisto, 2001:25.

Hermida RC, Ayala DE, Calvo C, Lopez JE, Fernandez JR, Mojon A, Dominguez MJ, Covelo M. Administration time-dependent effects of aspirin on blood pressure in untreated hypertensive patients. *Hypertension.* 2003;41:1259-1267.

Hertog MGL, Hollman PCH, Putte van de B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea, infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem.* 1996; 41:1242-1246.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993a;342:1007-1011.

Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 1993b;20:21-29.

Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, Hiroki J, Mukai Y, Morikawa K, Ichiki T, Takahashi S, Takeshita A. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial

NAD(P)H oxidase system. *Circ Res* 2003;93:767-775.

Hirata Y, Yoshimi H, Takata S, Watanabe TX, Kumagai S, Nakajima K, Sakakibara S. Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;154:868-875.

Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N, Taniguchi N, Murata Y. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001;276:3459-3467.

Hollman PCH, Devries JHM, Vanleeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1276-1282.

Hong SJ, Kim SI, Kwon SM, Lee JR, Chung BC Comparative study of concentration of isoflavones and lignans in plasma and prostatic tissues of normal control and benign prostatic hyperplasia. *Yonsei Med J* 2002;43:236-241.

Hu S, Kim HS. Activation of K⁺ channel in vascular smooth muscles by cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Eur J Pharmacol.* 1993;230:215-221.

Huang AH, Busse R, Bassenge E. Endothelium-dependent hyperpolarization of smooth muscle cells in rabbit femoral arteries is not mediated by EDRF (nitric oxide). *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 1988;338:438-442.

Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep* 2003; 5:473-480.

Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Huang JH, Huang CJ, Kandaswami C, Middleton E, Jr, Lee MT. Effects of luteolin and quercetin: Inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells over-expressing epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol* 1999;128:999-1010.

Huxley RR and Neil HA. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr* 2003;57: 904-908.

Hwa JJ, Ghibaudi L, Williams P, Chatterjee M. Comparison of acetylcholine-dependent relaxation in large and small arteries of rat mesenteric vascular bed. *Am J Physiol.* 1994;266:H952-H958.

Hyndman ME, Verma S, Rosenfeld RJ, Anderson TJ, Parsons HG. Interaction of 5-methyltetrahydrofolate and

tetrahydrobiopterin on endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H2167-H2172.

Ibarra M, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, Duarte J, Zaragoza-Arnaez F, Lopez-Lopez JG, Tamargo J. Cardiovascular effects of isorhamnetin and quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rat atria. *Planta Med* 2002;68:307–310.

Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Lett* 2001;171:11–16.

Imai T, Hirata Y, Emori T, Marumo F. Heparin has an inhibitory effect on endothelin-1 synthesis and release by endothelial cells. *Hipertensión.* 1993;21:353-358.

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyachi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:2863-2867.

Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 2000; 87:179–183.

Izzard AS, Cragoe EJ Jr, Heagerty AM. Intracellular pH in human resistance arteries in essential hypertension. *Hypertension* 1991;17(6 Pt 1):780-786.

Jaffe EA, Grulich J, Weksler BB, Hampel G, Watanabe K. Correlation between thrombin-induced prostacyclin production and inositol triphosphate and cytosolic free calcium levels in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1987;262:8557-8565.

Ji J, Benishin C, Pang P. Nitric oxide selectively inhibits intracellular Ca²⁺ release elicited by inositol trisphosphate but not caffeine in rat vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285:16-21.

Jiang Y, Reynolds C, Xiao C, Feng W, Zhou Z, Rodriguez W, Tyagi SC, Eaton JW, Saari JT, Kang YJ. Dietary copper supplementation reverses hypertrophic cardiomyopathy induced by chronic pressure overload in mice. *J Exp Med* 2007 Mar 19;204(3):657-666.

Johansson JS, Hayness DH. Cyclic GMP increases the rate of the calcium extrusion pump in intact platelets but has no direct effect on the dense tubular calcium accumulation system. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1105:40-50.

Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1

inhibits synthase activity. *J Biol Chem.* 1997;272:18522-18525.

Justesen U, Knuthsen P, Leth T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1998; 799:101–110.

Kai H, Mori T, Tokuda K, Takayama N, Tahara N, Takemiya K, Kudo H, Sugi Y, Fukui D, Yasukawa H, Kuwahara F, Imaizumi T. Pressure overload-induced transient oxidative stress mediates perivascular inflammation and cardiac fibrosis through angiotensin II. *Hypertens Res* 2006 Sep;29(9):711-718.

Kannel WB. Risk stratification in hypertension: New insights from the Framingham Study. *Am J Hypertens* 2000;13:3S–10S.

Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Hiyamoto S, Nakazawa H, Won K, Sato K. Calcium movements, distribution and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev.* 1997;49:157-230.

Kawano H, Motoyama T, Hirai N, Kugiyama K, Yasue H, Ogawa H. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is improved by L-arginine administration: Possible role of oxidative stress. *Atherosclerosis.* 2002;161:375-380.

Khan NQ, Lees DM, Douthwaite JA, Carrier MJ, Corder R. Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. *Clin Sci (Lond).* 2002;103 Suppl:72S-75S.

Khan S, Higdon N, Meisner K. Coronary vasorelaxation by nitroglycerin: involvement of plasmalemmal calcium-activated K⁺ channels and intracellular Ca²⁺ stores. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284:838-846.

Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Boger SM, Tsikas D, Frolich JC, Hoepfer MM, Haller H, Fliser D. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation.* 2004;109:172-177.

Kielstein JT, Bode-Boger SM, Frolich JC, Ritz E, Haller H, Fliser D. Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation.* 2003;107:1891-1895.

Kim S and Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 2000;52: 11-34.

Kim SB, Lee MJ, Hong JI, et al. Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea

- polyphenols. *Nutr Cancer* 2000;37:41-48.
- Kinlay S, Behrendt D, Fang JC, Delagrangé D, Morrow J, Witztum JL, Rifai N, Selwyn AP, Creager MA, Ganz P. Long-term effect of combined vitamins E and C on coronary and peripheral endothelial function. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:629-634.
- Koga H, Terasawa H, Nuno H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67phox participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1999; 274:25051-25060.
- Konieczkowski M, Dunn MJ, Stork JE, Hassid A. Glomerular synthesis of prostaglandins and thromboxane in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1983;5(4):446-452.
- Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol*. 1992;5:834-842.
- Korsgaard N, Christensen KL, Mulvany MJ. Cellular morphology in mesenteric resistance vessels from antihypertensive treated spontaneously hypertensive rats. *Basic Res Cardiol* 1991;86 Suppl 1:33-41.
- Kuchan MJ, Frangos JA. Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1993;264:H150-H156.
- Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1976; 24:117-191.
- Kurachi Y, Ito H, Sugimoto T, Shimizu T, Miki I, Ui M. Arachidonic acid metabolites as intracellular modulators of the G protein-gated cardiac K⁺ channel. *Nature* 1989;337:555-557.
- Lahera V, Navarro J, Biondi ML, Ruilope LM, Romero JC. Exogenous cGMP prevents decrease in diuresis and natriuresis induced by inhibition of NO synthesis. *Am J Physiol* 1993;264(2 Pt 2):F344-F347.
- Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004;109:II27-II33.
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003; 111:1201-1209.
- Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler

H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: Role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*. 2002;106:3073-3078.

Lansman JB, Hallan TJ, Rink TJ. Single-stretch activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers. *Nature*. 1987;325:811-813.

Lapouge K, Smith SJ, Walker PA, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Rittinger K. Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac. *GTP Mol Cell* 2000; 6:899–907.

Lassegue B, and Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension: an update. *Am J Hypertens* 2004;17:852–860.

Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285:R277-R297.

Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signalling pathways. *Circ Res* 2001;88:888–894.

Leone AM, Palmer RMJ, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Bio Chem*. 1991;266:23790-23795.

Li JM, Wheatcroft S, Fan LM, Kearney MT, Shah AM. Opposing roles of p47phox in basal versus angiotensin II-stimulated alterations in vascular O₂⁻ production, vascular tone, and mitogen-activated protein kinase activation. *Circulation* 2004; 109:1307-1313.

Li JM, Shah AM. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem* 2003; 278:12094-12100.

Li L, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. Vasopressin induces vascular superoxide via endothelin-1 in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*. 2003a;41:663-668.

Li L, Watts SW, Banes AK, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced vasoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*. 2003b;42:316-321.

Liang YC, Tsai SH, Tsai DC, Lin-Shiau SY, Lin LK. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated

receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett* 2001;496:12-18.

Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104:365-372.

Lincoln TM. Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther.* 1989;41:479-502.

Lodi F, Cogolludo A, Duarte J, Moreno L, Coviello A, Peral De Bruno M, Vera R, Galisteo M, Jimenez R, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Increased NADPH oxidase activity mediates spontaneous aortic tone in genetically hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2006;544:97-103.

Lopez-Lopez G, Moreno L, Cogolludo A, Galisteo M, Ibarra M, Duarte J, Lodi F, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Nitric oxide NO; scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol* 2004;65:851-859.

Louis WJ, Tabei R, Sjoerdsma A, Spector S. Inheritance of high blood-pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Lancet* 1969;1(7604):561-567.

Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander

RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986;315:1046-1051.

Lundin SA, Hallback-Nordlander M. Background of hyperkinetic circulatory state in young spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 1980;14(10):561-567.

Lungu AO, Jin ZG, Yamawaki H, Tanimoto T, Wong C, Berk BC. Cyclosporin A inhibits flow-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase by altering cholesterol content in caveolae. *J Biol Chem.* 2004;279:48794-48800.

Luscher TF. Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. A new concept in hypertension? *Am J Hypertens* 1990a;3(4):317-330.

Luscher TF, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens.* 1990b;3:55-58.

Luscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1986;8:344-348.

Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology* 2006;21:269-280.

Macheix J-J, Fleuriet A, Billot J. *Fruit phenolics*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990.

Maeda K, Yasunari K, Sato EF, Yoshikawa J, Inoue M. Activation of protein kinase C and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in leukocytes of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2003; 26:999-1006.

Maffei A, Poulet R, Vecchione C, Colella S, Fratta L, Frati G, Trimarco V, Trimarco B, Lembo G. Increased basal nitric oxide release despite enhanced free radical production in hypertension. *J Hypertens* 2002;20(6):1135-1142.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(suppl):230S– 242S.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy Ch, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-747.

Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Rémésy C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin

after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:235-242.

Manach C, Morand C, Texier O, et al. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 1995;125:1911-1922.

Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev*. 2003;83:183-252.

Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest*. 1997;99:1351-1360.

Martin S, Giannone G, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis. *Br J Pharmacol* 2003;139:1095–1102.

Martín W, White DG, Henderson AI. Endothelium-derived relaxing factor and atriopeptin II elevate cyclic GMP levels in pig aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 1988;93:229-239.

Maubach J, Bracke ME, Heyerick A, et al. Quantitation of soy-derived

phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2003;784:137-144.

McGuire JJ, Ding H, Triggle CR. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Can J Physiol Pharmacol*. 2001;79:443-470.

Mehta JL, Hu B, Chen J, Li D (2003) Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:2203-2208.

Mendelowitz D, Bacal K, Kunze D. Bradykinin-activated calcium influx pathway in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol*. 1992; 262:H942-H948.

Mervaala EM, Cheng ZJ, Tikkanen I, Lapatto R, Nurminen K, Vapaatalo H, Muller DN, Fiebeler A, Ganten U, Ganten D, Luft FC. Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension*. 2001;37:414-418.

Meyer JW, Schmitt ME. A central role for de endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS Lett* 2000 Apr 21;472(1):1-4.

Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1997;272:25907-25912.

Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, de Montellano PR, Kemp BE, Pearson RB. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol*. 1999;9:845-848.

Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52:673-751.

Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: Implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:681-684.

Miller VM, Burnett JC Jr. Modulation of NO and endothelin by chronic increases in blood flow in canine femoral arteries. *Am J Physiol*. 1992;263:H103-H108.

Minshall RD, Sessa WC, Stan RV, Anderson RG, Malik AB. Caveolin regulation of endothelial function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285:L1179-L1183.

Miyamoto Y, Akaike T, Yoshida M, Goto S, Horie H, Maeda H. Potentiation of nitric oxide-mediated

vasorelaxation by xantine oxidase inhibitors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;211(4):366-376.

Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation*. 1999;99:1141-1146.

Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Klschyv AL, Tsilimingas N, Walter U, Forsterman U, Meinertz T, Griendling K, Munzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expresion and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 2002. Mar 8;90(4):E58-E65.

Mombouli JV, Illiano S, Nagao T, Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The potentiation of bradykinin-induced relaxations by perindoprilat in canine coronary arteries involves both nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circ Res*. 1992;71:137-144.

Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, phatology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*. 1991;21:361-374.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Relationship between prostacyclin and nitric oxide in the thrombotic process. *Thromb Res Suppl*. 1990;11:3-13.

Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2, and prostacyclin. *Pharmacol Rev*. 1978;30:293-331.

Moncada S, Gryglewski RJ, Blunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*. 1976;263:663-665.

Monnink SH, van Haelst PL, van Boven AJ, Stroes ES, Tio RA, Plokker TW, Smit AJ, Veeger NJ, Crijns HJ, van Gilst WH. Endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: A comparison of three frequently reported tests. *J Investig Med*. 2002;50:19-24.

Moon SK, Cho GO, Jung SY, Gal SW, Kwon TK, Lee YC, Madamanchi NR, Kim CH. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: Role of ERK1/2, cell-cycle regulation and matrix metalloproteinase-9. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:1069-1078.

Moon JH, Tsushida T, Nakahara K, Terao J. Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:1274-1285.

- Moon JH, Nakata R, Oshima S, Inakuma T, Terao J. Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279:R461-467.
- Mordenti J, Chappell W. The use of interspecies scaling in toxicokinetics. In: Yacobi A, Kelly J and Batra V. editors. *Toxicokinetics and New Drug Development*. New York: Pergamon Press, 1989:42-96.
- Morrow JD, Roberts LJ 2nd. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* 1996;51(1):1-9.
- Mullen W, Graf BA, Caldwell ST, et al. Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-(14)C]quercetin-4'-glucoside. *J Agric Food Chem* 2002;50:6902-6909.
- Mulvany MJ, Baandrup U, Gundersen HJ. Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector. *Circ Res* 1985;57(5):794-800.
- Munzel T, Li H, Mollnau H, Hink U, Matheis E, Hartmann M, Oelze M, Skatchkov M, Warnholtz A, Duncker L, Meinertz T, Forstermann U. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res* 2000;86:E7-E12.
- Nadar S, Blann AD, Lip GY. Antihypertensive therapy and endothelial function. *Curr Pharm Des.* 2004;10:3607-3614.
- Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N, Shirvany H. Antioxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation. *Mol Cell Biochem* 2003; 246:193-196.
- Nagao T, Illiano S, Vanhoutte PM. Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am J Physiol* 1992a; 263:H1090-H1094.
- Nagao T, Vanhoutte PM. Hyperpolarisation as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J Physiol.* 1992b;445:355-67.
- Nakashima S, Tohmatsu T, Hattori H, Okano Y, Nozawa Y. Inhibitory action of cyclic GMP on secretion, phosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;135:1099-1104.

Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA* 1991. Nov 15;88(22):10045-10048.

Nam S, Smith DM, Dou QP. Tannic acid potently inhibits tumor cell proteasome activity, increases p27 and Bax expression, and induces G1 arrest and apoptosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1083-1088.

Nava E, Farre AL, Moreno C, Casado S, Moreau P, Cosentino F, Luscher TF. Alterations to the nitric oxide pathway in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1998;16(5):609-615.

Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols cause endothelium dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:371-377.

Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 1990;259:C3-C18.

Nemeth K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon

PA. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 2003 Jan;42(1):29-42.

Nijveldt RJ, Teerlink T, Van Der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, Van Leeuwen PA. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: High plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. *Clin Nutr*. 2003;22:23-30.

Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WN. Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo. *Am J Physiol*. 2000;279:H459-H465.

Nishizaka MK, Zaman MA, Green SA, Renfro KY, Calhoun DA. Impaired endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in hypertensive subjects with hyperaldosteronism. *Circulation* 2004;109:2857-2861.

Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD. The p67phox activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* 1999; 274:22999-23005.

O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Sly WS, O'Brien NM, Williamson G. Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-

glucuronidase. *FEBS Lett* 2001; 503:103-106.

Ogita H, Liao J. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium*. 2004; 11:123-132.

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91:2546-2551.

Oida K, Ebata K, Kanehara H, Suzuki J, Miyamori I. Effect of cilostazol on impaired vasodilatory response of the brachial artery to ischemia in smokers. *J Atheroscler Thromb*. 2003;10:93-98.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963;27:282-293.

Olsen MH, Wachtell K, Meyer C, Hove JD, Palmieri V, Dige-Petersen H, Rokkedal J, Hesse B, Ibsen H. Association between vascular dysfunction and reduced myocardial flow reserve in patients with hypertension: a LIFE substudy. *J Hum Hypertens*. 2004;18:445-452.

O'Reilly JD, Sanders TA, Wiseman H. Flavonoids protect against oxidative damage to LDL in vitro: use in selection of a flavonoid rich diet and relevance to LDL oxidation resistance ex vivo? *Free Radic Res* 2000; 33:419-426.

Osanai T, Saitoh M, Sasaki S, Tomita H, Matsunaga T, Okumura K. Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. *Hypertension*. 2003;42:985-990.

Ozgova S, Hermanek J, Gut I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate and Fe-microsomal systems. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:1127-1237.

Palloschi A, Fragasso G, Piatti P, Monti LD, Setola E, Valsecchi G, Galluccio E, Chierchia SL, Margonato A. Effect of oral L-arginine on blood pressure and symptoms and endothelial function in patients with systemic hypertension, positive exercise tests, and normal coronary arteries. *Am J Cardiol*. 2004;93:933-935.

Pan MH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Zhu NQ, Ho CT, Lin JK. Induction of apoptosis by the oolong tea polyphenol theasinensin A through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in human U937 cells. *J Agric Food Chem* 2000;48:6337-6346.

Panza JA, Casino PR, Badar DM, Quyyumi AA. Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in

patients with essential hypertension. *Circulation* 1993a; 87:1475-1481.

Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 1993b;87(5):1468-1474.

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1990;323:22-27.

Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest.* 1997;100:3131-3139.

Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *J Hypertens.* 2001a;19:415-420.

Park JB, Schiffrin EL. Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens.* 2001b;19: 921-930.

Passauer J, Bussemaker E, Lassig G, Gross P. Kidney transplantation improves endothelium-dependent

vasodilation in patients with endstage renal disease. *Transplantation.* 2003;75:1907-1910.

Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: Effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res* 2006;40:1054-1065.

Perez-Vizcaino F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnaez F, Moreno L, Lopez-Lopez JG, Tamargo J. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302:66–72.

Pershadsingh HA, Szollosi J, Benson S, Hyun WC, Feuerstein BG, Kurtz TW. Effects of ciglitazone on blood pressure and intracellular calcium metabolism. *Hypertension* 1993;21:1020-1023.

Perticone F, Maio R, Tripepi G, Zoccali C. Endothelial dysfunction and mild renal insufficiency in essential hypertension. *Circulation.* 2004;110:821-825.

Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001;104:191-196.

- Picq M, Dubois M, Prigent AF, Nemoz G, Pacheco H. Inhibition of the different cyclic nucleotide phosphod-esterase isoforms separated from rat brain by flavonoid compounds. *Biochem Int* 1989;18:47–57.
- Piech A, Dessy C, Havaux X, Feron O, Balligand JL. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2003; 57:456-467.
- Pierdomenico SD, Cipollone F, Lapenna D, Bucci A, Cucurullo F, Mezzetti A. Endothelial function in sustained and white coat hypertension. *Am J Hypertens*. 2002;15:946-952.
- Pietta P, Simonetti P, Roggi C, et al. Dietary flavonoids and oxidative stress. In: Kumpulainen JT, Salonen JT, eds. *Natural antioxidants and food quality in atherosclerosis and cancer prevention*. London: Royal Society of Chemistry, 1996:249-255.
- Piskula MK, Terao J. Accumulation of (–)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr* 1998; 128: 1172-1178.
- Pueyo ME, Arnal JF, Rami J, Michel JB. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *Am J Physiol* 1998;274:C214–C220.
- Qamirani E, Ren Y, Kuo L, Hein TW. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:995–1001.
- Quinn MT, Evans T, Loetterle LR, Jesaitis AJ, Bokoch GM. Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *J Biol Chem* 1993;268:20983–20987.
- Quyyumi AA. Prognostic value of endothelial function. *Am J Cardiol*. 2003;91:19H-24H.
- Radaelli A, Mircoli L, Mori I, Mancina G, Ferrari AU. Nitric oxide dependent vasodilation in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998;32(4):735-739.
- Raitakari M, Ilvonen T, Ahotupa M, Lehtimäki T, Harmoinen A, Suomi P, Elo J, Hartiala J, Raitakari OT. Weight reduction with very-low-caloric diet and endothelial function in overweight adults: Role of plasma glucose. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:124-128.
- Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH

oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97:1916-1923.

Randall MD, Kendall DA. Anandamide and endothelium-derived hyperpolarizing factor act via a common vasorelaxant mechanism in rat mesentery. *Eur J Pharmacol* 1998;346:51-53.

Rao GN, Katki KA, Madamanchi NR, Wu Y, Birrer MJ. JunB forms the majority of the AP-1 complex and is a target for redox regulation by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor agonists in smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999; 274:6003– 6010.

Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 1992;70(3):593-599.

Redon J, Oliva NR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Saez GT. Antioxidant activities and oxidative stress by products in human hypertension. *Hypertension* 2003. May;41(5):1096-1101.

Reshef N, Hayari Y, Goren C, Boaz M, Madar Z, Knobler H. Antihypertensive effect of sweetie fruit in patients with stage I hypertension. *Am J Hypertens* 2005;18:1360–1363.

Rey E. et al., Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91phox. *Circulation* 2002;106:2497–2502.

Richer C, Doussau MP, Giudicelli JF. Effects of captopril and enalapril on regional vascular resistance and reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1983;5(3):312-320.

Rice-Evans A, Packer L. Flavonoids in health and disease. New York: Marcel Dekker Inc., 1998.

Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan ML, Valentini U, Cimino A, Girelli A, Rodella L, Bianchi R, Sleiman I, Rosei EA. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 2001;103:1238-1244.

Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Tiberio G, Giulini SM, Rossi G, Bernini G, Agabiti-Rosei E. Endothelial dysfunction in hypertension is independent from the etiology and from vascular structure. *Hypertension*. 1998;31:335-341.

Rossi R, Chiurlia E, Nuzzo A, Cioni E, Origliani G, Modena MG. Flow-mediated vasodilation and the risk of developing hypertension in healthy postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:1636-1640.

- Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1986;250(5 Pt 2):H815-821.
- Ruiz-Velasco V, Zhong J, Hume J, Keef K. Modulation of Ca²⁺ channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ Res.* 1998;82:557-565.
- Saavedra JM, Groebecker H, Axelrod J. Changes in central catecholaminergic neurons in the spontaneously (genetic) hypertensive rat. *Circ Res* 1978;42(4):529-534.
- Saito S, Hirata Y, Emori T, Imai T, Marumo F. Angiotensin II activates endothelial constitutive nitric oxide synthase via AT1 receptors. *Hypertens Res* 1996;19:201-206.
- Saito N, Mukaino S, Ogino K, Kawai C. Vascular lesions in hypertensive rats under salt loading: kidney renin and lysosomal enzymes. *Clin Sci Mol Med Suppl* 1976 Dec;3:49s-51s.
- Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, Katan MB. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc* 2002; 102:1414-1420.
- Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc.* 2003;36:147-156.
- Sawai Y, Kohsaka K, Nishiyama Y, Ando K. Serum concentrations of rutoside metabolites after oral administration of a rutoside formulation to humans. *Arzneim Forsch* 1987;37:729-732.
- Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation.* 2000;101:1899-1906.
- Schieffer B, Luchtefeld M, Braun S, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H. Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. *Circ Res* 2000; 87:1195-1201.
- Schiffrin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens.* 2004;17:1192-1200.
- Schiffrin EL, Touyz RM. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: Benefits of AT1 receptor blockade. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:911-913.
- Schiffrin EL, Park JB, Pu Q. Effect of crossing over hypertensive patients from a beta-blocker to an angiotensin receptor antagonist on

resistance artery structure and on endothelial function. *J Hypertens.* 2002a;20:71-78.

Schiffirin EL, Pu Q, Park JB. Effect of amlodipine compared to atenolol on small arteries of previously untreated essential hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2002b;15:105-110.

Schiffirin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation.* 2000;101:1653-1659.

Schiffirin EL, Parent A, St Louis J, Tremblay J, Garcia R, Thibault G. Vascular atrial natriuretic factor receptors in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 1992;26(9):857-864.

Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature.* 2000;404:197-201.

Schofield I, Malik R, Izzard A, Austin C, Heagerty A. Vascular structural and functional changes in type 2 diabetes mellitus: Evidence for the roles of abnormal myogenic

responsiveness and dyslipidemia. *Circulation.* 2002;106:3037-3043.

Schramm D, Collins H, German B. Flavonoid transport by mammalian endothelial cells. *J Nutr Biochem* 1999;10:193-197.

Sedeek MH, Llinas MT, Drummond H, Fortepiani L, Abram SR, Alexander BT, Reckelhoff JF, Granger JP. Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension. *Hypertension.* 2003;42:806-810.

Servant MJ, Giasson E, Meloche S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996;271:16047-16052.

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 2002;91:406-413.

Sesink AL, O'Leary KA, Hollman PC. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. *J Nutr* 2001;131:1938-1941.

Shimoi K, Saka N, Nozawa R, Sato M, Amano I, Nakayama T, Kinoshita N. Deglucuronidation of a flavonoid,

luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug Metab Dispos* 2001; 29(1):521-1524.

Shimokawa H, Matoba T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol Res.* 2004;49:543-549.

Shimokawa H, Flavhan NA, Lorenz RR, Vanhoutte PM. Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in porcine coronary artery. *Br J Pharmacol.* 1988;95:1197-1203.

Simonson MS, Wann S, Mene P. Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest.* 1989;83:708-712.

Simonyi A, Wang Q, Miller RL, Yusof M, Shelat PB, Sun AY, Sun GY. Polyphenols in cerebral ischemia: Novel targets for neuroprotection. *Mol Neurobiol* 2005;31:135-148.

Sindhu RK, Ehdaie A, Vaziri ND, Roberts CK. Effects of chronic renal failure on caveolin-1, guanylate cyclase and AKT protein expression. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1690:231-237.

Singh RB, Niaz MA, Rastogi SS, Shukla PK, Thakur AS. Effect of hydrosoluble coenzyme Q10 on blood pressures and insulin

resistance in hypertensive patients with coronary artery disease. *J Hum Hypertens* 1999; 13:203-208.

Somers MJ, Griedling KK, Harrison DG. The role of oxidative stress in hypertension. *Oxidative stress and vascular disease 2000*; Keaney JF, Jr (ed). Kluwer Academic Publishers, 323-333.

Song J, Davis MJ. Chloride and cation currents activated by bradykinin in coronary venular endothelial cell. *Am J Physiol.* 1994;267:H2508-H515.

Sowa G, Liu J, Papapetropoulos A, Rex-Haffner M, Hughes TE, Sessa WC. Trafficking of endothelial nitric-oxide synthase in living cells. Quantitative evidence supporting the role of palmitoylation as a kinetic trapping mechanism limiting membrane diffusion. *J Biol Chem.* 1999;274:22524-531.

Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999;100:1050-1055.

Stuehr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:339-359.

Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upton BM, Kapoor O, Szuba A, Malinow MR, Wascher TC, Pachinger O, Cooke JP. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: Role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2003;108:933-938.

Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: Role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2001;104:2569-2575.

Sudheesh S, Sandhya C, Sarah KA, Vijayalakshmi NR. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytoter Res* 1999;13:393-396.

Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000;101:948-954.

Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schombein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Hydroethidine microfluorography. Hypertension* 1995;25(5):1083-1089.

Szabo C, Mabley JG, Moeller SM, Shimanovich R, Pacher P, Virag L, Soriano FG, Van Duzer JH, Williams W, Salzman AL, Groves JT. Part I: Pathogenetic role of

peroxynitrite in the development of diabetes and diabetic vascular complications: Studies with FP15, a novel potent peroxynitrite decomposition catalyst. *Mol Med*. 2002;8:571-580.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*. 1998;97:2222-2229.

Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*. 1996;94:1298-1303.

Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nuno H, Sumimoto H. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 2003;278:25234-25246.

Takiuchi S, Fujii H, Kamide K, Horio T, Nakatani S, Hiuge A, Rakugi H, Ogihara T, Kawano Y. Plasma asymmetric dimethylarginine and coronary and peripheral endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2004;17:802-808.

Tamaoki J, Tagaya E, Nishimura K, Isono K, Nagai A. Role of Na⁺/K⁺-ATPase in cyclic GMP-

- mediated relaxation of canine pulmonary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 1997;122:112-116.
- Tauber AI, Fay JR, Marletta MA. Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Biochem Pharmacol* 1984;33:1367-1369.
- Taylor SG, Southerton JS, Weston AH, Baker JR. Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta : a comparison with sodium nitroprusside and cromakalim. *Br J Pharmacol*. 1988;94:853-863.
- Teerlink JR, Breu V, Sprecher U, Clozel M, Clozel JP. Potent vasoconstriction mediated by endothelin ETB receptors in canine coronary arteries. *Circ Res*. 1994;74:105-114.
- Thambyrajah J, Landray MJ, McGlynn FJ, Jones HJ, Wheeler DC, Townsend JN. Abnormalities of endothelial function in patients with predialysis renal failure. *Heart* 2000;83:205-209.
- Thorup C, Kornfeld M, Goligorsky MS, Moore LC. AT1 receptor inhibition blunts angiotensin II-stimulated nitric oxide release in renal arteries. *J Am Soc Nephrol Suppl* 1999;10:S220-S224.
- Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signalling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004;44:248-252.
- Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003a;23:981-987.
- Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodeling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003b;30:860-866.
- Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 2002;90:1205-1213.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens* 2001; 19:1245-1254.
- Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. Expression of a

functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 2000;90:1205-1213.

Touyz RM and Schiffrin EL. Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1999;34:976-982.

Trippodo NC, Walsh GM, Frohlich ED. Fluid volumes during onset of spontaneously hypertension in rats. *Am J Physiol* 1978;235(1):H52-H55.

Tschudi MR, Mesaros S, Luscher TF, Malinski T. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension* 1996;27(1):32-35.

Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: a potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 1999;100:1223-1229.

Uddin M, Yang H, Shi M, Polley-Mandal M, Guo Z. Elevation of oxidative stress in the aorta of genetically hypertensive mice. *Mech Ageing Dev.* 2003;124:811-817.

Ueno I, Nakano N, Hirono I. Metabolic fate of [14C] quercetin in the ACI rat. *Jpn J Exp Med* 1983;53:41-50.

Ulker S, McKeown PP, Bayraktutan U. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension* 2003; 41:534-539.

Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, Alexander RW. Novel role of gp91phox-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* 2002;91:1160-1167.

Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimaki T, Laakso J, Laaksonen R.: Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet.* 2001;358:2127-2128.

Van Acker SA, de Groot MJ, van den Berg DJ, et al. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chem Res Toxicol* 1996;9:1305-1312.

Van Acker SA, Tromp MN, Haenen GR, Van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:755-759.

- Van Erp-Baart MAJ, Brants HAM, Kiely M. Isoflavone intake in four different European countries: the VENUS approach. *Br J Nutr.* 2003;89:25-30.
- Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol.* 2005;144:449-458.
- Vanhoutte PM. Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation.* 1993;87:V9-V17.
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res* 2003;37:121-127.
- Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.* 2003;63:179-185.
- Vaziri ND, Wang XQ. cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide. *Hypertension* 1999; 34:1237-1241.
- Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31:1248-1254.
- Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 2002;106:1439-1441.
- Vera R, Galisteo M, Villar IC, Sanchez M, Zarzuelo A, Perez-Vizcaino F, Duarte J. Soy isoflavones improve endothelial function in spontaneously hypertensive rats in an estrogen-independent manner: role of nitric oxide synthase, superoxide, and cyclooxygenase metabolites. *J Pharmacol Exp Ther* 2005 Sep;314(3):1300-1309.
- Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Stewart DJ. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation.* 2002;106:913-919.
- Versteeg DH, Palkovits M, Van der Gungten, Wijnen HL, Smeets GW, de Jong W. Catecholamine content of individual brain regions of spontaneously hypertensive rats (SH-rats). *Brain Res* 1976 Aug 13;112(2):429-434.
- Vieira O, Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Basile JP, Laranjinha J, Almeida L, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by

oxidized LDL. *Br J Pharmacol* 1998;123:565–573.

Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis* 2001;156:67–72.

Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens* 2004; 22:535-542.

Virdis A, Iglarz M, Neves MF, Touyz RM, Rozen R, Schiffrin EL. Effect of hyperhomocystinemia and hypertension on endothelial function in methylenetetrahydrofolate reductase-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1352-1357.

Virdis A, Ghiadoni L, Cardinal H, Favilla S, Duranti P, Birindelli R, Magagna A, Bernini G, Salvetti G, Taddei S, Salvetti A. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction induced by fasting hyperhomocystinemia in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:1106-1115.

Vlachopoulos C, Tsekoura D, Alexopoulos N, Panagiotakos D, Aznaouridis K, Stefanadis C. Type 5 phosphodiesterase inhibition by sildenafil abrogates acute smoking-induced endothelial dysfunction. *AmJ Hypertens* 2003;17:1040–1014.

Wanby P, Brattstrom L, Brudin L, Hultberg B, Teerlink T. Asymmetric dimethylarginine and total homocysteine in plasma after methionine loading. *Scand J Lab Invest.* 2003;63:347-357.

Ward NC, Croft KD, Hodgson J, Rich L, Beilin LJ, Puddey IB. Brachial artery vasomotor function is inversely associated with 24-h ambulatory blood pressure. *J Hypertens.* 2004;22:967-972.

Warner TD, Mitchell JA, Sheng H, Murad F. Effects of cyclic-GMP on smooth muscle relaxation. *Adv Pharmacol* 1994;26:171–194.

Warner TD, Schmidt HW, Murad F. Interactions of endothelins and EDRF in bovine native endothelial: selective effects of endothelin-3. *Am J Physiol.* 1992;262:H1600-H1605.

Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, Linz W, Bohm M, Nickenig G. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:300–305.

Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, et al. Pharmacokinetics of soy-bean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr* 1998;128:1710-1715.

Waterhouse AL. Wine phenolics. *Ann NY Acad Sci* 2002;957:21–36.

- Wedgwood S, Black SM. Induction of apoptosis in fetal pulmonary arterial smooth muscle cells by a combined superoxide dismutase/catalase mimetic. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285:L305-L312.
- Welch WJ, Chabrashvili T, Solis G, Chen Y, Gill PS, Aslam S, Wang X, Ji H, Sandberg K, Jose P, Wilcox CS. Role of extracellular superoxide dismutase in the mouse angiotensin slow pressor response. *Hypertension* 2006 Nov; 48(5):934-941.
- Welch WJ, Wilcox CS. AT1 receptor antagonist combats oxidative stress and restores nitric oxide signaling in the SHR. *Kidney Int.* 2001;59:1257-1263.
- Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J* 1993;296:557-561.
- Wingler K, Wunsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M, Schmidt HH. Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1456-1464.
- Winternitz JL. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Br Heart J* 1993;69(1 Suppl):S12-S18.
- Wong PC, Price WA Jr, Chiu AT, Carini DJ, Duncia JV, Johnson AL, Wexler RR, Timmermans PB. Hypotensive action of DuP 753, an angiotensin II antagonist, in spontaneously hypertensive rats. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: X. *Hypertension* 1990;15(5):459-468.
- Woodman OL, Wongsawatkul O, Sobey CG. Contribution of nitric oxide, cyclic GMP and potassium channel to acetylcholine-induced vasodilatation of rat conduit and resistance arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27:34-40.
- Wu R, Laplante MA, de Champlain J. Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension, and cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension* 2005 Jun;45(6):1139-1144.
- Wu R, Lamontagne D, de Champlain J. Antioxidative properties of acetylsalicylic Acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 2002;105:387-392.
- Xiao S, Wagner L, Schmidt RJ, Baylis C. Circulating endothelial nitric oxide synthase inhibitory factor in some patients with chronic renal disease. *Kidney Int.* 2001;59:1466-1472.
- Yamamoto E, Lai Z-F, Yamashita T, Tanaka T, Kataoka K, Tokutomi Y,

Ito T, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Enhancement of cardiac oxidative stress by tachycardia and its critical role in cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Hypertens* 2006;24:2057-2069.

Yang D, Feletou M, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM. A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR. *Hypertension* 2003; 41:143-148.

Yang D, Feletou M, Boulanger CM, Wu HF, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2002;136:104-110.

Yasunari K, Maeda K, Nakamura M, Watanabe T, Yoshikawa J, Asada A. Effects of carvedilol on oxidative stress in polymorphonuclear and mononuclear cells in patients with essential hypertension. *Am J Med.* 2004;116:460-465.

Yildiz A, Oflaz H, Pusuroglu H, Mercanoglu F, Genchallac H, Akkaya V, Ikizler TA, Sever MS. Left ventricular hypertrophy and endothelial dysfunction in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2003;41:616-623.

Yokokawa K, Tahara H, Khono M, Mandal AK, Yanagisawa M, Takeda T. Heparin regulates endothelin

production through endothelium-derived nitric oxide in human endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993;92:2080-2085.

Yoshizumi M, Tsuchiya K, Suzaki Y, Kirima K, Kyaw M, Moon JH, Terao J, Tamaki T. Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:1458-1465.

Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000;29:51-60.

Zanzinger J. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. *Auton Neurosci.* 2002;98:24-27.

Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279:F671-F678.

Zhao X, Gu Z, Attele AS, Yuan CS. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *J Ethnopharmacol* 1999;67:279-285.

Zheng JS, Yang XQ, Lookingland KJ, Fink GD, Hesslinger C, Kapatoss G, Kovesdi I, Chen AF. Gene transfer of human guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I restores vascular tetrahydrobiopterin level and endothelial function in low renin hypertension. *Circulation* 2003a;108:1238-1245.

Zheng J and Ramirez VD. Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br J Pharmacol* 2003b;130(5): 1115-1123.

Zhou MS, Jaimes EA, Raj L. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress. *Hypertension* 2004;44:186-190.

Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol.* 2000;50:139-148.

Zoccali C, Benedetto FA, Maas R, Mallamaci F, Tripepi G, Malatino LS, Boger R. Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002a;13:490-496.

Zoccali C, Mallamaci F, Maas R, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino LS, Cataliotti A, Bellanuova I, Boger R. Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002b;62:339-345.

Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frolich J, Boger R. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: A prospective study. *Lancet* 2001;358:2113-2117.

Zygmunt PM, Waldeck K, Hogestatt ED. The endothelium mediates a nitric oxide-independent hyperpolarization and relaxation in the rat hepatic artery. *Acta Physiol Scand.* 1994;152:375-384.