

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**EFFECTOS CARDIOVASCULARES DE**  
**ISOFLAVONAS EN HIPERTENSIÓN GENÉTICA**

**TESIS DOCTORAL**

**ROCÍO VERA GONZÁLEZ**  
**2006**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**EFFECTOS CARDIOVASCULARES DE**  
**ISOFLAVONAS EN HIPERTENSIÓN GENÉTICA**

**Tesis Doctoral para aspirar al Grado de**  
**Doctor en Farmacia que presenta la**  
**Licenciada Dña. Rocío Vera González**  
**2006**



**LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTA TESIS DOCTORAL:**

AA	Ácido araquidónico
ACh	Acetilcolina
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
Ang II	Angiotensina II
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenín trifosfato
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
Bk	Bradicinina
CMLV	Células del músculo liso vascular
COX	Ciclooxigenasa
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración intracelular de calcio
DAPI	Dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DDAH	Dimetilaminohidrolasa
DHE	Dihidroetidio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOCA-sal	Deoxicorticosterona-sal
DPI	Cloruro de difenileniodonio
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ET-1	Endotelina-1
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FHDE	Factor hiperpolarizante derivado de endotelio
FMN	Flavín mononucleótido
FRDE	Factor relajante derivado de endotelio

GCs	Guanilato ciclasa soluble
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GP <sub>x</sub>	Glutation peroxidasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanolsulfónico
ICAM-1	Moléculas de adhesión intercelular 1
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4, 5 trifosfato
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
L-NAME	N <sup>o</sup> -nitro-L-arginina metil éster
MCP-1	Péptido-1 quimioattractante de macrófagos
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOS <sub>e</sub>	NOS endotelial
NOS <sub>i</sub>	NOS inducible
NOS <sub>n</sub>	NOS neuronal
NPS	Nitroprusiato sódico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Aniones superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitritos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PK	Proteín kinasa
PPAR	Receptores para activadores de la proliferación de peroxisomas
RE	Receptor estrogénico
RS	Retículo sarcoplásmico

SEM	Error estándar de la media
SHBG	Globulinas de unión de las hormonas sexuales
SHR	Rata espontáneamente hipertensa
SOD	Superóxido dismutasa
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
THS	Terapia hormonal sustitutiva
tPA	Activador del plasminógeno tisular
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
VCAM-1	Moléculas de adhesión a las células vasculares 1
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WKY	Wistar Kyoto

## **ÍNDICE**

---

---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL HIPERTENSIVA</b> .....	3
1.1. FISIOLÓGÍA DEL ENDOTELIO.....	3
1.2. FUNCIONES DEL ENDOTELIO.....	4
1.2.1. Transporte endotelial: barrera permeable.....	4
-Transporte de glucosa.....	4
-Transporte de aminoácidos.....	5
-Caveolas.....	5
-Uniones estrechas.....	5
1.2.2. Tono vascular.....	6
1.2.2.a. Factores vasodilatadores derivados del endotelio.....	6
-Prostaciclina.....	7
-Óxido nítrico.....	8
-Factor hiperpolarizante derivado de endotelio.....	15
1.2.2.b. Factores contractores derivados del endotelio.....	16
-Endotelina.....	16
-Tromboxano A <sub>2</sub> y prostaglandina H <sub>2</sub> .....	18
1.2.3. Hemostasis y coagulación.....	19
1.2.4. Angiogénesis.....	20
1.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	21
1.3.1. Concepto.....	21
1.3.2. Enfermedad cardiovascular y disfunción endotelial.....	22
1.3.3. Fisiopatología de la disfunción endotelial.....	23
-Óxido nítrico.....	24
-Dimetilarginina asimétrica.....	26

-Metabolitos del ácido araquidónico.....	27
-Estrés oxidativo.....	28
-Hiperhomocisteinemia.....	33
1.3.4. Valor pronóstico de la disfunción endotelial.....	33
1.3.5. Tratamiento de la disfunción endotelial.....	34
<b>2. ISOFLAVONAS Y FUNCIÓN ENDOTELIAL.....</b>	<b>37</b>
2.1. INTRODUCCIÓN.....	37
2.2. ESTRUCTURA QUÍMICA.....	38
2.3.FARMACOCINÉTICA.....	40
2.4. ACCIONES CARDIOVASCULARES.....	42
2.4.1. Lípidos en plasma y lipoproteínas.....	42
2.4.2. Oxidación de LDL.....	44
2.4.3. Función arterial.....	46
-Tono vascular dependiente de endotelio.....	46
-Compliancia.....	48
2.4.4. Agregación plaquetaria.....	48
2.4.5. Aterosclerosis.....	49
2.4.6. Hipertensión.....	50
2.5. OTRAS ACCIONES FARMACOLÓGICAS.....	51
2.5.1. Cáncer.....	51
2.5.2. Síntomas postmenopáusicos.....	52
2.5.3. Osteoporosis.....	53
2.6. TOXICIDAD.....	54
<b>JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>

---

<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
<b>1. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>65</b>
1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	65
1.2. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR.....	65
1.2.1. Procedimiento general de la técnica y preparación del tejido.....	65
1.2.2. Protocolos experimentales.....	66
-Efectos de las isoflavonas en la relajación inducida por acetilcolina.....	66
-Efectos de las isoflavonas en la relajación inducida por nitroprusiato sódico.....	66
-Efectos de las isoflavonas en la contracción inducida por acetilcolina.....	67
-Efectos de las isoflavonas en la contracción inducida por U46619.....	67
1.3. PRODUCCIÓN DE PROSTANOIDES.....	68
1.4. ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO SINTASA VASCULAR.....	69
1.5. PRODUCCIÓN AÓRTICA DE ANIONES SUPERÓXIDO.....	69
1.6. REACTIVOS.....	70
1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	70
<b>2. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>71</b>
2.1. ANIMALES UTILIZADOS Y GRUPOS EXPERIMENTALES.....	71
2.1.1. Experimento I: Efectos de la genisteína sobre la hipertensión y la disfunción endotelial en SHR.....	71

2.1.2. Experimento II: Implicación de los mecanismos estrogénicos en los efectos de la genisteína en SHR.....	72
2.1.3. Experimento III: Efectos protectores de la genisteína sobre la presión arterial y la función vascular en SHR ovariectomizadas.....	72
2.2. MEDIDAS DE PRESIÓN ARTERIAL.....	73
2.3. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS.....	74
2.4. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR.....	75
2.4.1. Protocolos del experimento I y II.....	75
2.4.2. Protocolos del experimento III.....	75
2.5. ACTIVIDAD NOS VASCULAR.....	76
2.6. WESTERN BLOT.....	76
2.7. DETECCIÓN <i>IN SITU</i> DE LA PRODUCCIÓN VASCULAR DE O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	78
2.8. REACTIVOS.....	79
2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	79
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
1. EFECTOS <i>IN VITRO</i> DE GENISTEÍNA Y DAIDZEÍNA SOBRE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN SHR.....	83
1.1. Efectos de las isoflavonas en la relajación inducida por acetilcolina..	83
1.2. Efectos de las isoflavonas en la actividad NOS vascular.....	88
1.3. Efectos de las isoflavonas en la producción vascular de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	88
1.4. Efectos de las isoflavonas en la contracción inducida por acetilcolina	89
1.5. Efectos de las isoflavonas en la liberación de prostanoïdes.....	92
1.6. Efectos de las isoflavonas en la contracción inducida por U46619.....	92

---

2. EFECTOS DE LA GENISTEÍNA EN EL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN Y LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN SHR. IMPLICACIÓN DE MECANISMOS ESTROGÉNICOS.....	95
2.1. Presión arterial y frecuencia cardíaca.....	95
2.2. Variables morfológicas.....	96
2.3. Reactividad vascular.....	98
2.4. Actividad NOS vascular y expresión de la NOSe y sus proteínas reguladoras.....	101
2.5. Expresión de caveolina-1 y -3 en el ventrículo izquierdo.....	105
2.6. Producción vascular de $O_2^-$ .....	106
3. EFECTOS PROTECTORES DE LA GENISTEÍNA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL Y LA FUNCIÓN VASCULAR EN SHR OVARIECTOMIZADAS.	107
3.1. Presión arterial.....	107
3.2. Variables morfológicas.....	108
3.3. Niveles de estrógenos en plasma.....	109
3.4. Reactividad vascular.....	109
3.5. Expresión de la NOSe y sus proteínas reguladoras y del receptor AT-1 en aorta de rata.....	112
3.6. Detección <i>in situ</i> de la producción de $O_2^-$ en aorta de rata.....	114
<b>DISCUSIÓN</b> .....	117
1. EFECTOS <i>IN VITRO</i> DE GENISTEÍNA Y DAIDZEÍNA SOBRE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN SHR.....	119
2. EFECTOS DE LA GENISTEÍNA EN EL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN Y LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN SHR. IMPLICACIÓN DE MECANISMOS ESTROGÉNICOS.....	125

3. EFECTOS PROTECTORES DE LA GENISTEÍNA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL Y LA FUNCIÓN VASCULAR EN SHR OVARIECTOMIZADAS.	132
<b>CONCLUSIONES</b> .....	139
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	143

## **INTRODUCCIÓN**

---

## 1. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL HIPERTENSIVA

### 1.1. FISIOLÓGÍA DEL ENDOTELIO

El endotelio es un tejido de origen mesodérmico constituido por una única capa de células aplanadas que se encuentran tapizando toda la superficie interna del sistema vascular. En adultos, aproximadamente diez trillones de células endoteliales forman casi 1 Kg de “órgano”. 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, pero el endotelio de ningún modo es un tejido inerte. Como barrera, el endotelio es semipermeable y regula la transferencia de pequeñas y grandes moléculas. 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 va a variar en función del lecho vascular que estamos considerando. 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 también importante anotar 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, han alterado la expresión de proteínas clave comparada con las células estudiadas *in vivo* (Galley y cols., 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, hipertensión, hipertensión pulmonar, sepsis y síndromes inflamatorios, se ha involucrado una respuesta alterada de las células endoteliales. Estas enfermedades están relacionadas con el daño, disfunción o activación endotelial.

## **1.2. FUNCIONES DEL ENDOTELIO**

### **1.2.1. Transporte endotelial: barrera permeable**

El endotelio es una barrera permeable que permite el libre 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 al espacio subendotelial para cubrir las necesidades metabólicas de las células del tejido circundante (Mann y cols., 2003). Además, el transporte entre células endoteliales (uniones estrechas) actúa como una barrera selectiva a la salida de las moléculas de la circulación.

#### **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 están expresados en las células endoteliales, siendo la 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 en la hipoxemia. El principal tejido endotelial que expresa transportadores GLUT es la barrera hemato-encefálica; aunque también se han detectado en otras células endoteliales localizadas en el cordón

umbilical, capilares adrenales, aorta, retina, corazón, placenta, ojo y testículos (Mann y cols., 2003).

### **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 relevante, 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  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), pueden estimular el transporte de L-arginina en las células endoteliales, lo que supone un incremento de la producción de NO (Bogle y cols., 1995).

### **Caveolas**

Las caveolas son invaginaciones en la membrana celular y son responsables del transporte transcelular (transcitosis) en células endoteliales (Minshall y cols., 2003). Por ejemplo, la transcitosis vía caveola es el principal medio de transporte de albumina 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, la caveolina-1 regula la vía del NO al unirse a la óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe), manteniéndola inactiva (Bucci y cols., 2000). Además, la caveolina-1 también está implicada en las vías de señalización del calcio en las células endoteliales (Fujimoto, 1993).

### **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, la vía paracelular (uniones estrechas) y la vía transcelular (caveolas) del endotelio, 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 permite el paso selectivo de moléculas o como una “valla” que lo impide (Sawada y cols., 2003). Algunos virus y bacterias patógenas afectan la función de estas uniones entre células lo que conduce a enfermedades del sistema vascular (e.j. edemas), del tracto gastrointestinal (e.j. diarreas) y del tracto respiratorio (e.j. síndrome del distrés respiratorio agudo).

### **1.2.2. 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/relajación del músculo liso adyacente. El endotelio sintetiza agentes vasodilatadores así como factores vasoconstrictores (Vane y cols., 1990; Vanhoutte, 1993). Dentro de los primeros tenemos NO, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y factor hiperpolarizante derivado de endotelio (FHDE). El segundo grupo está formado por endotelina-1 (ET-1) y productos derivados de la vía de la ciclooxigenasa (COX) como aniones superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) y prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>).

#### **1.2.2.a. Factores vasodilatadores derivados del endotelio**

En 1980, Furchgott y Zawadzki descubrieron que era necesaria la presencia de células endoteliales para la inducción de 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 la 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), originando el producto responsable de la relajación de las CMLV. En 1981, Furchgott aumentó la lista de factores vasoactivos (sustancia P, bradicinina (Bk), adenín trifosfato (ATP) y el ionóforo del 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 las células endoteliales y liberar la molécula con capacidad vasodilatadora, la cual, al desconocerse su naturaleza química, se le denominó factor relajante derivado de endotelio (FRDE) (Furchgott, 1981; Cherry y cols., 1982; Angus y Cocks, 1989). El punto de convergencia para todos los agentes que estimulaban la liberación de FRDE 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 estimulación del endotelio, es conocida hoy en día como “relajación dependiente de endotelio” y está relacionada con la liberación de al menos un FRDE. Los tres factores vasodilatadores producidos por el endotelio son el NO, la PGI<sub>2</sub> y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (FHDE), siendo el principal el NO, ya que es el único que ejerce un efecto tónico vasodilatador sobre la pared vascular.

### **Prostaciclina**

La PGI<sub>2</sub> fue el primer FRDE 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 de promover vasodilatación (Moncada y cols., 1976).

La PGI<sub>2</sub> se sintetiza fundamentalmente en las células endoteliales vasculares a partir del AA mediante la acción de complejo enzimático COX-PGI<sub>2</sub> sintetasa.

También se sintetiza en CMLV y plaquetas donde contribuye a regular el estado de agregación plaquetaria. Parte de la acción de la PGI<sub>2</sub> tiene lugar a través de la unión a receptores específicos de la superficie de las CMLV que se encuentran acoplados a través de proteínas Gs a la adenilato ciclasa, lo que conduce a un aumento de los niveles intracelulares de AMPc (adenosín monofosfato cíclico) y relajación del músculo liso (Gorman y cols., 1977; Best y cols., 1977; Hajjar y cols., 1982; Furchgott y Vanhoutte, 1989; Vanhoutte, 1993). Entre los factores que estimulan la síntesis y liberación de PGI<sub>2</sub> están la angiotensina II (Ang II), la ACh o la Bk, así como productos derivados de las plaquetas como la serotonina y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).

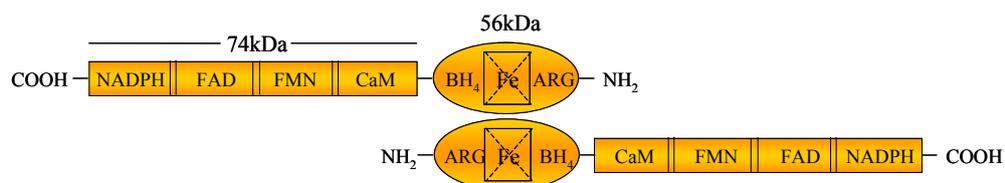
El NO y la PGI<sub>2</sub> actúan de forma sinérgica para promover tanto la relajación de la fibra lisa vascular como para inhibir la agregación plaquetaria (Moncada y Vane, 1978). En arterias coronarias porcinas, la PGI<sub>2</sub> estimula la liberación e incrementa la actividad relajante del FRDE; sugiriéndose que la estimulación del AMPc, en las CMLV, aumenta la sensibilidad al NO (Shimokawa y cols., 1988). Por otro lado, el NO inhibe la producción de PGI<sub>2</sub> en células endoteliales aórticas bovinas cultivadas (Doni y cols., 1988).

### **Óxido nítrico**

El NO es una molécula pequeña de naturaleza gaseosa que actúa como mediador de numerosos procesos biológicos. Se produce a partir del grupo guanidino de la L-arginina, siendo el otro coproducto de esta reacción biológica la L-citrulina. La NOS es una hemoproteína que además del sustrato requiere oxígeno molecular (Leone y cols., 1991) y la presencia de calmodulina y de cuatro cofactores: nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (forma reducida) (NADPH), flavín adenín dinucleótido (forma oxidada) (FAD), flavín mononucleótido (forma oxidada) (FMN) y tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (Stuehr, 1997).

En el hombre se han identificado tres isoformas de esta enzima: NOS inducible (NOSi), NOS neuronal (NOSn) y NOS endotelial (NOSe) (Forstermann y Kleinert, 1995; Griffith y Stuehr, 1995). La NOSn y NOSe están expresadas constitutivamente; la NOSi requiere, en la mayoría de los casos, la presencia de estímulos extracelulares específicos para su expresión y, en contraste con NOSn y NOSe, 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 NOSi 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 y de lesión celular.

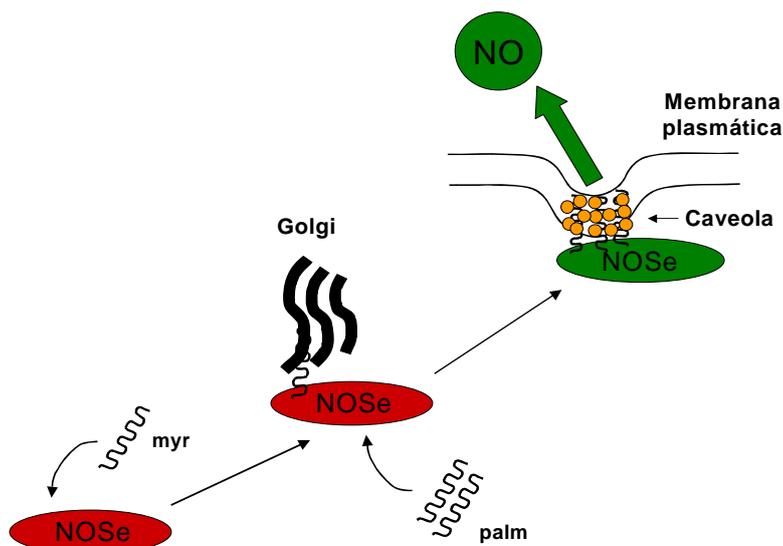
Para que la NOS sea activa, se produce el acoplamiento entre dos subunidades idénticas (Figura 1). Cada subunidad a su vez presenta dos dominios, uno con actividad oxigenasa y otro con actividad reductasa, que actúan de manera independiente. La  $BH_4$  favorece la formación de este dímero activo a partir 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 la NOS constitutiva hay además lugares para la fosforilación por proteínas kinasas 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).



**Figura 1.** Estructura de la NOS mostrando el acoplamiento entre las dos subunidades para formar el dímero activo. Los dominios de la porción C-terminal con actividad reductasa tienen una longitud total de 74 kDa y allí se unen el flavín mononucleótido (FMN), el flavín adenín dinucleótido (FAD) y la nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADPH). Cerca del centro del péptido, entre los residuos 503-532, se encuentra una secuencia de unión a la calmodulina (CaM). El dominio con actividad oxigenasa, con un peso total equivalente a 56 kDa, contiene lugares de unión para la L-arginina (ARG), tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) y el grupo hemo (Fe).

Existen diferencias en la localización celular de las isoformas de la NOS. Así, la NOSn y la NOSi son enzimas solubles de localización citosólica, mientras que la NOSe está asociada a la membrana. Sowa y cols. (1999), utilizando células transfectadas con la NOSe, demostraron que ~50% del total de la NOSe está localizada en la membrana plasmática y el 35% en el aparato de Golgi.

La NOSe sufre modificaciones postraduccionales, en el retículo endoplásmico 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 denominados caveolas. Estas estructuras membranales están implicadas en los procesos de transcitosis de macromoléculas, como hemos comentado anteriormente. Recientemente, se ha descrito su participación en la regulación de la actividad de la NOSe (Figura 2).



**Figura 2.** Conducción de la NOSe a la caveola. La miristoilación dirige a la proteína al aparato de Golgi donde sufre la adición de restos de palmitato que favorecen su asociación a la caveola, microdominios de la membrana plasmática ricos en colesterol (círculos naranjas).

Las caveolas acogen receptores para muchos de los estímulos de la NOSe, el transportador de L-arginina, ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  y canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de inositol 1,4,5 trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). Además poseen proteínas que actúan como moduladores alostéricos de la NOSe. La caveolina-1 es una proteína caveolar asociada a la NOSe. 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 NOSe e inhibe su actividad catalítica (Garcia-Cardena y cols., 1997; Ju y cols., 1997). Esta inhibición se revierte mediante el aumento del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina y por fosforilación inducida por proteínas kinasas.

La actividad de las isoformas constitutivas está controlada por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina intracelular, disminuyendo su actividad 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, Ang II, sustancia P, ATP, estradiol) aumentan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; el consiguiente aumento de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina rompe la interacción entre NOSe y caveolina provocando un aumento de su actividad enzimática (Michel y cols., 1997).

Este incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  que se observa cuando se estimula la célula endotelial por un agonista o por un estímulo mecánico se produce en dos fases. En la primera, se registra un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  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 y cols., 1987; Buchan y Martín, 1991), y la fase de meseta se debe a la entrada mantenida del ión desde el medio extracelular (Dolor y cols., 1992). El  $\text{Ca}^{2+}$  liberado desde el RS condiciona la apertura de distintos canales iónicos. Inicialmente se produce una despolarización transitoria de la membrana por salida de  $\text{Cl}^-$  (Song y Davis, 1994) que viene seguida de una hiperpolarización por la salida de  $\text{K}^+$ . Estas dos corrientes iónicas facilitan a su vez

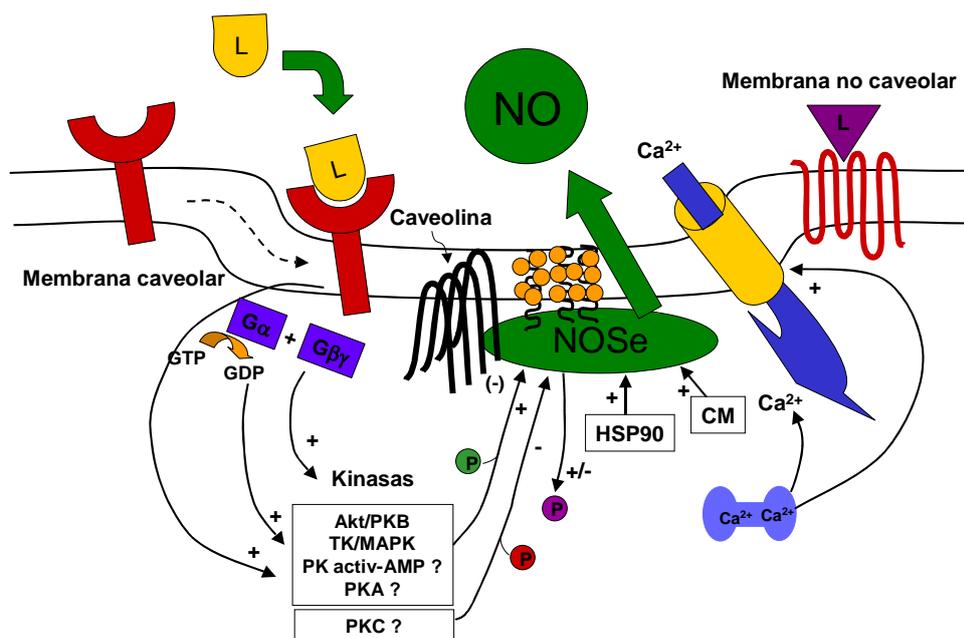
la apertura de canales catiónicos no específicos que permiten la entrada mantenida de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio intracelular (Lansman y cols., 1987; Bregestovski y cols., 1988; Mendelowitz y cols., 1992). Puede, por tanto, considerarse que el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado inicialmente desde el RS sería el mensajero intracelular que regularía la entrada de este ión desde el exterior. En consecuencia, tanto la elevación citosólica inicial de  $\text{Ca}^{2+}$  causada por la salida de este ión desde el RS, como su entrada mantenida desde el medio extracelular, son esenciales para la síntesis de NO.

b) La activación de la NOSe 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  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Ayajiki y cols., 1996; Fleming y cols., 1999). Este proceso está regulado por canales de  $\text{K}^+$  y se previene por inhibición de tirosín kinasa, lo que indica que se requiere fosforilación de residuos de tirosina de la NOSe (Ayajiki y cols., 1996). Sin embargo, la dependencia de fosforilación de tirosina no se limita a mecanismos independientes de  $\text{Ca}^{2+}$  puesto que también es necesaria para la activación de la NOSe por agonistas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como el estradiol y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Papapetropoulos y cols., 1997; Chen y cols., 1999a).

Además de la regulación por calcio y por la fosforilación de tirosina, múltiples proteín kinasas modifican la actividad de la NOSe mediante la fosforilación en la serina situada en posición 1177. Entre estas kinasas se incluyen la proteín kinasa activada por AMP, PKC, proteín kinasa dependiente de AMPc (PKA) y serín/treonín kinasa Akt, también conocida por proteín kinasa B (PKB). Los factores que activan la NOSe a través de la fosforilación de la Ser-1177 mediada por PKB son el estradiol (Hisamoto y cols., 2001), el VEGF (Fulton y cols., 1999) y el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (Michell y cols., 1999). Por el contrario, la fosforilación de la treonina en posición 497 atenúa la actividad NOSe (Chen y cols., 1999c). Estudios recientes demuestran que las señales a través de la PKA conducen a la fosforilación de Ser-1177 y la defosforilación de Thr-497, lo que aumenta su actividad enzimática,

mientras que la PKC promueve la defosforilación de la Ser-1177 y la fosforilación en la Thr-497 reduciéndose la actividad NOSe.

En definitiva, observamos como la actividad NOSe está regulada por una compleja combinación de interacciones proteína-proteína y cascadas de transducción de señales que implican movilización de calcio y fosforilación (Figura 3).



**Figura 3.** Mecanismos que regulan la actividad de la NOSe. La estimulación de la NOSe se inicia cuando un ligando (L) se une a los receptores de la membrana plasmática, que pueden residir en la caveola o ser movilizados a la caveola tras su activación. La activación de los receptores conduce a la estimulación de múltiples vías mediadas por proteínas kinasas. La fosforilación provoca la estimulación de la NOSe (+) o su inactivación (-) dependiendo de las kinasas que estén implicadas y los lugares de fosforilación de la NOSe. La defosforilación puede ser también estimuladora o inhibitoria. La activación de la NOSe requiere la unión de calcio-calmodulina (CM); el calcio proviene de depósitos intracelulares que están próximos a la membrana caveolar, o del flujo de calcio desde el exterior. La unión de la HSP90 estimula la NOSe mientras que su unión a la caveolina la inhibe.

A diferencia de lo que ocurre con las isoenzimas constitutivas de la NOS, la actividad NOSi es independiente de  $[Ca^{2+}]_i$ . Aunque la NOSi contiene un lugar de unión para el  $Ca^{2+}$ /calmodulina la afinidad tan elevada de este lugar por su ligando hace que la NOSi se active incluso cuando existen valores muy bajos, de  $[Ca^{2+}]_i$  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 subyacentes. Una vez en el citoplasma, provoca activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs), con el consiguiente aumento de los niveles intracelulares de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y vasodilatación (Martín y cols., 1988; Moncada y Higgs, 1991).

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

### **Factor hiperpolarizante derivado de endotelio**

En diversos vasos sanguíneos, las relajaciones dependientes de endotelio pueden estar acompañadas por una hiperpolarización de las CMLV (Bolton y cols., 1984; Feletou y Vanhoutte, 1988; Taylor y cols., 1988; Chen y cols., 1988; Huang y cols., 1988). Estas hiperpolarizaciones y relajaciones dependientes de endotelio pueden ser parcial o totalmente resistentes a inhibidores de COXs y NOSs (Nagao y Vanhoutte, 1992; Garland y McPherson, 1992) y pueden suceder sin un incremento en las CMLV de niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos (Taylor y cols., 1988; Cowan y Cohen, 1991; Mombouli y cols., 1992). 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 y cols., 2001).

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

La naturaleza química de FHDE aún no ha sido definitivamente identificada. 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 y cols., 1989), productos del citocromo P450, concretamente el ácido epoxieicosatrienoico (Gebremedhin y cols., 1992; Vanhoutte,

1993; Cohen y Vanhoutte, 1995; Campbell y cols., 1996). También se ha propuesto como FHDE a un ligando endógeno de los receptores de cannabinoides, la anandamida (Randall y Kendall, 1998) y a los iones  $K^+$  (Edwards y cols., 1998) y el  $H_2O_2$  (Shimokawa y Matoba, 2004). Recientemente se ha identificado el péptido natriurético tipo C como FHDE, 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).

### **1.2.2.b. Factores contractores derivados del endotelio**

Los principales agentes vasoconstrictores producidos por el endotelio son la ET-1 y los metabolitos derivados del AA como el  $TXA_2$  y  $PGH_2$ .

#### **Endotelina**

La 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, la distribución de los receptores de ET se extiende a lo largo del 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 y cols., 1994, Teerlink y cols., 1994). Además de estos efectos, la ET-1 promueve la proliferación de las células del endotelio y la de las CMLV y fibroblastos. Esto se traduce en cambios

estructurales de la pared vascular (Hirata y cols., 1988; Simonson y cols., 1989; Bobik y cols., 1990; Golfman y cols., 1993).

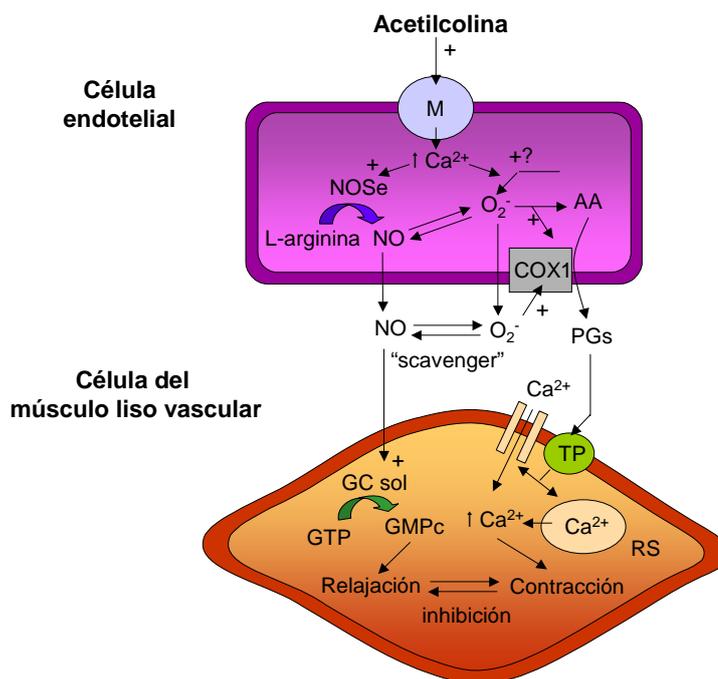
La producción de ET-1 por las células endoteliales está regulada en el proceso de síntesis del péptido, pero no en su liberación, ya que la célula endotelial no tiene gránulos de reserva donde la ET-1 sea almacenada y posteriormente liberada. Sin embargo, existen indicios de que la ET-1 preformada pueda 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  $Ca^{2+}$ -dependiente en dicha estimulación, inhibiéndose la expresión de la ET-1 en presencia de inhibidores de la PKC y quelantes de calcio (Emori y cols., 1991). Otros factores que también disminuyen la expresión del gen de la ET-1 son el NO (Boulangier y Luscher, 1990; Warner y cols., 1992), los péptidos natriuréticos (Kohno y cols., 1992; Emori y cols., 1993), que elevan el GMPc y disminuyen la actividad de la PKC, y la heparina (Imai y cols., 1993; Yokokawa y cols., 1993). Por otra parte, el factor fisiológico que juega un 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 (Miller y Burnett, 1992; Kuchan y Frangos, 1993).

## **Tromboxano A<sub>2</sub> y prostaglandina H<sub>2</sub>**

Otros factores vasoconstrictores derivados del endotelio son algunos metabolitos del AA como el TXA<sub>2</sub> o un endoperóxido cíclico inestable, la PGH<sub>2</sub>, con el que comparte receptor. La COX cataliza la formación de endoperóxidos cíclicos tales como prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) y PGH<sub>2</sub> 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 PGH<sub>2</sub> se forma sobre todo PGI<sub>2</sub>, que tiene actividad vasodilatadora además de antiagregante. En los sujetos hipertensos estos pasos metabólicos pueden estar alterados existiendo un incremento en la producción de PGH<sub>2</sub> que tiene actividad vasoconstrictora y que puede así mismo convertirse en otro compuesto vasoconstrictor, el TXA<sub>2</sub>. Ambos, el TXA<sub>2</sub> y la PGH<sub>2</sub> ejercen su efecto al interactuar con el receptor 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<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> que tiene dos consecuencias. Primero, la actividad NOSe se incrementa y el NO formado difunde a las CMLV subyacentes, tal como hemos explicado en el apartado anterior. Segundo, el aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> también estimula la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> de fuentes no identificadas. Dependiendo de la cantidad de NO, que reaccione con O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Rubaniyi y Vanhoutte, 1986) una mayor o menor cantidad de O<sub>2</sub><sup>-</sup> puede difundir fuera de la célula endotelial. El O<sub>2</sub><sup>-</sup> intracelular, aunque también el extracelular, estimulan a la COX-1 para transformar el AA en endoperóxidos que difunden hacia las CMLV provocando contracción (Vanhoutte y cols., 2005) (Figura 4).



**Figura 4.** Representación esquemática de los sucesos ocurridos tras la estimulación con acetilcolina de la aorta procedente de SHR. AA=ácido araquidónico; GMPc=GMP cíclico; COX1=ciclooxigenasa 1; M=receptor muscarínico; NO=óxido nítrico; NOSe=óxido nítrico sintasa endotelial;  $O_2^-$ =aniones superóxido; PGs=endoperóxidos; GC sol=guanilato ciclasa soluble; RS=retículo sarcoplásmico; TP=receptores TP; +=activación; ?=lugar de formación desconocido.

### 1.2.3. Hemostasis y coagulación

El endotelio participa en el mecanismo de la coagulación mediante la liberación de factores 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 y fibrinolítica que permite el mantenimiento de la

fluidez sanguínea y evita sucesos trombóticos. Así, la liberación endotelial de NO y PGI<sub>2</sub> inhibe la adhesión y la agregación plaquetaria a través del aumento respectivo de la concentración intraplaquetaria de GMPc y AMPc. Además, las células endoteliales producen ectonucleotidasas, que son enzimas que defosforilan ADP (agente proagregante) a AMP y luego adenosina, inhibiendo la agregación plaquetaria (Marcus y cols., 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 TXA<sub>2</sub>, la fibronectina, el factor V y el inhibidor del tPA (Galley y Webster, 2004, Landmesser y cols., 2004).

#### **1.2.4. 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 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, migración y formación del lumen vascular (Ziche y Morbidelli, 2000; Conway y cols., 2001).

### **1.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL**

#### **1.3.1. Concepto**

El endotelio juega un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis circulatoria. Ello es debido a que este tejido responde a señales químicas y hormonales, así como a los cambios hemodinámicos producidos por las modificaciones del flujo sanguíneo, con la liberación de mediadores que modulan la respuesta de los miocitos lisos vasculares, las plaquetas y los leucocitos. Su funcionamiento, sin embargo, puede alterarse en situaciones patológicas.

La disfunción endotelial podría definirse como un desequilibrio entre la síntesis, la liberación o el efecto de los factores endoteliales capaces de relajar el músculo liso vascular y las sustancias vasoconstrictoras que pueden sintetizarse en las células de este tejido. Este desequilibrio se manifiesta con una reducción en 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, la comprensión mayor del término disfunción del endotelio, incluiría no sólo la vasodilatación reducida sino también un estado proinflamatorio y protrombótico asociado a la misma.

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

### 1.3.2. Enfermedad cardiovascular y disfunción endotelial

La disfunción endotelial se describió por primera vez en la hipertensión humana en la vasculatura del antebrazo en 1990 (Panza y cols., 1990). 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 y cols., 2001; Schiffrin y cols., 2000). En pacientes con hipertensión esencial en un estado I, se ha demostrado que ~60% exhiben pérdida de vasodilatación en arterias pequeñas cuando se estudia este hecho *in vitro* en vasos diseccionados de biopsias subcutáneas gluteales (Park y cols., 2001). Si bien, es bien conocido que la disfunción endotelial se produce con independencia a si la etiología es primaria o secundaria a factores etiológicos renales o endocrinos (Rizzoni y cols., 1998).

La hipertensión tiene una influencia directa en la función vascular independiente de otros factores de riesgo cardiovasculares. Ward y cols. (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 y cols., 2002). La hipertrofia ventricular izquierda asociada a la hipertensión, tiene un efecto negativo adicional sobre la función endotelial (Ercan y cols., 2003). En un subestudio del LIFE (Olsen y cols., 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 y cols. (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 y cols., 2003) y tipo II (Rizzoni y cols., 2001; Schofield y cols., 2002; Endemann y cols., 2004), la enfermedad arterial coronaria (Monnink y cols., 2002), la insuficiencia cardíaca congestiva (Landmesser y cols., 2002) y la insuficiencia renal crónica (Bolton y cols., 2001; Thambyrajah y cols., 2000; Yildiz y cols., 2003). Además, esta manifestación de 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 y cols., 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 y cols., 2000).

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

### **1.3.3. 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, inhibición de la respuesta inflamatoria y de la agregación plaquetaria y supresión 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 reducción 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 la dimensión de los mecanismos de disfunción endotelial es compleja, analizaremos algunos de estos factores comunes en la mayoría de las condiciones patológicas.

### **Óxido nítrico**

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

Como ya mencionamos, la característica esencial de la disfunción endotelial es la pérdida de vasodilatación dependiente de endotelio que se ha relacionado con la reducción de NO. Ésta puede deberse a una reducida expresión y/o actividad de la NOSe (consecuencia de inhibidores endógenos o exógenos o reducción de la disponibilidad de su sustrato, L-arginina) y a una disminuida biodisponibilidad de NO.

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

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) destruyen el NO formando peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>) (Koppenol y cols., 1992), oxidantes citotóxicos que a través

de la nitración de proteínas afectarán a su función y por tanto a la función endotelial. Los ONOO<sup>-</sup> son importantes mediadores de oxidación de LDL, acentuando su papel aterogénico (Griendling y FitzGerald, 2003). Además, conducen a la degradación del cofactor de la NOSe, BH<sub>4</sub>, (Milstien y Katusic, 1999) lo que lleva a un “desacoplamiento” de la NOSe, como se tratará posteriormente. Mediante el uso de un catalizador de descomposición de ONOO<sup>-</sup> FP15, se pudo prevenir la disfunción endotelial y cardíaca en ratones diabéticos (Szabo y cols., 2002). El exceso de oxidantes también produce una reducción de la BH<sub>4</sub> con un incremento consiguiente de BH<sub>2</sub>. Cuando esto ocurre, la formación del dímero activo de la NOSe con actividad oxigenasa y formación de NO está limitada (desacoplamiento de la NOSe). La función reductasa de la NOSe se activa y se forma más ERO, con el consecuente aumento del estrés oxidativo y el deterioro de la función endotelial y vascular (Landmesser y cols., 2003). El estrés oxidativo está unido al estado proinflamatorio de la pared de los vasos ya que las ERO regulan al alza las moléculas de adhesión (moléculas de adhesión a las células vasculares [VCAM-1], moléculas de adhesión intercelular [ICAM-1]) y quimiotácticas (péptido-1 quimioattractante de macrófagos [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 NOSe (Venugopal y cols., 2002; Verma y cols., 2002).

Los nuevos avances en la regulación de la función endotelial se centran en el estudio de las caveolas y caveolinas y su implicación en la regulación de la NOSe. Se ha sugerido que la causa de la disfunción endotelial e hipertensión inducida por la 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 NOSe (Lungu y cols., 2004). Sindhu y cols. (2004) encontraron que el fallo renal crónico inducía un aumento en la caveolina-1 en el 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.

### **Dimetilarginina asimétrica**

La ADMA es un inhibidor endógeno competitivo de la NOSe que se ha vinculado a la disfunción endotelial. Se ha demostrado que está incrementada en pacientes con hipertensión (Kielstein y cols., 2003) y que existe una fuerte correlación entre los niveles sanguíneos de ADMA y el empeoramiento de la vasodilatación dependiente de endotelio, y la morbilidad y mortalidad cardiovascular (Fliser y cols., 2003).

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

Recientemente, Takiuchi y cols. (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 principal en la disfunción endotelial, independientemente de la resistencia a la insulina o de la hipertrofia ventricular izquierda. Kielstein y cols. (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 NOSe, y reduce la presión arterial (Dayoub y cols., 2003), subrayando la importancia fisiopatológica de la ADMA. También se ha demostrado que la proteína arginina metiltransferasa, que produce argininas metiladas, principalmente la metiltransferasa-

1, está regulada al alza por las fuerzas de cizallamiento, y esta sobre-regulación se asoció con la generación elevada de ADMA (Osanaí y cols., 2003).

La hipercolesterolemia es un factor de riesgo para la aterosclerosis que está asociada a la disfunción endotelial (Kawano y cols., 2002). Actualmente, existen evidencias que asocian la hipercolesterolemia con los niveles de ADMA elevados (Boger y cols., 1998). También están aumentados en pacientes hipertensos de edad avanzada (Kielstein y cols., 2003) y se correlacionan con la edad y la presión arterial (Miyazaki y cols., 1999). Se ha asociado los niveles de ADMA al incremento de factores de riesgo cardiovascular en el fallo renal, tales como un aumento de proteína C reactiva, el grosor intima-media de la carótida, la hipertrofia ventricular izquierda y la disfunción ventricular izquierda (Miyazaki y cols., 1999, Zoccali y cols., 2002a,b). Además, es un predictor de sucesos coronarios agudos (Valkonen y cols., 2001), mortalidad total de pacientes con fallo renal crónico (Zoccali y cols., 2001) y mortalidad de pacientes enfermos críticos (Nijveldt y cols., 2003).

### **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 y Vanhoutte, 1986; Luscher y cols, 1990) contrarrestando los efectos de los factores relajantes derivados de endotelio. Estas contracciones pueden prevenirse con inhibidores selectivos de la COX-1 (Ge y cols., 1995; Yang y cols., 2002), restaurándose así la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio (Luscher y Vanhoutte, 1986). En las SHR, además, la administración de indometacina, inhibidor de la COX, reduce los niveles de presión arterial una vez establecida la hipertensión (Luscher y cols, 1990). Existe paralelismo entre los estudios en animales hipertensos y los realizados en humanos por Taddei y cols. (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 y cols., 2003).

La expresión de la COX-1 es mayor en aortas de SHR adultas que en WKY (Ge y cols., 1995). Esta enzima, presuntamente unida a la membrana de las células endoteliales, transforma el AA en endoperóxidos, que difunde a las CMLV para activar al receptor TP (Yang y cols., 2003). Ge y cols. (1995, 1999) 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 TXA<sub>2</sub>, agonista del receptor TP. Es la PGH<sub>2</sub> la mediadora de la contracción dependiente de endotelio. De hecho, se comprobó que la ACh provoca un aumento en la liberación de PGH<sub>2</sub> en SHR pero no en WKY (Ge y cols., 1995).

Además, la reducida disponibilidad del NO, característica de la disfunción endotelial, aumenta la amplitud de las contracciones dependientes de endotelio, al igual que el aumento de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, que estimula la COX-1 (Yang y cols. 2002; Yang y cols., 2003). Todos estos datos indican que en las SHR la hipertensión está asociada al aumento en la producción y del efecto de estos endoperóxidos.

### **Estrés oxidativo**

Las células endoteliales vasculares sanas metabolizan el oxígeno y generan ERO potencialmente nocivas. Normalmente, la media de formación de oxidantes está equilibrada con la media de eliminación (Touyz, 2004; Ogita y Liao, 2004). En la disfunción endotelial, existe un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes originándose el estrés oxidativo, que es el resultado patogénico de la sobreproducción de oxidantes que excede la capacidad antioxidante celular. Muchas condiciones patológicas incrementan las ERO en la pared de los vasos, incluyendo la

hipercolesterolemia, la diabetes y la hipertensión, patologías asociadas a la disfunción endotelial.

Las ERO incluyen,  $O_2^-$ , radical hidroxilo y radicales lipídicos, que poseen electrones desapareados por lo que se clasifican como radicales libres. Sin embargo,  $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$  y ácido hipocloroso, no son radicales libres pero tienen propiedades oxidantes y contribuyen al estrés oxidativo.

Las ERO se han asociado a modelos de hipertensión experimental. Estos modelos están frecuentemente inducidos por la estimulación del sistema renina-angiotensina: infusión 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. En estos modelos, las ERO y los marcadores de la oxidación, (nitración de residuos de tirosina de proteínas, 8-isoprostaglandina  $F_{2\alpha}$ , malonildialdehído y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico) están incrementados en vasos, corazón y riñones (Guo y cols., 2003; Chabrashvili y cols., 2003; Lassegue y Clempus, 2003).

Los modelos de hipertensión con bajos niveles de renina y angiotensina se obtienen, por ejemplo, mediante la infusión de ET-1 o por nefrectomía unilateral y administración de deoxicorticosterona y dieta rica en sal (DOCA-sal). En estos modelos, también se eleva la producción de  $O_2^-$  vascular y los marcadores de estrés oxidativo (Li y cols., 2003a,b,c; Sedeek y cols., 2003, Zheng y cols., 2003). Por tanto, en muchos modelos experimentales, la hipertensión está asociada con una elevada producción de ERO.

La abundancia de ERO puede deberse a un aumento de su producción o a una menor degradación. Las fuentes más importantes de ERO en el endotelio son la NAD(P)H oxidasa, xantina oxidasa y NOSe desacoplada.

Numerosos estudios han identificado una oxidasa asociada a la membrana como la principal fuente de ERO en los vasos humanos, situada en el endotelio, capa media y adventicia (Griendling y cols., 2000). Esta oxidasa dependiente de NADPH está formada por múltiples subunidades. En el sistema cardiovascular, las principales

subunidades catalíticas son nox1, gp91phox (nox2) y nox4 y sus subunidades reguladoras p22phox, p40phox, p47phox, p67phox y rac (Lassegue y Clempus, 2003; Touyz y cols., 2002). Las subunidades nox y p22phox están localizadas en la membrana mientras que el resto de componentes se encuentran en el citosol. Cuando se estimula, especialmente por Ang II, las subunidades phox citosólicas se fosforilan y todo el complejo citosólico migra a la membrana.

La NAD(P)H oxidasa ejerce un papel clave en la hipertensión. Las subunidades phox están reguladas al alza en las células endoteliales y en las CMLV de pequeños vasos expuestos a Ang II (Touyz y cols., 2002; Gragasin y cols., 2003; Touyz y cols., 2003). Li y Shah (2003) estudiaron el papel de la subunidad p47phox en la regulación de la NAD(P)H oxidasa y observaron que la producción de ERO se reduce por la transfección de moléculas antisentido de p47phox, se suprime por la delección del gen p47phox y se recupera mediante su expresión. De forma similar, en las CMLV expuestas a presión, la nox1 está regulada al alza y el incremento de ERO originado se reduce al impedir el ensamblaje del p47phox (Grote y cols., 2003). También *in vitro*, se demostró que la producción de  $O_2^-$  de vasos expuestos a ET-1 o aislados de animales DOCA-sal o SHR, se reduce por la apocinina, inhibidor del ensamblaje de la oxidasa (Li y cols., 2003a,b; Zheng y cols., 2003). *In vivo*, el gp91phox está regulado al alza en el riñón e hígado después de la nefrectomía (Vazire y cols., 2003). También se ha podido comprobar como la infusión de Ang II y la sobreexpresión de renina regulan al alza la subunidad nox1 en vasos y corteza renal (Chabrashvili y cols., 2003; Lassegue y Clempus, 2003).

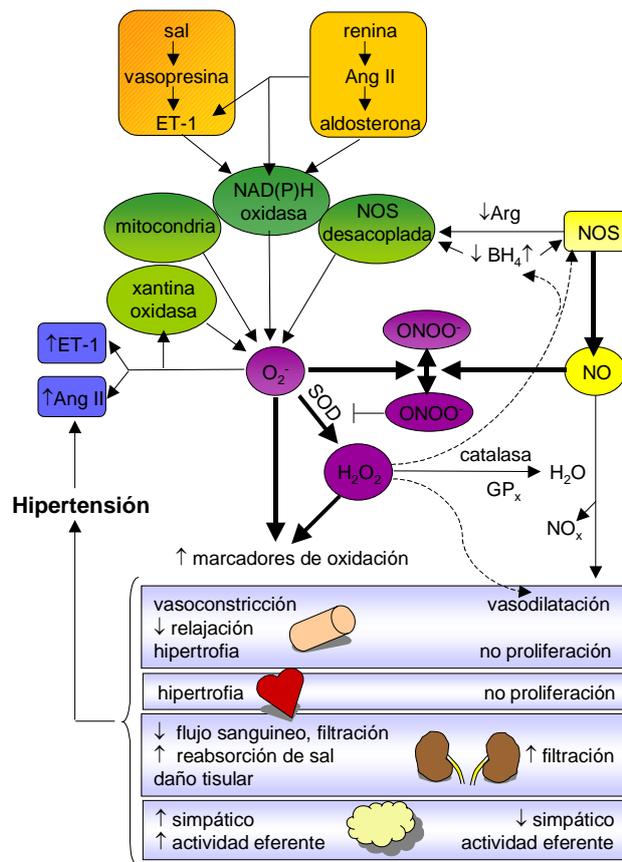
Otra fuente importante de ERO es la xantina oxidasa. Existen estudios que indican que los inhibidores de la xantina oxidasa, oxipurinol o alopurinol, mejoran la disfunción endotelial (Cardillo y cols., 1997; Mervaala y cols., 2001; Butler y cols., 2000).

Nuestro organismo posee mecanismos de defensa antioxidantes, cuya alteración también contribuye al estrés oxidativo (Redon y cols., 2003). La superóxido dismutasa (SOD) convierte el  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  que es más tarde degradado a agua por la catalasa o

glutathion peroxidasa ( $GP_x$ ). La infusión de Ang II disminuye la expresión de SOD extracelular en riñón (Chabrashvili y cols., 2003). Se ha podido comprobar como la actividad de CuZn-SOD y MnSOD es más baja en vasos y riñón de animales sometidos a nefrectomía parcial (Vaziri y cols., 2003), Dahl sensibles a sal, estenosis arterial renal y DOCA-sal (Awe y cols., 2003). Además, la actividad MnSOD disminuye en el riñón por la infusión de Ang II debido a la nitración de tirosina (Guo y cols., 2003). De forma semejante, la catalasa y  $GP_x$  disminuyen tras la estenosis renal. La catalasa aórtica también está regulada a la baja en ratones genéticamente hipertensos (Uddin y cols., 2003). Por tanto, en estos modelos animales, la menor actividad de las enzimas antioxidantes endógenas contribuye a la elevación de ERO.

El NO generado por el endotelio reacciona con el  $O_2^-$  a una velocidad superior a la SOD. Por tanto, un incremento de la producción de aniones  $O_2^-$  podría ser la causa de una reducida biodisponibilidad de NO y una menor relajación dependiente de endotelio.

Las ERO no sólo participan en la disfunción endotelial hipertensiva sino que colaboran en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión. Así el  $O_2^-$  puede inducir vasoconstricción (Gonzalez-Pacheco y cols., 2002; Grover y cols., 2003), hipertrofia vascular (Wedgwood y Black, 2003; Lassegue y Clempus, 2003) y miocárdica (Delbosc y cols., 2002; de Andrade y cols., 2002), disminución de la función renal (Welch y Wilcox, 2001; Seedek, y cols., 2003) y puede 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 FHDE (Figura 5).



**Figura 5.** Principales vías que conducen a la hipertensión mediante la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Agentes como la sal, vasopresina, endotelina-1 (ET-1), renina, angiotensina II (Ang II) o aldosterona, directa o indirectamente, aumentan el nivel de ERO, como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>) en tejidos diana. Estos agentes incrementan la producción de  $O_2^-$  a través de la NAD(P)H oxidasa, la óxido nítrico sintasa (NOS) desacoplada, la xantina oxidasa y la mitocondria. La NOS puede desacoplarse por la disminución de la biodisponibilidad de su sustrato, la L-arginina (Arg), o su cofactor, la tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ). En presencia del sustrato y del cofactor, la NOS genera óxido nítrico (NO), un potente antihipertensivo, a menudo medido a través de sus metabolitos, los nitratos y nitritos ( $NO_x$ ). La abundancia relativa de  $O_2^-$  y NO, denominado “balance  $O_2^-/NO$ ”, determina la proporción de NO que se degrada por el  $O_2^-$  para formar los nocivos ONOO<sup>-</sup>. Estas ERO nitrán proteínas en restos de tirosina, son responsables del desacoplamiento de la NOS e inhiben la superóxido dismutasa (SOD). La SOD convierte el  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  que es degradada a agua por la catalasa o la glutatión peroxidasa (GP<sub>x</sub>). El  $H_2O_2$  puede incrementar la actividad NOS directamente o mediante el incremento de la síntesis de  $BH_4$  y actúa como factor relajante derivado del endotelio. El  $O_2^-$  y sus metabolitos inducen vasoconstricción, hipertrofia vascular y cardíaca, disminución de la función renal e incremento de la actividad simpática del sistema nervioso central. Todos estos efectos, antagonizados por el NO, conducen a hipertensión.

### **Hiperhomocisteinemia**

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

#### **1.3.4. Valor pronóstico de la disfunción endotelial**

Puesto que la disfunción endotelial es un suceso temprano, anterior a cambios estructurales en la pared de los vasos (Davignon y Ganz, 2004), puede ser de valor pronóstico, prediciendo sucesos cardiovasculares (Perticone y cols., 2001; Quyyumi, 2003).

La disfunción endotelial en arterias coronarias se ha asociado a sucesos cardiovasculares en pacientes con y sin enfermedad coronaria manifiesta (Schachinger y cols., 2000; Suwaidi y cols., 2000; Halcox y cols., 2002). La disfunción endotelial de la vasculatura periférica también tiene valor pronóstico. La realización de test de disfunción endotelial no invasivos predijeron sucesos cardiovasculares en pacientes

con enfermedad arterial periférica (Gokce y cols., 2003), hipertensión (Perticone y cols., 2001) y en pacientes que no sufrían daño vascular (Gokce y cols., 2002). A continuación se comentan algunos de los últimos estudios que otorgan importancia al valor pronóstico de la disfunción endotelial.

Perticone y cols. (2001) demostraron en pacientes hipertensos que la disfunción endotelial, ensayada por el test de ACh, es un marcador de futuros sucesos cardiovasculares para esta población. 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 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 y cols., 2004).

Bugiardini y cols. (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, y 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 considerado un factor pronóstico para el riesgo de desarrollo de hipertensión en mujeres postmenopáusicas. En un estudio realizado en mujeres sanas postmenopáusicas y normotensas, Rossi y cols. (2004) demostraron que mujeres con disfunción endotelial tenían una mayor probabilidad de desarrollar hipertensión.

### **1.3.5. Tratamiento de la disfunción endotelial**

Como ya se ha comentado, la disfunción endotelial está presente en muchas formas de enfermedad cardiovascular. 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 y cols., 2003).

En la hipertensión, la reducción de la presión arterial *per se*, no parece restaurar la función endotelial puesto que la terapia antihipertensiva mejora la disfunción endotelial pero no en todos los casos. Así, los  $\alpha$ - y  $\beta$ -bloqueantes adrenérgicos no tienen efecto directo sobre la disfunción endotelial (Nadar y cols., 2004), aunque el tratamiento con carvedilol, fármaco perteneciente a la tercera generación de  $\beta$ -bloqueantes, inhibe el estrés oxidativo (Yasunari y cols., 2004). Los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, los antagonistas del receptor de Ang II y los bloqueantes de canales de calcio, mejoran la disfunción endotelial en pacientes hipertensos (Nadar y cols., 2004; Schiffrin, 2004). Schiffrin y cols. (2002a) mostraron que en pacientes con hipertensión esencial, el cambio del  $\beta$ -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  $\beta$ -bloqueante atenolol, que ejercía el mismo control sobre la presión arterial, no (Schiffrin y cols., 2002b). Los antagonistas del receptor de Ang II y los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina 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 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)- $\gamma$  (p.ej. ciglitazonas) reducen la presión arterial y mejoran la función endotelial en ratas obesas Zucker (Pershad Singh y cols., 1993).

Otra posibilidad para el tratamiento de la disfunción endotelial es actuar sobre los componentes de la enfermedad que conducen a la disfunción del endotelio. Por tanto, la disminución de los niveles de homocisteína en la hiperhomocisteinemia mediante la suplementación con ácido fólico mejora la disfunción endotelial (Bennet-Richards y cols., 2002; Zhang y cols., 2000). El tratamiento oral con L-arginina, precursor de NO, reduce la presión arterial y mejora la función endotelial (Palloshi y cols., 2004). La BH<sub>4</sub> y sus análogos (Hyndman y cols., 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 y cols., 2002). También, se ha demostrado que las estatinas mejoran la disfunción endotelial en modelos animales de hipertensión (Zhou y cols., 2004) y en pacientes hipertensos con niveles normales de colesterol (Danaoglu y cols., 2003) facilitando la activación de la NOSe e inhibiendo el estrés oxidativo. El tratamiento a largo plazo con las vitaminas antioxidantes C y E también mejoran la disfunción endotelial *in vivo* (Kinlay y cols., 2004).

## **2. ISOFLAVONAS Y FUNCIÓN ENDOTELIAL**

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

Las isoflavonas son compuestos no esteroideos de origen vegetal que se encuentran en la dieta. La estructura de las isoflavonas se asemeja a la del estrógeno endógeno lo que les concede capacidad de unirse al receptor estrogénico (RE)  $\alpha$  y  $\beta$  pero con mucha menos afinidad que el estradiol. Las isoflavonas pueden competir con el estradiol por la unión al RE $\beta$  y una vez unidas pueden incrementar la expresión de genes de respuesta estrogénica (Miksicek, 1995). Debido a su capacidad de ejercer actividad estrogénica, nos referimos a las isoflavonas y a compuestos relacionados como fitoestrógenos.

Los fitoestrógenos se clasifican en isoflavonas, cumestanos y lignanos. Estas sustancias se encuentran en gran cantidad de alimentos de origen vegetal, más concretamente el grupo de las isoflavonas se encuentra predominantemente en la soja y productos derivados de la soja (Knight y Eden, 1996). Las principales isoflavonas son la genisteína, daidzeína y gliciteína que en su estado natural se encuentran como glucósidos (Sirtori, 2001).

Los efectos estrogénicos de las isoflavonas se reconocieron por primera vez debido a la pérdida de fertilidad de los animales que consumían trébol rojo (Bennetts y cols., 1946; Setchell y cols., 1987; Hsieh y cols., 1998). Esta planta contiene gran cantidad de biochanina A y formononetina, precursores metilados de genisteína y daidzeína. Estudios posteriores demostraron que éstos y otros fitoestrógenos interaccionan con los REs  $\alpha$  y  $\beta$ , debido a su estructura similar al 17 $\beta$ -estradiol (Cornwell y cols., 2004). Las isoflavonas son potentes agonistas del RE $\beta$  y débiles agonistas del RE $\alpha$ , por tanto, ejercen efectos estrogénicos principalmente en los tejidos que expresan sobre todo RE $\beta$ , como el hueso y el sistema cardiovascular (Enmarck y cols., 1997; Onoe y cols., 1997; Makela y cols., 1999). Por el contrario, el

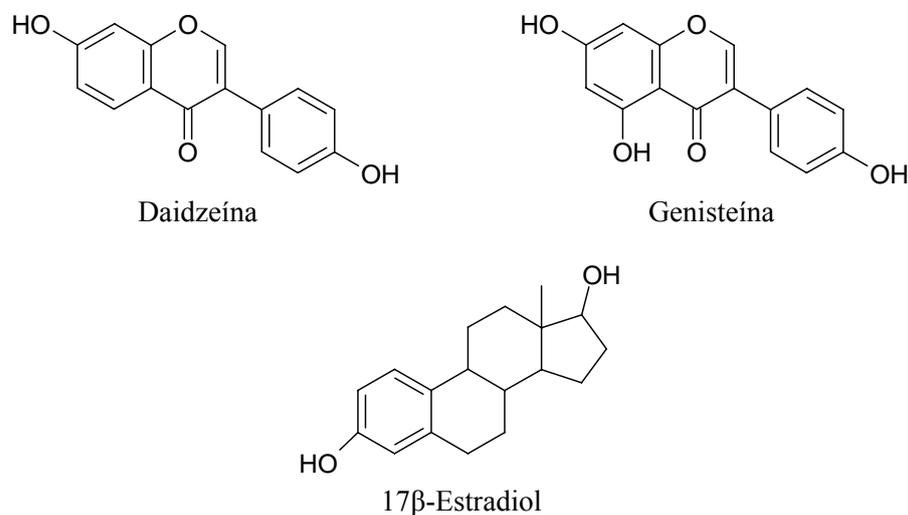
estrógeno natural tiene la misma afinidad por ambos receptores. A menudo se les considera SERMS (Setchell y cols., 2001), moduladores selectivos del RE. Este término describe a un grupo de compuestos que funcionan como agonistas del RE en algunos tejidos pero en otros poseen acciones opuestas al estrógeno, ejerciendo propiedades agonistas/antagonistas dependiendo del tejido (McDonnell y cols., 2002). Pero siguiendo esta estricta definición es cuestionable el que los fitoestrógenos se engloben bajo este término puesto que su selectividad tisular se explica por su diferente afinidad hacia el RE $\alpha$  y RE $\beta$  y su distribución en los tejidos (Cassidy, 1999).

La soja es el componente esencial de la dieta para la población asiática, por tanto, la soja y sus componentes, como la genisteína y la daidzeína, son ampliamente consumidos sin aparentes efectos adversos. De hecho, existe un interés considerable en la soja y sus componentes, como la genisteína, por sus potenciales efectos quimiopreventivos basados en muchos estudios epidemiológicos que sugieren una reducción del índice de cáncer asociada a la alimentación basada en la soja, cánceres como el de mama, próstata y colon. También se muestra interés en la soja para la prevención de diversas enfermedades como la osteoporosis, hipercolesterolemia, síntomas menopáusicos, aterosclerosis y enfermedades cardíacas, donde el consumo de soja también produce efectos beneficiosos (Goldwyn y cols., 2000; Suthar y cols., 2001a,b).

## **2.2. ESTRUCTURA QUÍMICA**

Los fitoestrógenos genisteína (4',5,7-trihidroxi-isoflavona) y daidzeína (4',7-dihidroxi-isoflavona) son estructuralmente muy similares, difieren sólo en la sustitución de la posición 5 y ambas muestran similitud con el 17 $\beta$ -estradiol (Figura 6). Si bien, aunque las dos isoflavonas interaccionan con el RE $\beta$ , la genisteína es de 10 a 100 veces más potente que la daidzeína (Kuiper y cols., 1998) y además es un

inhibidor bien conocido de una amplia variedad de tirosín kinasas (Ogawara y cols., 1989) mientras que la daidzeína carece de esta actividad.



**Figura 6.** Estructura química de las isoflavonas, genisteína y daidzeína, comparada con la del 17β-estradiol.

Algunas características estructurales de los fitoestrógenos son necesarias para la actividad estrogénica. Un núcleo flavonoide con 2-4 grupos hidroxilo en ciertas posiciones es esencial para la estrogeneidad, pues la metilación de estos grupos disminuye sus efectos estrogénicos. Las isoflavonas tienen mayor actividad estrogénica que otros flavonoides debido a la posición del anillo bencilo (Rosenberg y cols., 2000). En ensayos de competición se demostró que los glucósidos de genisteína y daidzeína muestran una unión más débil al RE $\alpha$  y RE $\beta$  que las geninas. Los metabolitos de estas sustancias, como la dihidrogenisteína o el equol tienen una afinidad semejante (Morito y cols., 2001).

Se ha demostrado que de las 4 isoflavonas, genisteína, daidzeína y sus precursores, biochanina A y formononetina, la genisteína es la de mayor actividad sobre ambos RE.

### **2.3. FARMACOCINÉTICA**

El consumo de isoflavonas en el Este y Sudeste asiático es de 20-50 mg/día (Nagata y cols., 1997; Chen y cols., 1999b), mientras que en los países occidentales es mucho más bajo. En Europa oscila entre 0,63 y 1 mg/día para los hombres y 0,49 y 0,66 mg/día para las mujeres (Kiely y cols., 2003; Van Erp-Baart y cols., 2003). Si bien, el consumo de soja está aumentando al considerarse beneficioso para la salud.

Las isoflavonas se ingieren principalmente en forma de glucósidos, genistina y daidzina. En el tracto gastrointestinal sufren procesos de hidrólisis dando lugar a las geninas libres, genisteína y daidzeína. Las bacterias intestinales convierten también, la biochanina A y la formononetina, precursores metilados de la genisteína y daidzeína, respectivamente, en sus formas demetiladas. Las geninas son rápidamente absorbidas, conjugadas en el hígado y sometidas a circulación entero-hepática (Duncan y cols., 2003). La excreción se produce fundamentalmente por la orina (formas conjugadas) y por heces (formas no conjugadas).

Las diferencias en el metabolismo gastrointestinal son importantes en la eficacia de estos compuestos para la reducción del riesgo de enfermedades. Además de la deconjugación y demetilación, las isoflavonas pueden ser metabolizadas por la microflora intestinal dando lugar al p-etilfenol y al equol. La actividad de sus metabolitos puede ser más alta que la de las isoflavonas puras. Alrededor del 30-40% de la población occidental metabolizan la daidzeína a equol, detectándose altos niveles de este metabolito en orina (Duncan y cols., 2000; Rowland y cols., 2000; Meyer y cols., 2004). Los productores de equol obtienen más beneficios de la soja que los no productores, por lo que sería interesante encontrar el modo de hacer que los “no productores” lleguen a ser “productores” (Setchell y cols., 2002). Esto parece debido a su microflora gastrointestinal individual, que podría ser modulada por hábitos dietéticos (Rowland y cols., 2000). Si bien, hasta la fecha, no hay una correlación clara entre los hábitos dietéticos o la composición de la flora y la capacidad de producir equol. Todas las ratas de laboratorio pueden, sin embargo, convertir la

daidzeína a equol (Setchell y cols., 2002) lo que podría ayudar a explicar algunas de las discrepancias en los efectos de las isoflavonas entre ratas y humanos. El equol se une al RE $\alpha$  y  $\beta$  y, en numerosos estudios *in vitro* y en modelos animales, se ha demostrado que posee más actividad estrogénica que su precursor, la daidzeína (Mei y cols., 2001) y además, tiene la mayor actividad antioxidante de todas las isoflavonas. Una posible causa de la pluralidad de los resultados obtenidos en los estudios clínicos que nos informan de los beneficios de la soja podría ser la no distinción entre sujetos “productores de equol” y “no productores”.

Se ha demostrado que el pico de concentración plasmática de las isoflavonas lo alcanzan más tarde los glucósidos que las geninas libres (Setchell y cols., 2001) y que la genisteína tiene mayor biodisponibilidad oral que la daidzeína (Setchell y cols., 2003).

Las isoflavonas se encuentran sometidas a ciclo entero-hepático, de modo que tras su absorción en el intestino pasan al hígado y son excretadas en la bilis en forma de glucurono- y sulfo-conjugados. Los principales metabolitos de las isoflavonas detectados en orina son los 7-O-glucurónidos y los 4'-O-glucurónidos y en menor proporción, los ésteres de sulfato y las geninas libres. Los glucurónidos poseen poca capacidad estrogénica pero pueden activar las células natural killer que ayudan a combatir el cáncer (Zhang y cols., 1999). La eliminación de las isoflavonas es bastante lenta con valores de vida media de eliminación de 6-8 horas.

Los efectos estrogénicos de las isoflavonas se producen cuando se alcanzan concentraciones plasmáticas de 50-800 ng/ml, valores similares a los alcanzados por la población Asiática con su consumo regular de productos de soja (Adlercreutz y cols., 1993). La ingesta de isoflavonas para alcanzar estos niveles y por tanto, efectos biológicos, es de 30-50 mg/día (Setchell, 1998). La biodisponibilidad depende más del individuo que de la fuente de isoflavonas.

## **2.4. ACCIONES CARDIOVASCULARES**

Numerosos estudios observacionales han apoyado el papel protector de las isoflavonas modulando los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular. La intensa búsqueda realizada durante los últimos 10-15 años ha demostrado que el consumo de soja no sólo mejora muchos aspectos de la salud menopáusica sino que también mejora la salud cardiovascular. La urgencia de incrementar los conocimientos del papel de la soja en la salud cardiovascular de la mujer se debe a que la enfermedad coronaria es la principal causa de morbilidad y mortalidad en la mujer postmenopáusica. La administración de estrógenos posee efectos positivos cardiovasculares mejorando el perfil lipídico, la función de las células endoteliales, la reactividad vascular y los factores hemostáticos (Gilligan y cols., 1994; Reis y cols., 1994). Sin embargo, los efectos beneficiosos cardiovasculares de la terapia hormonal sustitutiva (THS) en la mujer postmenopáusica se han cuestionado recientemente al originar efectos adversos severos, entre los que se incluyen un aumento de la incidencia de cáncer de mama, de cáncer endometrial y de eventos tromboembólicos (Rossouw y cols., 2002; Nelson y cols., 2002). Todo ello ha estimulado la investigación de tratamientos alternativos, entre los que las isoflavonas ocupan un lugar destacado.

### **2.4.1. Lípidos en plasma y lipoproteínas**

La proteína de la soja tiene efectos demostrados en los lípidos plasmáticos y en la concentración de lipoproteínas. En humanos se ha encontrado que la sustitución de proteína animal por proteína de soja produce una reducción de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de ~13%; reducciones de los triglicéridos del plasma de ~10%; y un incremento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) de ~2% (Anderson y cols.,

1995). Estos efectos beneficiosos de las proteínas de la soja sobre la concentración de lipoproteínas plasmáticas servían de base a la *U.S. Food and Drug Administration* para recomendar que “25 g de proteína de soja al día, como parte de una dieta baja en grasas saturadas y colesterol, puede reducir el riesgo de enfermedad coronaria“.

Varios estudios clínicos han apuntado un posible papel de las isoflavonas en la reducción del colesterol producida por la proteína de la soja. Estos estudios se basan en la reducción drástica de las propiedades hipocolesterolemiantes cuando los preparados de proteínas de soja se lavan con etanol (para eliminar las isoflavonas). Sin embargo, es posible que este tratamiento arranque otros compuestos bioactivos distintos de las isoflavonas y además, puede desnaturalizar las proteínas. Por ello se tiende a invalidar cualquier conclusión sobre la actividad hipocolesterolemiantes de las isoflavonas. Los estudios en humanos que emplean isoflavonas aisladas o proteína de soja con distinta cantidad de isoflavonas no han apoyado el papel de las isoflavonas, sin proteína de soja, en la colesterolemia (Nestel y cols., 1997; Hodgson y cols., 1998; Dewell y cols., 2000).

Recientemente, se comprobó que los preparados de soja sometidos a extracción con etanol mostraban alto nivel de proteólisis (Gianazza y cols., 2003). El daño de la estructura proteica es la causa de la pérdida de actividad hipocolesterolemiantes. De hecho, los extractos de proteína de soja en los que se han eliminado las isoflavonas por cromatografía en columna, mantienen sus propiedades (Fukui y cols., 2002), demostrándose así que los componentes específicos de la proteína son los máximos responsables del descenso de los niveles de colesterol que provoca la soja (Anderson, 2003).

A nivel mecanístico, se cree que los extractos de proteína de soja estimulan al receptor de las LDL siendo ésta la ruta por la que ejercen su actividad hipocolesterolemiantes (Lovati y cols., 1992 y 1998; Manzoni y cols., 1998; Lovati y cols., 2000). Un estudio reciente en la Universidad de Milán mostró un incremento de 8 veces en la actividad del receptor de las LDL aislado de linfomonocitos de pacientes hipercolesterolemicos severos tratados con las proteínas de la soja. Baum y cols.

(1998) realizaron un hallazgo similar en mujeres postmenopáusicas. En ratas, se ha encontrado que el componente de la proteína de soja 7S $\alpha$  purificado provoca una actividad hipocolesterolémica 10 veces mayor que la ejercida por el clofibrato, fármaco hipocolesterolémico de síntesis (Duranti y cols., 2004). Sin embargo, la principal isoflavona, la genisteína, a concentraciones de hasta 1 mg/ml, no demostró actividad estimuladora del receptor de las LDL en estudios realizados en células HepG2 (Lovati y cols., 2000).

Un artículo reciente (Erdman y cols., 2000) demuestra que ambas, la proteína de soja y las isoflavonas, se necesitan para que la soja ejerza el efecto máximo en el descenso de los niveles de colesterol. Sin embargo, es difícil identificar posibles mecanismos por los que las isoflavonas puedan ejercer efectos adicionales a los realizados por la proteína de soja. Se ha considerado que su unión al RE puede estimular los receptores de las LDL. Usando concentraciones elevadas de isoflavonas, Borradaile y cols. (2002) demuestran que la genisteína y la daidzeína inducen una reducción en la secreción de apolipoproteína B y un incremento en la actividad del receptor para las LDL en las células hepáticas, pero la relevancia clínica de estos descubrimientos es cuestionable.

Por tanto, los extractos de soja disminuyen los niveles de LDL colesterol y probablemente incrementan los de HDL. Los efectos mayores se producen en pacientes hipercolesterolémicos, aunque se producen cambios en los normocolesterolémicos e hipercolesterolémicos moderados.

#### **2.4.2. Oxidación de LDL**

Otro mecanismo beneficioso atribuido a las isoflavonas es su actividad antioxidante. Así, el consumo de proteína de soja, comparado con el de caseína, reduce la peroxidación lipídica, mecanismo involucrado en el desarrollo/progresión de

la aterosclerosis. Wagner y cols. (1997) demostraron que los niveles de peroxidación lipídica eran ~17% más bajos en primates postmenopáusicos alimentadas con proteína de soja (con isoflavonas), que en los animales alimentados con caseína y lactoalbúmina como fuente de proteínas. Por otro lado, Tikkanen y cols. (1998) examinaron en 6 voluntarios sanos, los efectos de la alimentación con proteína de soja (60 mg de isoflavonas/día) en la oxidación de las LDL y comprobaron que tras 2 semanas de consumo de soja, se retrasaba la oxidación de LDL. Meng y cols. (1999) describieron que la esterificación de las isoflavonas de la soja permitía su incorporación en las partículas de LDL otorgando una mayor resistencia a su oxidación.

Más recientemente, también se ha informado de los efectos de las isoflavonas en la peroxidación lipídica *in vivo* y en la resistencia a la oxidación de las LDL *in vitro*. Se realizó un estudio en hombres y mujeres postmenopáusicas alimentados con una dieta de proteínas de soja con alto o bajo contenido en isoflavonas; la dieta rica en isoflavonas inducía un descenso de los niveles de isoprostaglandina-F<sub>2α</sub> marcador de peroxidación lipídica, de 19,5% y, además, retrasaba la oxidación de las LDL estimulada por cobre (Wiseman y cols., 2000). Sin embargo, también existen ensayos recientes que demuestran escasa (Vega-Lopez y cols., 2005) o nula actividad antioxidante de las isoflavonas (Samman y cols., 1999). Para conocer el mecanismo de la acción antioxidante de las isoflavonas, se han realizado numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*. Se ha demostrado que estos flavonoides, por su estructura polifenólica, actúan como “scavenger” de radicales libres, pero además, también aumentan la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa, SOD, GP<sub>x</sub> y glutathion reductasa (Kurzer y Xu, 1997).

### 2.4.3. Función arterial

#### Tono vascular dependiente de endotelio

Honore y cols. (1997) demostraron que la administración de extractos de soja en macacos hembra premenopáusicos durante 6 meses, inhibió la contracción de arterias coronarias en respuesta a ACh ~12%, comparado con otro grupo que recibía soja lavada con alcohol (desprovista de isoflavonas). El mismo grupo de investigación demostró que la dilatación de la arteria coronaria originada por la ACh en animales ovariectomizados aumentó en los que ingerían dieta de proteína de soja con isoflavonas (Clarkson, 2002). Los hallazgos fueron confirmados por Williams y cols. (2001) al estudiar la relación entre estradiol y la respuesta de macacos hembra postmenopáusicos a proteína de soja intacta. En ese estudio, se encontró que macacos con menopausia quirúrgica, con concentraciones de estradiol en plasma muy bajas, respondían a la ACh con contracción de las arterias coronarias, mientras que a las que se administraba conjuntamente estradiol y soja respondían con una mayor dilatación de las arterias coronarias que las que recibían una cantidad equivalente de estradiol. Se demostró así, una interacción estadísticamente significativa, entre los efectos vasodilatadores del estradiol y de la dieta de soja.

Más concretamente, Mishra y cols. (2000) demostraron, *in vitro*, el efecto vasodilatador dependiente de NO de las isoflavonas, genisteína y daidzeína, en aorta de rata. Por otro lado, Kitayama y cols. (2002) estudiaron los efectos de la genisteína en SHR observando que el tratamiento crónico con esta isoflavona potenciaba la vasodilatación dependiente de endotelio a ACh en la arteria basilar y reducía el engrosamiento de la pared vascular, efectos que atribuían a su actividad inhibidora de tirosín kinasas. Esta mejora de la función endotelial también se producía en arterias coronarias de ratas normotensas ovariectomizadas (Molsiri y cols., 2004).

Se ha analizado los efectos de la soja y las isoflavonas sobre la función endotelial en humanos. Teede y cols. (2001) evaluaron los efectos de los suplementos de soja en la función arterial de 213 pacientes (108 hombres y 105 mujeres postmenopáusicas, 50-75 años). El tratamiento duró 3 meses, con 40 g de proteína de soja que contenía 118 mg de isoflavonas, el placebo fue caseína. El tratamiento con soja empeoró la dilatación de la arteria braquial de los hombres y no tuvo efectos significativos en la dilatación mediada por flujo de arterias braquiales de mujeres postmenopáusicas. De forma similar, se observó que las isoflavonas no tenían efectos en la vasodilatación mediada por flujo en mujeres postmenopáusicas (Nestel y cols., 1997; Kreijkamp-Kaspers y cols., 2005).

Por el contrario, también encontramos datos publicados que indican un efecto protector sobre la función endotelial. Se evaluó la administración intravenosa aguda de genisteína o de daidzeína en hombres y mujeres sanas premenopáusicas (Walker y cols., 2001). La infusión de genisteína y 17 $\beta$ -estradiol incrementó el flujo arterial del antebrazo en ambos sexos, sin embargo la infusión de daidzeína no tuvo efecto. También se observó que los efectos vasodilatadores de genisteína y 17 $\beta$ -estradiol revertían al inhibir la NOSe. Squadrito y cols. (2002), en un ensayo de doble ciego randomizado, demostraron que el consumo de genisteína (54 mg/día) incrementó significativamente la vasodilatación dependiente de endotelio mediada por flujo en mujeres postmenopáusicas, con un incremento significativo en los nitratos sanguíneos tras 6 meses de tratamiento y con una reducción del 50% de los niveles plasmáticos de ET-1. El descubrimiento de este mecanismo dependiente de NO lo apoyó una nueva investigación de este grupo realizada en mujeres postmenopáusicas durante 1 año, donde la genisteína (54 mg/día) se comparó con la THS (Squadrito y cols., 2003). La dilatación mediada por flujo se incrementó de 3,9 a 7% apoyando el potencial papel protector de la genisteína en condiciones de disfunción endotelial.

## **Compliancia arterial**

La compliancia arterial depende de los componentes de la pared de los vasos, como la elastina, proteoglicanos y la función de las CMLV. En humanos, la suplementación con proteína de soja o la administración de extractos de isoflavonas, parece mejorar la compliancia arterial. En un estudio randomizado, con placebo, en 21 mujeres peri- y postmenopáusicas tratadas durante 5 semanas con 80 mg/día de isoflavonas purificadas de la soja, se apreció una mejora de ~26% en la compliancia arterial sistémica (Nestel y cols., 1997). Posteriormente, Teede y cols. (2001) demostraron que la soja reduce significativamente la velocidad de la onda de pulso lo que indica también una mayor distensibilidad arterial.

### **2.4.4. Agregación plaquetaria**

Otro mecanismo importante por el que las isoflavonas de la soja pueden ejercer beneficios cardiovasculares es su efecto sobre la agregación plaquetaria. Williams y Clarkson (1998) encontraron que, *in vitro*, la agregación plaquetaria en respuesta a trombina y serotonina está reducida en plaquetas procedentes de animales alimentados con proteína de soja con isoflavonas, comparada con las plaquetas de animales alimentados con proteína de soja lavada con alcohol. De manera análoga, Schoene y Guidry (1999) demostraron que las plaquetas de ratas alimentadas con proteína de soja intacta tenían volúmenes aparentes más pequeños que las plaquetas de ratas alimentadas con proteína de soja desprovista de isoflavonas, sugiriendo que estas plaquetas más pequeñas estaban en un estado más quiescente. Helmhurst y Tang (1995) hallaron que la genisteína reducía la cantidad de serotonina en las plaquetas. Por tanto, las isoflavonas podrían inhibir la activación y la agregación plaquetaria y reducir la cantidad de serotonina en las plaquetas, y todo esto podría contribuir a la reducción de los vasoespasmos coronarios y la trombosis.

#### **2.4.5. Aterosclerosis**

Se ha comprobado cómo la proteína de la soja inhibe la aterosclerosis en modelos animales. Este efecto parece estar mediado en gran parte, por la acción sobre la concentración de las lipoproteínas en plasma ya comentada anteriormente. Clarkson y cols. (2001) encontraron que los macacos alimentados con soja rica en isoflavonas, tenían un perfil lipídico más favorable, que incluía una mayor concentración de HDL colesterol y una menor concentración de LDL más VLDL colesterol. Además, la dieta que contenía proteína de soja e isoflavonas redujo la aterosclerosis de la arteria coronaria y en mayor medida, la de la arteria carótida. Puesto que el estudio no incluyó un grupo alimentado con proteína animal, como caseína, no se pudo especular sobre el grado del efecto antiaterogénico de la proteína de soja sin isoflavonas. Tampoco se pudo saber los componentes de la soja que otorgaron protección frente a la aterosclerosis.

Yamakoshi y cols. (2000) demostraron la mejora que produce el extracto de isoflavonas de la soja en el desarrollo de la aterosclerosis. Para ello, se alimentó a conejos con un extracto rico en isoflavonas, sin proteínas de soja, y se comprobó que la aterosclerosis se redujo.

Las isoflavonas pueden modificar la enfermedad cardiovascular independientemente de los efectos en la concentración de las lipoproteínas plasmáticas. Makela y cols. (1999) publicaron los resultados de un estudio en el que medían la expresión de RE $\alpha$  y RE $\beta$  en arterias de rata tras la eliminación mecánica del endotelio, una técnica que promueve la aterogénesis. Encontraron que después de 7 días del daño en las arterias, la expresión de RE $\alpha$  y RE $\beta$  se incrementó, pero el RE $\beta$  se sobreexpresó en mayor medida (~30 veces más) que el RE $\alpha$ . En un segundo estudio, trataron a las ratas con varias dosis (0-2,5 mg/kg) de 17 $\beta$ -estradiol o genisteína administrado subcutáneamente tras la denudación del endotelio. Ambos agentes reducían la extensión de las lesiones. Estos datos sugieren que el RE $\beta$  juega un papel

en la mediación de algunos efectos directos de la genisteína en la pared de los vasos previniendo la aterosclerosis.

Los estudios realizados *in vitro* sugieren que las isoflavonas afectan también a las CMLV que están involucradas en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis. Se ha informado que la genisteína inhibe la migración y la proliferación de estas CMLV (Fujio y cols., 1993; Makela y cols., 1999; Shimokado y cols., 1994 y 1995).

#### **2.4.6. Hipertensión**

La soja, especialmente las isoflavonas, pueden afectar favorablemente a la presión arterial. Este hecho es de especial interés puesto que la deficiencia de estrógenos tras la menopausia se ha asociado con incremento en los niveles de colesterol y aumento de la presión arterial, factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular; de tal forma que la mortalidad por sucesos cardiovasculares, menor en las mujeres que en los hombres, se iguala tras la menopausia.

Existen pocos estudios que examinen el efecto de la proteína de la soja y/o sus isoflavonas asociadas, sobre la presión arterial. La disminución de la compliancia arterial contribuye al desarrollo de hipertensión sistólica (Dart y cols., 1993); de manera que la mejora de la distensibilidad arterial producida por las isoflavonas puede prevenir el incremento de la presión sistólica. Washburn y cols. (1999) encontraron que la administración de 20 g de proteína de soja (que contenía 34 mg de isoflavonas) dividida en dos dosis a 51 mujeres peri-menopáusicas, reducía significativamente la presión arterial diastólica 5 mm Hg. En un estudio realizado por Crouse y cols. (1999) en hombres con hipercolesterolemia moderada (n = 94) y mujeres (n = 62) a los que se administraba suplementos de soja que contenía 25 g de caseína o 25 g de proteína de soja con distintas concentraciones de isoflavonas (3-62 mg de isoflavonas por 25 g de

proteína), se observó una tendencia significativa de reducción de la presión arterial diastólica en mujeres pero no en hombres. Sin embargo, estos hallazgos no estaban de acuerdo con los de Hermansen (2001) que no encontraron efectos de 50 g de soja (aproximadamente 165 mg de isoflavonas) sobre la presión, ni con el de Hodgson y cols. (1999) que fueron incapaces de demostrar un efecto hipotensor de las isoflavonas administradas durante 8 semanas a pacientes hipertensos.

## **2.5. OTRAS ACCIONES FARMACOLÓGICAS**

### **2.5.1. Cáncer**

Estudios epidemiológicos asociaron el alto consumo de soja en mujeres (Parkin, 1989) y hombres (Pienta y cols., 1996) asiáticos con la menor incidencia de cáncer de mama y próstata, respectivamente, y un incremento de riesgo cuando la población asiática adoptaba la dieta occidental (Ziegler y cols., 1993; Shimizu y cols., 1991). A pesar de esta evidencia epidemiológica, varios estudios de casos y controles con mujeres chinas (Yuan y cols., 1995), mujeres multiétnicas americanas (Horn-Ross y cols., 2001) y mujeres postmenopáusicas holandesas (den Torkelaar y cols., 2001) y un estudio prospectivo con mujeres japonesas (Key y cols., 1999), no encontraron relación entre el consumo de soja o fitoestrógenos y el riesgo de cáncer de mama.

Se han citado numerosos mecanismos por los que las isoflavonas pueden ejercer su actividad anticancerígena, entre ellos está su unión al RE. Así, las isoflavonas pueden ejercer acciones estrogénicas y antiestrogénicas; estas últimas compitiendo con el estradiol por la unión al receptor. La genisteína y el equol desplazan al estrógeno y a la testosterona de su fijación a las globulinas de unión de las hormonas sexuales (SHBG) humanas y pueden afectar a los niveles celulares de SHBG (Pino y cols., 2000). Por tanto, la genisteína y otros fitoestrógenos podrían afectar al

aclaramiento de estrógenos y andrógenos y, por tanto, a la biodisponibilidad de las hormonas a células diana.

Además de su capacidad de unión al RE y a SHBG, las isoflavonas ejercen efectos inhibitorios sobre muchas enzimas implicadas en el metabolismo de hormonas esteroideas. Muchos tipos de cánceres son dependientes de hormonas sexuales y por tanto, una disminución de sus niveles podría tener efectos beneficiosos sobre el cáncer. Las isoflavonas inhiben la aromatasas originando un descenso en la producción de estrógenos endógenos (Le Bail y cols., 2000). También inhiben las  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas, responsables de la conversión de estrona a estradiol y de androstenediona a testosterona (Krazeisen y cols., 2001), y la  $5\alpha$ -reductasa (Evans y cols., 1995), originando una disminución de los niveles de hormonas activas. Otra enzima inhibida por las isoflavonas es la  $3\beta$ -deshidrogenasa/isomerasa que cataliza el paso de pregnenolona a progesterona (Wong y cols., 1999).

Finalmente, la genisteína inhibe tirosín kinasas, ADN topoisomerasas y los mecanismos de angiogénesis (Adelcreutz, 2002).

### **2.5.2. Síntomas postmenopáusicos**

Estudios observacionales han indicado que la proporción de síntomas vasomotores postmenopáusicos (p.ej. sofocos y/o sudor nocturno) en las mujeres japonesas era 10 veces menor que en las mujeres occidentales. Esta reducción se ha relacionado con los niveles de isoflavonas en orina, 100 veces mayor en las japonesas que en las occidentales (Adelcreutz y cols., 1992; Nagata y cols., 2001).

La THS produce reducción del número y la intensidad de los síntomas vasomotores y algunos autores han descrito que posee beneficios en el declive cognitivo asociado a la menopausia (Yaffe y cols., 1998), pero su uso ha caído por sus efectos adversos. Las isoflavonas son eficaces reduciendo los síntomas causados por la

depleción de estrógenos como sofocos, sudor nocturno y sequedad vaginal (Albertazi y cols., 1998; Han y cols., 2002), aunque sólo una pequeña parte de estos beneficios se deben a las isoflavonas puesto que el grupo placebo también presentaba mejorías evidentes. Así, Kurzer (2003) indicó que el consumo de pequeñas cantidades de isoflavonas de la soja 30 mg/día puede reducir los sofocos un 30-50%. El beneficio mayor lo obtienen las mujeres con los síntomas más severos cuando los suplementos se toman a dosis divididas a lo largo del día. En este efecto se incluye el efecto placebo siendo la reducción debida a las isoflavonas *per se* de sólo un 10-20%.

### **2.5.3. Osteoporosis**

La deficiencia de estrógenos en mujeres postmenopáusicas puede conducir a la pérdida de masa ósea (osteoporosis). La THS otorga beneficios claros contra la osteoporosis (Nelson y cols., 2002). Se ha demostrado que las isoflavonas de la soja también poseen efectos beneficiosos. La osteoporosis se produce como consecuencia de un desequilibrio entre la formación y la resorción ósea, con más resorción que formación. Las isoflavonas previenen la pérdida ósea en ratas ovariectomizadas o ratones (Fanti y cols., 1998; Ishimi y cols., 1999), estimulan la formación ósea e inhiben la resorción (Ebisawa y Koshihara, 2001). Los mecanismos sugeridos son la estimulación de la proliferación de los osteoblastos (formadores de hueso) y la protección de tales células del daño oxidativo (las isoflavonas poseen propiedades antioxidantes), así como el aumento de la apoptosis de las células progenitoras de los osteoclastos (destructores del hueso) (Lee y cols., 2001; Rassi y cols., 2002; Yamaguchi, 2002).

Estos efectos beneficiosos en modelos animales se confirmaron en numerosos ensayos clínicos en mujeres peri- y postmenopáusicas (Alekel y cols., 2000; Mei y cols., 2001; Morabito y cols., 2002; Lydeking-Olsen y cols., 2004; Chen y cols.,

2004). En contraste, dos ensayos recientes en mujeres postmenopáusicas no mostraban una actividad clara de las isoflavonas sobre el hueso (Arjmandi y cols., 2005; Spence y cols., 2005).

## **2.6. TOXICIDAD**

Aunque la población asiática consume la soja sin efectos adversos aparentes, existe la preocupación por potenciales efectos adversos que pueden aparecer por el uso de isoflavonas a dosis más elevadas.

Se ha demostrado que la genisteína a concentraciones 10 veces mayores que las encontradas en el hombre tras el consumo medio diario de productos de soja (Setchell y cols., 1997), ejerce efectos mutagénicos en las células (Kulling y cols., 1999). Esta isoflavona posee actividad inhibitoria de la topoisomerasa II que puede ocasionar rotura de la hebra del ADN lo que podría ser de interés en procesos cancerosos (Yellayi y cols., 2002). Esta actividad también puede ejercerse en el timo reduciendo la inmunidad dependiente de células (Sakabe y cols., 1999). Además, hay algunos datos controvertidos que informan de la posibilidad del incremento del riesgo de desarrollo de alergias en el adulto por el consumo de soja en la infancia (Strom y cols., 2001).

Un meta-análisis del consumo de soja sugirió su actividad tirotóxica, por producir alteraciones en el tiroides en individuos jóvenes (Doerge y Sheehan., 2002). Más recientemente, un estudio en cerditos que comparaba fórmulas infantiles de leche de soja con fórmulas de leche de vaca, mostraba que el consumo de soja reducía un 50% la proliferación de células intestinales, posiblemente provocando inmadurez intestinal (Chen y cols., 2005).

Se han realizado estudios en animales para valorar los posibles efectos adversos de estas fórmulas infantiles de soja. Así, la exposición de ratones neonatos a 50 mg/kg/día de genisteína durante los primeros 5 días de vida, provocaba niveles de

adenocarcinoma uterino a los 18 meses de edad similares a los que induce el dietilestilbestrol (Newbold y cols., 2001). Sin embargo, a pesar de sus altas dosis de isoflavonas (6 a 11 veces mayores que las mujeres que reciben isoflavonas para los síntomas menopáusicos), las fórmulas infantiles de soja, no parecen tener efectos estrogénicos en el aparato reproductor de ratones maduros (Pocock y cols., 2002).

Si bien, la mayoría de los ensayos clínicos realizados son a corto plazo, sería necesario evaluar los riesgos del uso de las isoflavonas a largo plazo ya que en muchas ocasiones el consumo de estas preparaciones a base de isoflavonas se realiza durante muchos años. McClain y cols. (2005) han realizado estudios de seguridad con genisteína en ratas Wistar que incluyen: dos estudios agudos en los que administran una dosis de 2000 mg/kg de genisteína (mezclada con la dieta o por sonda esofágica), dos subcrónicos (4 semanas y 13 semanas) con dosis de 5, 50 y 500 mg/kg/día, y un crónico (administración con la dieta durante 52 semanas) con las mismas dosis. Se concluyó que la dosis letal en ratas es mayor a 2000 mg/kg. En el estudio agudo, la genisteína presentaba una baja toxicidad. Hasta la dosis de 500 mg/kg/día, fue bien tolerada. En todos los estudios, se observó disminución del consumo de comida y de ganancia del peso corporal con la dosis de 500 mg/kg/día. Los principales hallazgos hematológicos fueron una disminución de los parámetros de glóbulos rojos (hemoglobina y hematocrito) con 500 mg/kg/día y un incremento compensatorio de reticulocitos. Los datos de bioquímica clínica encontrados, no se consideraron significativamente toxicológicos, con la excepción de un ligero incremento en la gamma glutamil transferasa en ratas machos y hembras a la dosis 500 mg/kg/día. En la necrosia se apreciaron pocos cambios macroscópicos; en el estudio de 52 semanas, se observó incremento del peso uterino y quistes en los ovarios. También en este estudio se produjeron incrementos en el peso relativo de los órganos en función del peso corporal. Casi todas las alteraciones halladas en estos estudios se deben a las propiedades estrogénicas de la genisteína.

## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---

Se conoce que las diferencias de género influyen en el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, de manera que la mujer premenopáusicas tiene un menor riesgo que el hombre de la misma edad. Este beneficio desaparece después de la menopausia, lo que sugiere que los estrógenos desempeñan un papel importante en la salud cardiovascular (Mendelsohn y Karas, 1999). Uno de los mecanismos esenciales por los que la terapia substitutiva de estrógenos puede reducir el riesgo cardiovascular en la mujer postmenopáusicas es mejorando la función vascular de forma independiente a sus efectos beneficiosos sobre el contenido de lípidos en plasma (Gilligan y cols., 1994). Se ha sugerido que los efectos protectores de la suplementación de estrógenos en el aparato cardiovascular podrían estar mediados por un aumento del NO liberado por el endotelio y/o por su modulación del sistema renina-angiotensina tisular.

Las células endoteliales desempeñan un papel esencial en la modulación del tono vascular y en el control de la adhesión y agregación plaquetaria. La disfunción endotelial, definida como un desequilibrio entre factores vasoactivos que conduce a vasoconstricción y cambios estructurales en la pared vascular, es un evento primario en la fisiopatología de la aterosclerosis y la hipertensión y un predictor independiente de mal pronóstico (Endemann y Schiffrin, 2004). Las alteraciones clave en los factores vasoactivos características de la disfunción endotelial incluyen una reducción en la biodisponibilidad de NO y un aumento de la liberación de ERO, ET-1 y prostanoides vasoconstrictores.

Niveles fisiológicos de estradiol potencian la vasodilatación dependiente de endotelio inducida por flujo en mujeres postmenopáusicas. También se ha observado que la relajación dependiente de endotelio en la aorta aislada es mayor en hembras en comparación con la que se obtiene en machos y en hembras ovariectomizadas SHR. Estos datos sugieren que las hormonas sexuales femeninas producen efectos beneficiosos en el función endotelial (Orshal y Khalil, 2004). El tratamiento crónico con estrógenos mejora la disfunción endotelial, a través de la regulación al alza de la NOSe (Hayashi y cols., 1995; Hishikawa y cols., 1995; MacRitchie y cols., 1997) o de

la modulación post-transduccional de su actividad (Fulton y cols., 2001). Los estrógenos también producen efectos rápidos, no genómicos, en el endotelio vascular, entre los que se incluye la activación de la síntesis de NO (Lantin-Hermoso y cols., 1997; Caulin-Glaser y cols., 1997). Además, los efectos de los estrógenos en el sistema cardiovascular pueden estar relacionados con su modulación del sistema renina-angiotensina (Dean y cols., 2005) y sus propiedades antioxidantes (Arnal y cols., 1996; Wassmann y cols., 2001).

Los efectos beneficiosos cardiovasculares de la terapia substitutiva de estrógenos en la mujer postmenopáusica se han cuestionado recientemente (Rossouw y cols., 2002; Nelson y cols., 2002). Así, a pesar de que varios ensayos clínicos demostraran que la administración de estrógenos tiene efectos favorables en el perfil lipídico, la función de las células endoteliales, la reactividad vascular y los factores hemostáticos (Gilligan y cols., 1994; Reis y cols., 1994), también origina efectos adversos severos, entre los que se incluyen un aumento de la incidencia de cáncer de mama, de cáncer endometrial y de eventos tromboembólicos (Rossouw y cols., 2002; Nelson y cols., 2002). Todo ello ha estimulado la investigación de tratamientos alternativos, tales como los fitoestrógenos.

Los fitoestrógenos son compuestos no esteroideos derivados de las plantas que presentan actividades agonistas o antagonistas del RE (Kurzer y Xu, 1997). Las isoflavonas son una de las principales clases de fitoestrógenos. Se encuentran en abundancia en la soja y los alimentos derivados de ella. Existen evidencias de que los efectos beneficiosos cardiovasculares relacionados con el consumo de soja son debidos a su fracción de isoflavonas (Cassidy y cols., 1994). La genisteína, en particular, ha demostrado ser eficaz en mujeres y en modelos animales (Glazier y cols., 2001). *In vitro*, esta isoflavona relaja las arterias de rata mediante mecanismos dependientes (Mishra y cols., 2000) e independientes (Duarte y cols., 1997) de NO y aumenta la respuesta vasodilatadora de la ACh en arterias coronarias de macacos ateroscleróticos hembra (Honore y cols., 1997). *In vivo*, la genisteína mejora la función endotelial en ratas normotensas ovariectomizadas (Molsiri y cols., 2004) y en

SHR (Kitayama y cols., 2002). Además, la genisteína y los suplementos de soja demostraron ser efectivos en la protección de la función endotelial en hombres y en mujeres postmenopáusicas sin patología evidente (Squadrito y cols., 2002; Squadrito y cols., 2003).

Existen 2 tipos de receptores estrogénicos: RE $\alpha$  y RE $\beta$ , que se expresan en las células endoteliales y en las CMLV (Lindner y cols., 1998). Los efectos positivos cardiovasculares de los estrógenos, especialmente el aumento en la producción de NO, están relacionados tanto con la activación del RE $\alpha$  (Pare y cols., 2002; Darblade y cols., 2002) como la del RE $\beta$  (Zhu y cols., 2002; Chambliss y cols., 2002). La genisteína se une a ambos subtipos del RE pero, a diferencia del estradiol, presenta mayor afinidad por el RE $\beta$  (Makela y cols., 1999; Kuiper y cols., 1997). Además de sus efectos estrogénicos, también presenta efectos antioxidantes (Ruiz-Larrea y cols., 1997; Bermejo y cols., 2003) que pueden estar involucrados en los beneficios sobre sus acciones cardiovasculares. Sin embargo, sería necesario profundizar en los mecanismos de acción de estas isoflavonas para que la intervención terapéutica y/o dietética pudiera mejorar el tratamiento de la hipertensión tanto en machos como en hembras en el futuro.

Por estas razones, en esta Tesis Doctoral nos planteamos los siguientes **objetivos**:

- 1) Analizar los efectos de la genisteína y la daidzeína *in vitro* sobre la disfunción endotelial característica de SHR y los potenciales mecanismos implicados: actividad NOS, producción de ERO y síntesis y actividad de prostanoïdes vasoconstrictores. El papel del mecanismo estrogénico se estudiará comparando sus efectos con los del estrógeno natural 17 $\beta$ -estradiol y usando un antagonista específico del RE. Hemos seleccionado animales macho para analizar los efectos de los fitoestrógenos independientes del sexo femenino, a

concentraciones que se alcanzan en el plasma después del consumo de una dieta rica en soja (Manach y cols., 2004).

- 2) Analizar si la genisteína, actuando como un agonista del RE, puede influir *in vivo* sobre la disfunción endotelial característica de SHR machos, así como los potenciales mecanismos implicados. Nos hemos centrado en la vía del NO (actividad NOSe, expresión de NOSe y sus proteínas reguladoras, caveolinas y calmodulina) y su interacción con  $O_2^-$ . El papel del mecanismo estrogénico se estudiará comparando sus efectos con los del estrógeno natural  $17\beta$ -estradiol y usando un antagonista específico del RE. Hemos seleccionado ratas macho para analizar los efectos de la genisteína independientes del sexo femenino, a dosis que producen concentraciones plasmáticas de genisteína similares a las que se alcanzan en el hombre después del consumo de una dieta rica en soja (Adlercreutz y cols., 1993; Fritz y cols., 1998).
  
- 3) Analizar si la genisteína puede sustituir a los estrógenos en el tratamiento de la disfunción vascular en hipertensión, ofreciendo una protección similar al  $17\beta$ -estradiol frente al declive de la función vascular menopáusica. Para ello utilizamos un modelo de disfunción endotelial inducido por aumento de la presión arterial y ovariectomía en ratas hembra, que se asemeja a la reducción de la vasodilatación dependiente de endotelio observada en la mujer postmenopáusica hipertensa (Dantas y cols., 1999). Nos hemos centrado en el estudio de la reactividad vascular, la expresión de la NOSe y sus proteínas reguladoras (caveolinas y calmodulina) y el estado oxidativo vascular.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

## **1. ESTUDIOS *IN VITRO***

### **1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Para los experimentos *in vitro* se utilizaron ratas macho WKY y SHR de 24 semanas de edad (300-350 g) suministradas por los Laboratorios Harlan (Barcelona). Los animales se mantuvieron en el estabulario del laboratorio, a una temperatura de  $24 \pm 1$  °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Se alojaron en cubetas de makrolon dispuestas en rack de acero inoxidable con lecho de viruta, en grupos de hasta 5 ratas por jaula y se alimentaron con una dieta estándar y agua corriente *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron según las Guías Institucionales para el cuidado ético de los animales.

### **1.2. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR**

#### **1.2.1. Procedimiento general de la técnica y preparación del tejido**

Las experiencias se realizaron en anillos de aorta torácica aislada de ratas WKY y SHR según la técnica descrita por Duarte y cols. (2001).

Tras el sacrificio de los animales mediante una dosis letal de pentobarbital sódico ( $120 \text{ mg kg}^{-1}$  intraperitoneal) y posterior exanguinación, la arteria es cuidadosamente disecada desde el cayado aórtico hasta el diafragma y depositada en una placa Petri con solución Krebs (composición en mM: NaCl 118, KCl 4,75, NaHCO<sub>3</sub> 25, MgSO<sub>4</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 y glucosa 11). A continuación, se eliminaron los elementos de tejido conjuntivo y adiposo y se dividieron los segmentos de las arterias en varios anillos de 3-4 mm de longitud, para proceder al montaje en un sistema de baño de órganos. Para ello se introdujeron, en el lumen de dichos anillos, dos alambres rígidos de acero inoxidable en forma de L (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, se conectó a un

transductor de tensión isométrico de fuerza-desplazamiento (Letigraph 2000, Cibertec S.A., Madrid).

Los baños de órganos contenían 5 ml de solución Krebs termostata a 37 °C, en la que se burbugeó gas carbógeno (95 % de oxígeno y 5 % de dióxido de carbono) y con un pH comprendido entre 7,3-7,4. Los anillos aórticos se sometieron a una tensión inicial de 2 gramos al menos durante 90 minutos antes de la adicción de los fármacos, reajustando dicha tensión si procedía, hasta alcanzar un tono estable. La solución nutritiva se renovó cada 20 minutos durante el periodo de estabilización.

En algunos experimentos, el endotelio se eliminó de forma mecánica mediante una ligera fricción con un alambre de acero. En ensayos preliminares se observó como la respuesta contráctil y relajante a la ACh se abolía completamente al eliminar de forma mecánica el endotelio como se había descrito previamente (Iwama y cols., 1992).

### **1.2.2. Protocolos experimentales**

#### **Efectos de las isoflavonas en la relajación inducida por acetilcolina**

Los anillos de aorta torácica con endotelio se incubaron durante 20 minutos con genisteína, daidzeína, 17 $\beta$ -estradiol (10  $\mu$ M) o el vehículo, dimetilsulfóxido (DMSO) en presencia o ausencia del antagonista del RE, ICI 182,780, a su conocida concentración inhibitoria de 1  $\mu$ M (Wakeling y cols., 1991) o de SOD (100 U/ml). Posteriormente, se contrajeron los anillos con fenilefrina (1  $\mu$ M) y se realizó una curva acumulativa concentración-respuesta a ACh (Duarte y cols., 2001).

#### **Efectos de las isoflavonas en la relajación inducida por nitroprusiato sódico**

Los anillos aórticos desprovistos de endotelio, se incubaron con genisteína, daidzeína, 17 $\beta$ -estradiol (10  $\mu$ M) o DMSO durante 20 minutos. Transcurrido dicho

periodo, se estimularon con fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) y cuando la contracción fue estable se añadieron concentraciones crecientes acumulativas de nitroprusiato sódico (NPS  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M).

#### **Efectos de las isoflavonas en la contracción inducida por acetilcolina**

Para analizar los efectos sobre la contracción a ACh, los anillos aórticos con endotelio intacto se contrajeron con 80 mM de KCl con el fin de obtener una respuesta control. Después de lavar las preparaciones, los anillos se incubaron durante 20 minutos con el inhibidor de la NOS, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME 100  $\mu\text{M}$ ), y las isoflavonas, 17 $\beta$ -estradiol (10 y 50  $\mu\text{M}$ ) o DMSO, en presencia o ausencia de ICI 182,780 (1  $\mu\text{M}$ ) y finalmente se realizó una curva concentración-respuesta a ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M), que se refirió a la respuesta control (Duarte y cols., 2001).

#### **Efectos de las isoflavonas en la contracción inducida por U46619**

Se estudiaron los efectos de las isoflavonas, el 17 $\beta$ -estradiol o el vehículo en la contracción producida por el agonista del receptor TP, U46619, en vasos sin endotelio. Para ello, se estimularon con KCl 80 mM hasta inducir una contracción estable. Después de lavar, los anillos aórticos se incubaron durante 20 minutos con genisteína, daidzeína, 17 $\beta$ -estradiol (10 y 50  $\mu\text{M}$ ) o DMSO y posteriormente se realizó una curva concentración-respuesta a U46619 ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M) que se expresó como porcentaje de la contracción control a KCl.

### **1.3. PRODUCCIÓN DE PROSTANOIDES**

Se ha medido la producción vascular de dos prostanoides vasoconstrictores, la  $\text{PGH}_2$  y el  $\text{TXA}_2$ .

La  $\text{PGH}_2$ , precursor inestable de prostaglandinas y tromboxanos, en condiciones no reductoras (etanol) se isomeriza a  $\text{PGE}_2$  mientras que en condiciones reductoras ( $\text{SnCl}_2$ ) se convierte en  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Por lo tanto, midiendo la diferencia de la producción aórtica de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en un medio con etanol menos la producción obtenida en un medio con  $\text{SnCl}_2$ , es posible estimar la cantidad de  $\text{PGH}_2$  liberado (Ge y cols., 1995).

El  $\text{TXA}_2$  es un compuesto bicíclico lábil formado a partir de prostaglandin-endoperóxidos. Posee una vida media de 30 segundos y es rápidamente hidrolizado dando lugar a su metabolito estable y biológicamente inactivo, el  $\text{TXB}_2$ . La corta vida media del  $\text{TXA}_2$  impide su cuantificación directa, por lo que el  $\text{TXB}_2$ , con una vida media de 20-30 minutos, es utilizado como indicador de la producción de  $\text{TXA}_2$ .

Después de estabilizar durante 1 hora en 3 ml de solución Krebs oxigenada a  $37^\circ\text{C}$ , los anillos aórticos de WKY y SHR se incubaron, en presencia de L-NAME ( $100\ \mu\text{M}$ ), con genisteína, daidzeína,  $17\beta$ -estradiol ( $10\ \mu\text{M}$ ) o DMSO durante 20 minutos y posteriormente, se estimularon con  $100\ \mu\text{M}$  de ACh durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se recogieron 3 muestras del medio de incubación de cada anillo ( $300\ \mu\text{l}$ ), la primera de ellas se usó para la cuantificación de  $\text{TXB}_2$  y las otras dos para la de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Para esta última determinación, una muestra fue colocada en etanol (6 ml) y la otra en  $\text{SnCl}_2$  (6 ml, 0,5% en etanol). Tras 2 minutos a temperatura ambiente, se añadió NaOH ( $80\ \mu\text{L}$ , 10%) a las muestras de  $\text{SnCl}_2$  y se procedió a su centrifugación. Todas las muestras se almacenaron a  $-20\ ^\circ\text{C}$  hasta su análisis. La cuantificación de la producción de  $\text{TXB}_2$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se realizó mediante un kit de enzimoimmunoensayo [Amersham Biosciences, Ltd. (Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) y Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, EEUU), respectivamente].

#### 1.4. ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO SINTASA VASCULAR

Se analizó la actividad NOS en homogenado aórtico determinando la conversión de L-[<sup>3</sup>H]arginina a L-[<sup>3</sup>H]citrulina (Mitchell y cols., 1991). Para ello, se homogenizaron, en frío, los anillos aórticos intactos de SHR y WKY en un tampón (pH 7,4) que contenía: N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-etanolsulfónico (HEPES 10 mM), sacarosa (0,32 M), ácido etilendiamino tetracético (EDTA 100 μM), ditioneitol (1 mM), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1 mg/ml) y leupeptina (10 μg/ml). Las muestras homogeneizadas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con un tampón de reacción: Tris-HCl (50 mM; pH 7,4), NADPH (1 mM), BH<sub>4</sub> (10 μM), CaCl<sub>2</sub> (2 mM), L-valina (10 mM), calmodulina (30 nM) y una mezcla de L-arginina y L-[<sup>3</sup>H]arginina (10 μM; 1 μCi/ml). Las incubaciones se realizaron en presencia de genisteína, daidzeína, 17β-estradiol (50 μM) o DMSO y finalizaron con la adición de 1 ml de tampón de parada: HEPES (20 mM; pH 5,5), EGTA (1 mM) y EDTA (1 mM). La L-[<sup>3</sup>H]citrulina se separó de la arginina añadiendo 1,5 ml de una suspensión 1:1 de resina de intercambio iónico (Dowex AG50 W-X8; Sigma Chemical, Alcobendas, Madrid, España) en agua. Para determinar la actividad de la NOS dependiente de Ca<sup>2+</sup>, se calculó la diferencia entre la L-[<sup>3</sup>H]citrulina producida por muestras que contenían Ca<sup>2+</sup> y las incubadas sin Ca<sup>2+</sup> y con EGTA 1 mM. La radioactividad se midió en el sobrenadante mediante un contador de centelleo. Los resultados se expresaron como pmol de citrulina/mg de proteína/30 minutos.

#### 1.5. PRODUCCIÓN AÓRTICA DE ANIONES SUPERÓXIDO

La liberación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> de segmentos aórticos intactos se cuantificó mediante quimioluminiscencia con lucigenina, como se había descrito previamente (Ohara y cols., 1993). Para ello, los anillos aórticos de SHR y WKY se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en una solución salina fisiológica, pH 7,4, de la siguiente

composición: 119 mM NaCl, 20 mM HEPES, 4,6 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,15 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, y 5,5 mM glucosa. En algunos anillos la producción aórtica de O<sub>2</sub><sup>-</sup> fue estimulada mediante la adicción de NADPH (100 μM). Las incubaciones se llevaron a cabo en presencia de genisteína, daidzeína, 17β-estradiol (50 μM), SOD (100 U/ml), el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, cloruro de difenileniodonio (DPI 20 μM), o DMSO. Al finalizar el periodo de incubación, los anillos aórticos se colocaron en tubos que contenían solución salina fisiológica en presencia de estos agentes, con o sin NADPH, y la lucigenina se inyectó automáticamente a una concentración final de 5 μM. Los cambios en la liberación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se determinaron por un luminómetro (Lumat LB 9507, Berthold, Alemania) midiendo luminiscencia durante 200 segundos en intervalos de 5 segundos. La medida de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se expresa en unidades relativas de luminiscencia/minuto/miligramo de tejido aórtico seco.

## **1.6. REACTIVOS**

Los reactivos procedían de Sigma Chemical, excepto el ICI 182,780, que procedía de Tocris Cookson Inc. (Bristol, Reino Unido). Las soluciones de genisteína, daidzeína, estradiol e ICI 182,780 se prepararon en DMSO y el resto de los reactivos en agua destilada.

## **1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresaron como la media aritmética ± error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante el test de la t-student o utilizando un análisis ANOVA de una vía seguida del test de Newman Keuls. Se consideró estadísticamente significativa una  $P < 0,05$ .

## **2. ESTUDIOS *IN VIVO***

### **2.1. ANIMALES UTILIZADOS Y GRUPOS EXPERIMENTALES**

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratas WKY y SHR de 23 semanas de edad procedentes de los Laboratorios Harlan (Barcelona, España). Se instalaron en jaulas con 5 animales cada una, a una temperatura constante ( $24 \pm 1$  °C), con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y una dieta estándar sin derivados de soja, AIN 76 (composición en g/kg: caseína 200, DL-metionina 3, almidón de maíz 150, sacarosa 500, celulosa 50, aceite de maíz 50, complejo mineral S10001 35, complejo vitamínico V10001 10, bitartrato de colina 2). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con las Guías Institucionales para el cuidado ético de los animales. Antes de iniciar los protocolos experimentales, se realizó un periodo de adaptación de 2 semanas administrando el vehículo y realizando medidas de presión arterial.

#### **2.1.1. Experimento I: Efectos de la genisteína sobre la hipertensión y la disfunción endotelial en SHR.**

La experiencia se realizó con 20 ratas macho WKY y 20 SHR que se dividieron, al azar, en 4 grupos experimentales:

- a) WKY-vehículo (metilcelulosa al 1% p/v), n = 10
- b) WKY-genisteína (10 mg/kg , por día, vía oral), n = 10
- c) SHR-vehículo (metilcelulosa al 1% p/v), n = 10
- d) SHR-genisteína (10 mg/kg, por día, vía oral), n = 10

La genisteína se interpuso en 1 ml de metilcelulosa al 1%. La administración se realizó diariamente por vía oral mediante una sonda esofágica y se prolongó durante

las 5 semanas de duración del tratamiento. El peso corporal se midió cada semana. El tratamiento se interrumpió 2 días antes de la finalización del periodo experimental para estudiar los efectos a largo plazo de la genisteína sin interferencia de los efectos agudos.

### **2.1.2. Experimento II: Implicación de los mecanismos estrogénicos en los efectos de la genisteína en SHR.**

Se utilizaron 28 SHR machos que se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes grupos:

- a) SHR-vehículo (metilcelulosa al 1% p/v), n = 7
- b) SHR-genisteína (10 mg/kg, por día, vía oral), n = 7
- c) SHR-genisteína-ICI 182,780 (2,5 mg/kg, por día, s.c.), n = 7
- d) SHR-estradiol (2 mg/kg, por semana, s.c.), n = 7

La duración del tratamiento fue de 5 semanas. La genisteína, al igual que en el experimento I, se interpuso en 1 ml de metilcelulosa al 1% y se administró diariamente por vía oral mediante una sonda esofágica. El ICI 182,780 y el estradiol se disolvieron en 0,5 ml de aceite de sésamo y se administraron vía subcutánea, diariamente o una vez por semana, respectivamente. El peso corporal se midió cada semana. El tratamiento se interrumpió 2 días antes del fin del experimento.

### **2.1.3. Experimento III: Efectos protectores de la genisteína sobre la presión arterial y la función vascular en SHR ovariectomizadas.**

Esta experiencia se realizó con 32 SHR hembras que se dividieron, al azar, en 4 grupos:

- a) Control-vehículo (metilcelulosa al 1% p/v), n = 8
- b) OVX-vehículo (metilcelulosa al 1% p/v), n = 8
- c) OVX-genisteína (10 mg/kg, por día, vía oral), n = 8
- d) OVX-estradiol (2 mg/kg, por semana, s.c.), n = 8

Las ratas de los grupos OVX se anestesiaron con 2,5 ml/kg de equitensina i.p. (500 ml contienen: 43% p/v de hidrato de cloral en 81 ml de etanol; 4,86 mg de nembutal; 198 ml de propilenglicol; 10,63 g de MgSO<sub>4</sub>; agua destilada) para la extirpación de los ovarios. Los animales del grupo control fueron sometidos a la misma manipulación quirúrgica pero sin la realización de la ovariectomía. Después de la intervención quirúrgica, se esperó 3 semanas para el inicio del tratamiento que se prolongó durante 5 semanas a partir de ese punto. Los animales vehículo recibieron 1 ml de metilcelulosa 1 % p/v vía oral. La dosis de genisteína y estradiol así como los vehículos empleados y la pauta de administración, son los mismos que los utilizados en el experimento anterior. También se determinó semanalmente la evolución del peso de cada animal. Igual que en los experimentos anteriores, el tratamiento con genisteína se interrumpió 2 días antes del fin del experimento.

## **2.2. MEDIDAS DE PRESIÓN ARTERIAL**

La presión arterial sistólica se midió semanalmente, en cada tratamiento, mediante pletismografía en la cola (Duarte y cols., 2001). Las medidas se tomaron 18-20 horas después de la administración del fármaco en ratas conscientes, aisladas y precalentadas. Se realizaron, al menos, 7 determinaciones en cada sesión y se tomó como presión arterial sistólica la media de los tres valores más bajos que no diferían entre sí más de 5 mm Hg.

Al final del experimento I se midió, en 4 ratas conscientes de cada grupo, la frecuencia cardíaca y la presión arterial por registro directo. Con este objetivo, las ratas se anestesiaron con 2,5 ml/kg de equitensina. Posteriormente, se canuló la arteria femoral derecha con un catéter (PE-50) que contenía 100 U de heparina en una solución de NaCl estéril e isotónica. El catéter se introdujo subcutáneamente y se exteriorizó a través de la piel hasta el dorso del cuello. Se permitió a las ratas recuperarse durante 24 horas y tras conectar el catéter a un transductor y grabar en un registro de 2 canales (TRA-021 y Letigraph 2000, respectivamente; Letica SA, Barcelona, España), se midió de manera continua la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca durante 60 minutos.

### **2.3. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS**

Al final del periodo experimental, los animales se anestesiaron con éter etílico. Se realizó una incisión en el abdomen hasta visualizar la aorta descendente donde se procedió a la extracción de sangre utilizando una jeringa previamente heparinizada. Posteriormente, se obtuvo el plasma mediante centrifugación de esta sangre a 4000 r.p.m. durante 10 minutos. El plasma obtenido fue alicuotado y congelado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis para la determinación de los niveles de estrógenos por inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

A continuación, se procedió, rápidamente, a la extracción de los riñones, el corazón, y en el caso del tratamiento III, del útero. Los órganos se lavaron con solución Krebs fría y se secaron y pesaron para el estudio de sus cambios morfológicos, mediante el análisis de la relación del peso del órgano y peso corporal del animal. En el caso del corazón, una vez pesado, se eliminó la aurícula y el ventrículo derecho y el tejido restante (ventrículo izquierdo más septo) se volvió a pesar para calcular el índice de peso del ventrículo izquierdo y el peso del corazón.

## 2.4. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR

Los estudios de reactividad a agentes vasoconstrictores y vasodilatadores se realizaron en aortas torácicas procedentes de los distintos grupos experimentales. Para la preparación del tejido se procedió de manera similar a la descrita en el apartado 1.2.1. para los experimentos *in vitro*.

### 2.4.1. Protocolos del experimento I y II

Se valoró la función endotelial realizando curvas concentración-respuesta a ACh ( $10^{-8}$  M- $10^{-5}$  M) en anillos aórticos intactos precontraídos con fenilefrina ( $10^{-7}$  M). Las curvas concentración-respuesta relajante a NPS ( $10^{-10}$  M- $10^{-5}$  M) se efectuaron en oscuridad sobre anillos desprovistos de endotelio y precontraídos con noradrenalina  $10^{-6}$  M. Las contracciones dependientes de endotelio a ACh ( $10^{-8}$  M- $10^{-4}$  M) se ensayaron en anillos que habían sido inicialmente estimulados con KCl 80 mM e incubados durante 30 minutos con L-NAME ( $10^{-4}$  M) (ver apartado 1.2.2).

### 2.4.2. Protocolos del experimento III

En esta experiencia se estudió, igual que en las anteriores, la función endotelial. Para ello se realizaron curvas concentración-respuesta a ACh ( $10^{-8}$  M- $10^{-5}$  M) en los anillos precontraídos con fenilefrina  $10^{-6}$  M. También se efectuaron curvas concentración-respuesta a NPS ( $10^{-10}$  M- $10^{-5}$  M) en anillos desprovistos de endotelio.

Para evaluar la formación de NO basal, se midió la contracción inducida por la incubación, durante 30 minutos, con el inhibidor de la NOS, L-NAME ( $10^{-4}$  M), en anillos precontraídos con fenilefrina hasta aproximadamente, un 40 % de la contracción máxima.

En otros anillos aórticos, se observó la respuesta a distintos agentes vasoconstrictores. Para ello, se eliminó el endotelio de estos anillos y una vez

transcurrido el periodo de estabilización, se añadió al baño concentraciones crecientes acumulativas de noradrenalina ( $10^{-9}$  M- $10^{-6}$  M) cada 5 minutos o de Ang II ( $10^{-10}$  M- $10^{-6}$  M) cada 10.

## **2.5. ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO SINTASA VASCULAR**

En muestras del tratamiento I y II se estudió la actividad NOS determinando la conversión de L- $^3$ H]arginina a L- $^3$ H]citrulina (Mitchell y cols., 1991). Para ello, se homogenizaron los anillos aórticos tal y como se describió en el apartado 1.4. Las muestra homogeneizadas se incubaron a 37 °C durante 30 minutos con el tampón de reacción Tris-HCl (50 mM; pH 7,4) en presencia de NADPH (1 mM), L-valina (10 mM) y una mezcla de L-arginina y L- $^3$ H]arginina (10  $\mu$ M; 1  $\mu$ Ci/ml). Tras este periodo de tiempo se detuvo la reacción y se procedió a la separación de la L- $^3$ H]citrulina de la arginina empleando una resina de intercambio iónico (véase apartado 1.4). La actividad de la NOS dependiente de  $Ca^{2+}$  se determinó de la diferencia entre la L- $^3$ H]citrulina producida por las muestras que contenían  $Ca^{2+}$  y las muestras incubadas sin  $Ca^{2+}$  y con EGTA 1 mM. La radioactividad se midió en el sobrenadante por un contador de centelleo. Los resultados se expresaron en picomoles de L-citrulina/miligramo de proteína/30 minutos.

## **2.6. WESTERN BLOT**

### **Preparación de las muestras**

Las determinaciones se realizaron en anillos aórticos o en el ventrículo izquierdo, que se homogeneizaron en un potter de vidrio, en frío. Los homogenados se centrifugaron a 15000 g durante 30 minutos a 4 °C.

Tampón de homogenización:

- HEPES 10 mM pH = 7,4
- Sacarosa 0,32 M
- EDTA 100  $\mu$ M
- Ditioneitol 1mM
- Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo 1 mg/ml
- Leupeptina 10  $\mu$ g /ml

En el sobrenadante de los homogenados aórticos se estudió la expresión de NOSe, caveolina-1, -3, calmodulina-1 y receptor AT-1 y en el homogenado de ventrículo izquierdo, la de caveolina-1 y -3. Las proteínas se cuantificaron por Bradford (1976).

#### **Descripción de la técnica:**

Cantidades equivalentes de proteína (40  $\mu$ g para NOSe, caveolina-1, -3, calmodulina-1 y 25  $\mu$ g para receptor AT-1) de cada muestra suspendidas en tampón de carga y desnaturalizadas por ebullición durante 5 minutos, se separaron mediante electroforesis en un gel de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida (8% para NOSe, 10% para receptor AT-1 o 15% para el resto de proteínas) en un sistema de mini-gel (Bio-Rad). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y se incubaron con tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras este periodo de tiempo, se procedió a la incubación, durante toda la noche, con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-NOSe (dilución 1:2500, Transduction Laboratorios), el monoclonal de ratón anti-caveolina-1 (dilución 1:600, Transduction Laboratorios), el monoclonal de ratón anti-caveolina-3 (dilución 1:2500, Transduction Laboratorios), el policlonal de cabra anti-calmodulina-1 (dilución 1:1000, Santa Cruz Biotechnology) o el policlonal de conejo anti-receptor AT-1 (dilución 1:1000, Santa Cruz Biotechnology). Seguidamente, las

membranas se lavaron con tampón TBS-T 3 veces cambiando dicha solución cada 5 minutos, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario (1:2000, Sigma-Aldrich, Madrid, España). Tras el lavado, las membranas se incubaron con una solución ECL (PerkinElmer Life Sciences, Boston) durante 1 minuto y se expusieron a una película autoradiográfica para detectar la quimioluminiscencia. Las películas se escanearon y se realizó un análisis por densitometría usándose Scion Image-Release Beta 4.02 software.

Como un control adicional, las membranas se reusaron para estudiar la expresión de  $\alpha$ -actina. Se calculó el cociente abundancia de proteína/ $\alpha$ -actina y el resultado se presentó en comparación con el cociente de la muestra procedente de ratas WKY-control, en el experimento I, o SHR-control, en el experimento II y III, del mismo gel, al que se dio el valor 100%.

## **2.7. DETECCIÓN *IN SITU* DE LA PRODUCCIÓN VASCULAR DE $O_2^-$**

El dihidroetidio (DHE) entra en las células y es oxidado por  $O_2^-$  hasta producir etidio, que se une al ADN produciendo fluorescencia roja brillante. Para estudiar la producción vascular  $O_2^-$ , los anillos aórticos torácicos fueron incluidos en OCT (Tissue-Tek® OCT Compound, Sakura) y congelados (-80 °C). Posteriormente, mediante un criostato (Microm International Model HM500 OM), se realizaron cortes transversales de 10  $\mu$ m cada uno. Los cortes se llevaron a una cámara húmeda donde se incubaron en una solución de HEPES tamponada (en mM: NaCl 130, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 1,2, Glucosa 10, y HEPES 10, pH 7,3 con NaOH) durante 30 minutos, a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se procedió a una nueva incubación en una solución HEPES que contenía DHE ( $10^{-5}$  M) durante 30 minutos y en oscuridad. A continuación, las preparaciones se tiñieron con el marcador nuclear, dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI,  $3 \times 10^{-7}$  M), durante 5 minutos a 37 °C. Se examinaron cuatro

secciones de cada preparación en un microscopio de fluorescencia (Leica DM IRB, Wetzlar, Alemania) usando un objetivo 40x con las siguientes parejas 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 545-30 nm/ 610-75 nm para visualizar la fluorescencia roja del etidio. Las secciones se fotografiaron con una cámara digital a color Leica DC300F, y las imágenes se grabaron par ser analizadas. La fluorescencia del etidio y del DAPI se cuantificó usando ImageJ (ver 1.32j, NIH, <http://rsb.info.nih/ij/>). La producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se estimó del cociente de la fluorescencia etidio/DAPI.

## 2.8. REACTIVOS

Los reactivos procedían de Sigma Chemical, excepto el ICI 182,780, que fue amablemente cedido por AstraZeneca, Cheshire, Inglaterra.

## 2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media aritmética ± SEM. El análisis estadístico se realizó mediante el test de la t-student o utilizando un análisis ANOVA de 2 vías o de una vía seguida del test de Newman Keuls, según el caso. Se consideró estadísticamente significativa una  $P < 0,05$ . Las curvas concentración-respuesta se ajustaron a la ecuación logística  $E = E_{\max} / (1 + 10^{-k * ([\text{fármaco}] - \text{pD}_2)})$ , donde  $E_{\max}$  es el efecto máximo, k es un factor que representa la pendiente de la curva y  $\text{pD}_2$  es la concentración molar de fármaco que produce el 50 % del  $E_{\max}$  expresada como logaritmo negativo.

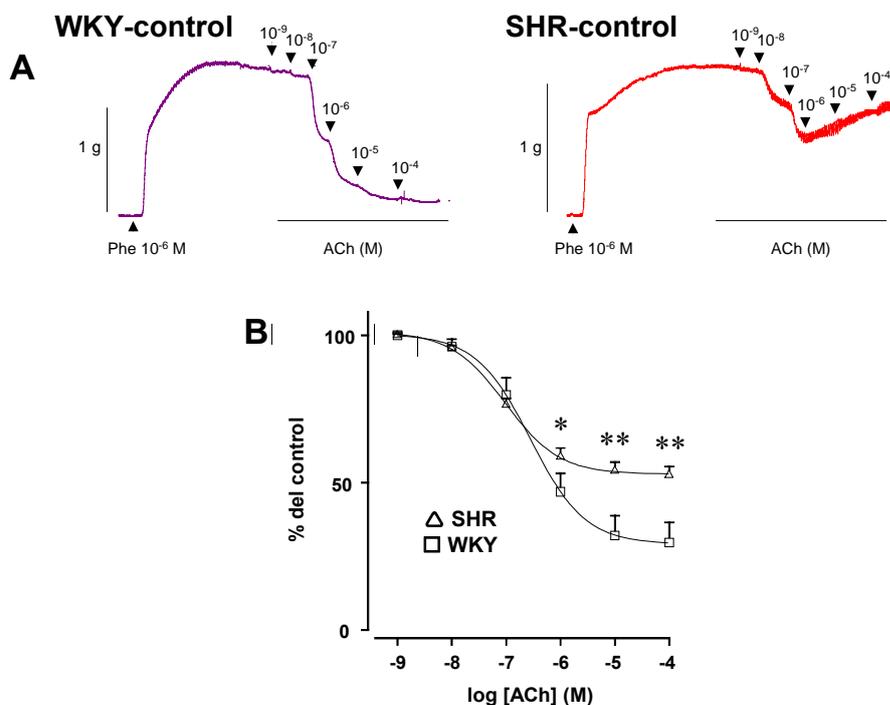
## **RESULTADOS**

---

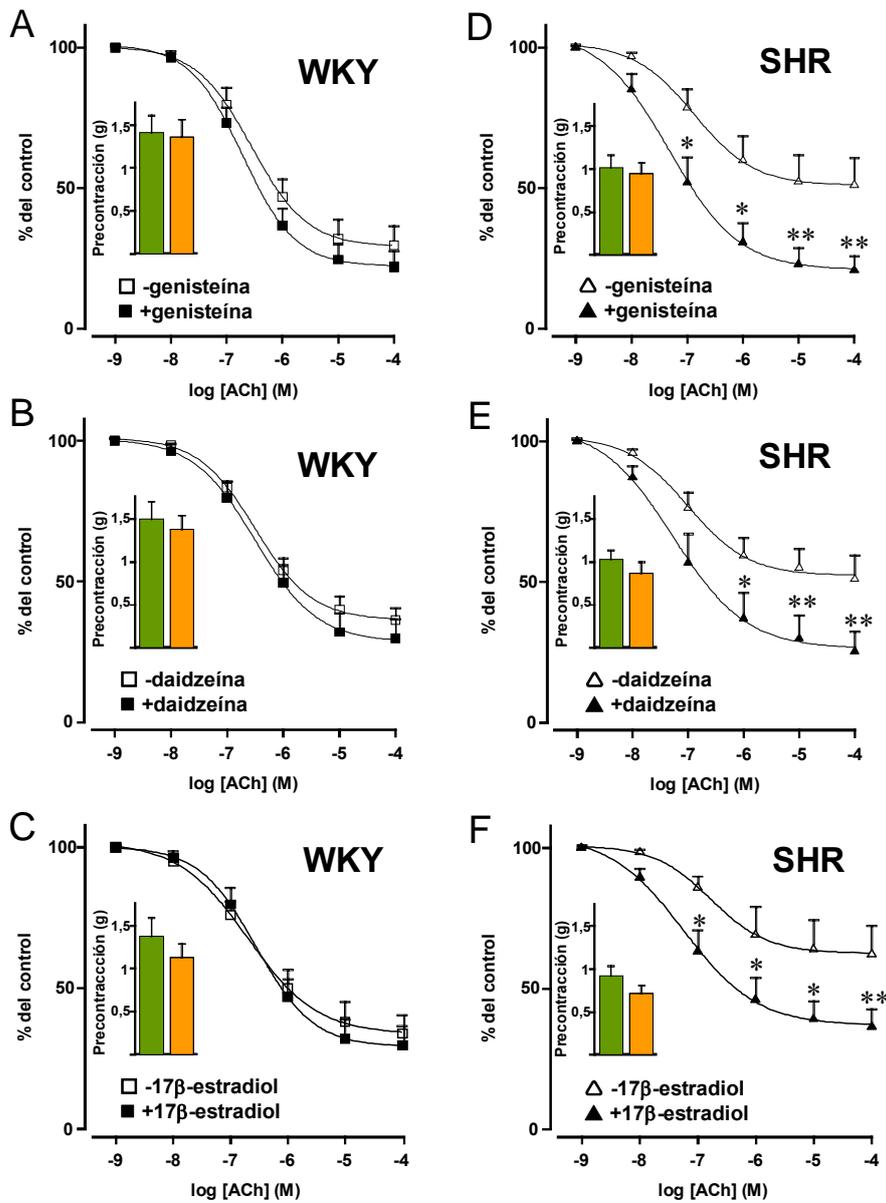
## 1. EFECTOS *IN VITRO* DE GENISTEÍNA Y DAIDZEÍNA SOBRE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN SHR

### 1.1. Efectos de las isoflavonas en la relajación inducida por acetilcolina

La relajación a ACh fue menor en los anillos aórticos procedentes de SHR en comparación con los de WKY (Figura 7;  $P < 0,01$ ). En aortas WKY que se habían incubado con genisteína, daidzeína o  $17\beta$ -estradiol, no se modificó la relajación máxima a ACh (Figura 8, A-C). Sin embargo, tanto las isoflavonas como el estrógeno aumentaron significativamente la respuesta relajante inducida por ACh en anillos SHR ( $P < 0,05$  versus vehículo; Figura 8, D-F) llegando a valores similares a los encontrados en ratas WKY.

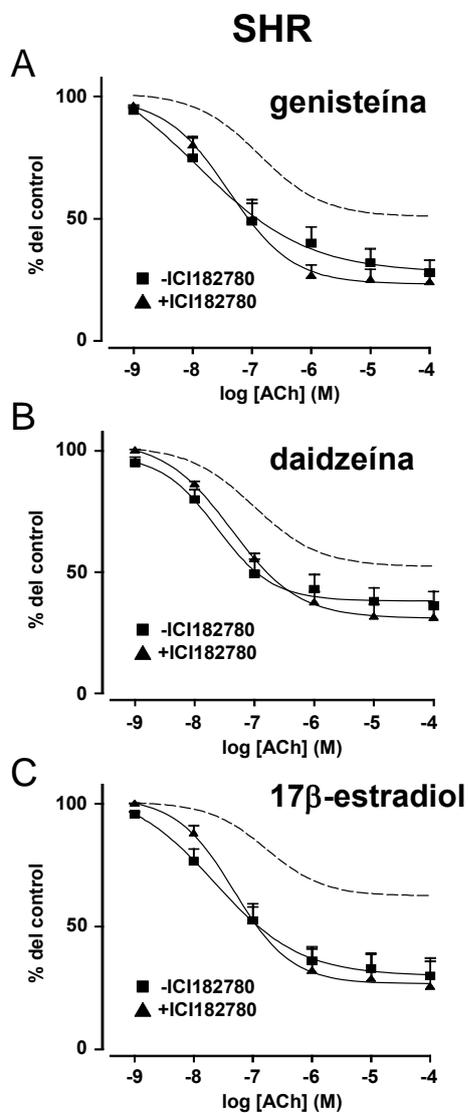


**Figura 7.** Curva concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) en anillos aórticos con endotelio contraídos con fenilefrina (Phe) procedentes de WKY o SHR. (A) Trazas representativas. (B) Los valores expresan la media  $\pm$  SEM ( $n = 9$ ). \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  WKY versus SHR.



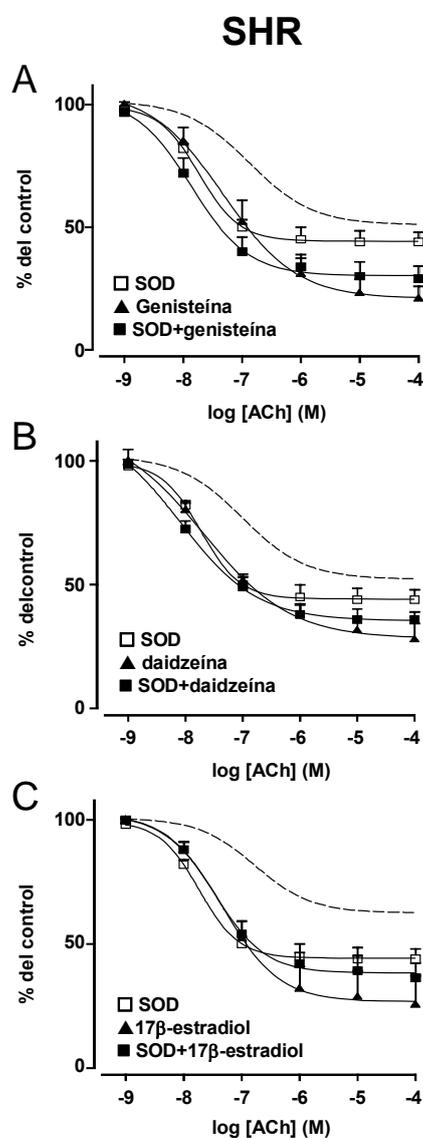
**Figura 8.** Efectos de genisteína, daidzeína y 17β-estradiol, todos a 10 μM, sobre los efectos relajantes dependientes de endotelio de la acetilcolina (ACh) en arterias contraídas con fenilefrina procedentes de WKY o SHR. Los valores expresan la media ± SEM (n = 7-10). \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 tratados versus vehículo (DMSO). Las barras muestran la intensidad de la contracción inducida por fenilefrina en presencia (columna naranja) o ausencia (columna verde) de los fármacos antes de la adición de ACh.

La incubación con el antagonista del RE, ICI 182,780, no alteró el efecto de genisteína, daidzeína o  $17\beta$ -estradiol en la respuesta relajante inducida por ACh en anillos SHR (Figura 9).



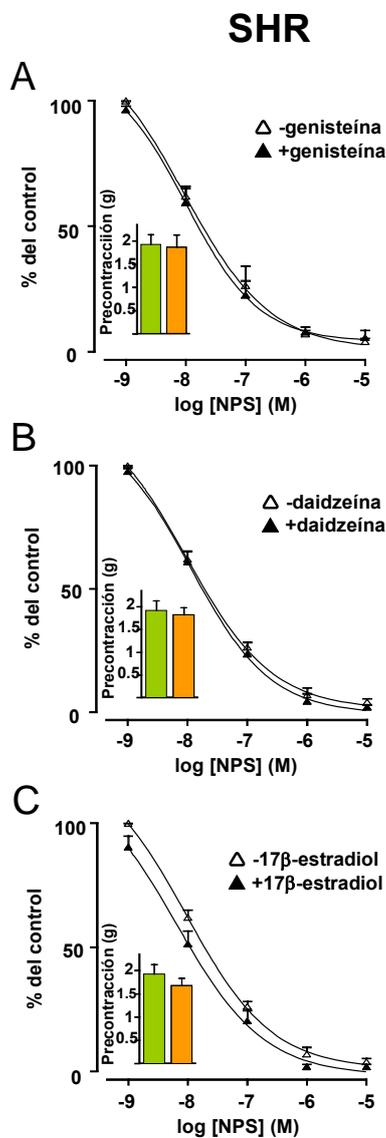
**Figura 9.** Efectos del ICI 182,780 (1  $\mu$ M) en la potenciación de la respuesta relajante a acetilcolina (ACh) de genisteína, daidzeína y  $17\beta$ -estradiol (10  $\mu$ M) en anillos aórticos SHR. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM ( $n = 6-10$ ). La línea discontinua en A, B y C indica la curva obtenida con el vehículo (procedente de la Fig. 2) para fines comparativos.

La adición de SOD (100 U/ml) al baño incrementó la relajación provocada por ACh en SHR pero no modificó la mejora en la respuesta relajante a ACh inducida por las isoflavonas o el 17 $\beta$ -estradiol (Figura 10).



**Figura 10.** Efectos de la superóxido dismutasa (SOD 100 U/ml) en la potenciación de la respuesta relajante a acetilcolina (ACh) de genisteína, daidzeína y 17 $\beta$ -estradiol (10  $\mu$ M) en anillos aórticos SHR. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM ( $n = 5-10$ ). La línea discontinua en A, B y C indica la curva obtenida con el vehículo (procedente de la Fig. 2) para fines comparativos.

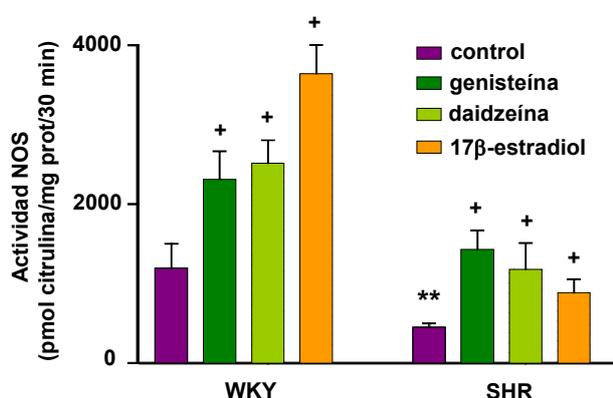
En anillos aórticos sin endotelio de SHR, no se modificó la relajación a NPS con la incubación previa con genisteína, daidzeína o  $17\beta$ -estradiol (Figura 11).



**Figura 11.** Efectos de genisteína, daidzeína y  $17\beta$ -estradiol, todos a  $10\ \mu\text{M}$ , sobre los efectos relajantes de nitroprusiato sódico (NPS) en arterias sin endotelio contraídas con fenilefrina procedentes de SHR. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM ( $n = 6-7$ ). \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  tratados versus vehículo (DMSO). Las barras muestran la intensidad de la contracción inducida por fenilefrina en presencia (columna naranja) o ausencia (columna verde) de los fármacos antes de la adición de NPS.

## 1.2. Efectos de las isoflavonas en la actividad NOS vascular

La actividad NOS, determinada por la conversión de L-[<sup>3</sup>H]arginina a L-[<sup>3</sup>H]citrulina, fue menor en los homogenados aórticos de SHR que en los de WKY (38% de los de WKY,  $p < 0,01$ ). La incubación con genisteína, daidzeína y 17 $\beta$ -estradiol incrementó la actividad tanto en los animales WKY como en los SHR (Figura 12).

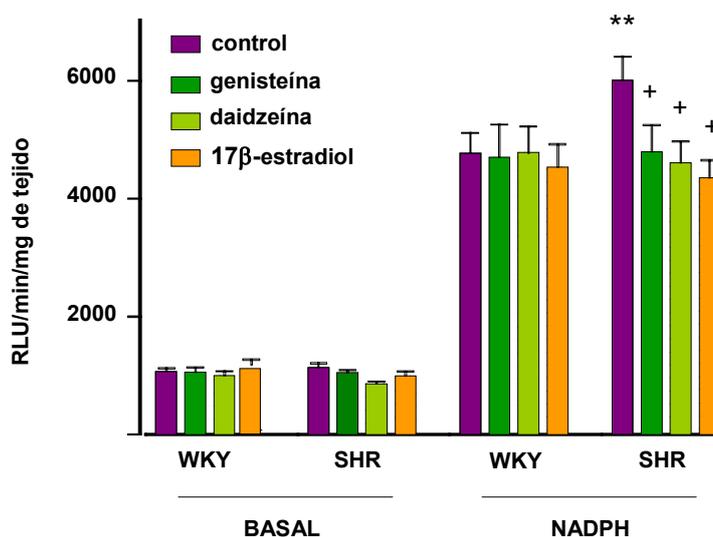


**Figura 12.** Efectos de genisteína, daidzeína y 17 $\beta$ -estradiol, todos a 50  $\mu$ M, sobre la actividad NOS en homogenados aórticos procedentes de WKY y SHR determinada por la conversión de L-[<sup>3</sup>H]arginina a L-[<sup>3</sup>H]citrulina. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). \*\*  $P < 0,01$  versus WKY; +  $P < 0,05$  tratados versus vehículo (DMSO).

## 1.3. Efectos de las isoflavonas en la producción vascular de O<sub>2</sub><sup>-</sup>

No se encontraron diferencias entre la liberación basal de O<sub>2</sub><sup>-</sup> de anillos aórticos SHR y WKY. Sin embargo, la estimulación con NADPH, aumentó los niveles de esta especie radicalaria en SHR respecto a WKY. Genisteína, daidzeína y 17 $\beta$ -estradiol inhibieron la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> pero sólo en aortas de animales hipertensos (Figura 13). La SOD (100 U/ml) suprimió la señal de quimioluminiscencia en condiciones

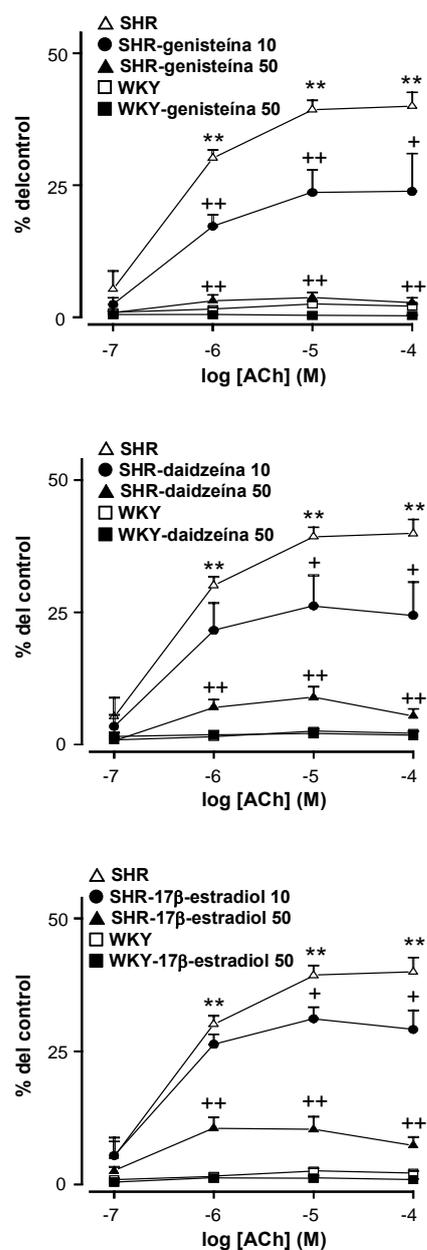
basales y estimuladas por NADPH. El inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, DPI (20  $\mu\text{M}$ ), también inhibió (por  $\sim 85\%$ ) la producción de  $\text{O}_2^-$  generada por NADPH en ambas cepas (los datos no se muestran).



**Figura 13.** Efectos de genisteína, daidzeína y 17β-estradiol, todos a 50  $\mu\text{M}$ , sobre la producción de  $\text{O}_2^-$  basal y estimulada con NADPH (100  $\mu\text{M}$ ) en arterias procedentes de WKY y SHR. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM ( $n = 7-10$ ). \*\*  $P < 0,01$  versus WKY; +  $P < 0,05$  tratados versus vehículo (DMSO).

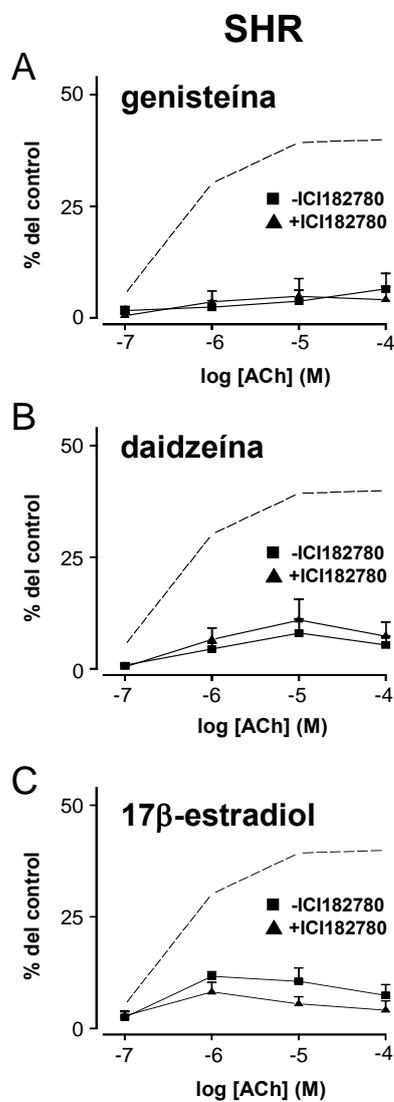
#### 1.4. Efectos de las isoflavonas en la contracción inducida por acetilcolina

La ACh produjo una respuesta contráctil en anillos aórticos de SHR previamente incubados con L-NAME, que fue casi ausente en los de WKY. Esta respuesta se suprime por el tratamiento con el inhibidor de la COX indometacina (10  $\mu\text{M}$ ; no mostrado). Genisteína, daidzeína y 17β-estradiol, inhibían la contracción producida por ACh de una forma concentración-dependiente (Figura 14, A-C).



**Figura 14.** Efectos de genisteina, daidzeina y 17 $\beta$ -estradiol, todos a 10 y 50  $\mu$ M, sobre los efectos contráctiles dependientes de endotelio de la acetilcolina (ACh) en arterias incubadas con L-NAME procedentes de WKY o SHR. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM (n = 7-10). \*\* P < 0,01 versus WKY; + P < 0,05; ++ P < 0,01 tratados versus vehículo (DMSO).

La incubación con el antagonista del RE, ICI 182,780, no alteró la reducción en la respuesta contráctil a ACh inducida por genisteína, daidzeína y 17 $\beta$ -estradiol (50  $\mu$ M) en SHR (Figura 16, A-C).



**Figura 16.** Efectos del ICI 182,780 (1  $\mu$ M) sobre la inhibición de la respuesta contráctil a acetilcolina (ACh) de genisteína, daidzeína y 17 $\beta$ -estradiol (10  $\mu$ M) en anillos aórticos SHR tratados con L-NAME (100  $\mu$ M). Los valores expresan la media  $\pm$  SEM ( $n = 5-10$ ). La línea discontinua en A, B y C indica la curva obtenida con el vehículo para fines comparativos.

### **1.5. Efectos de las isoflavonas en la liberación de prostanoides**

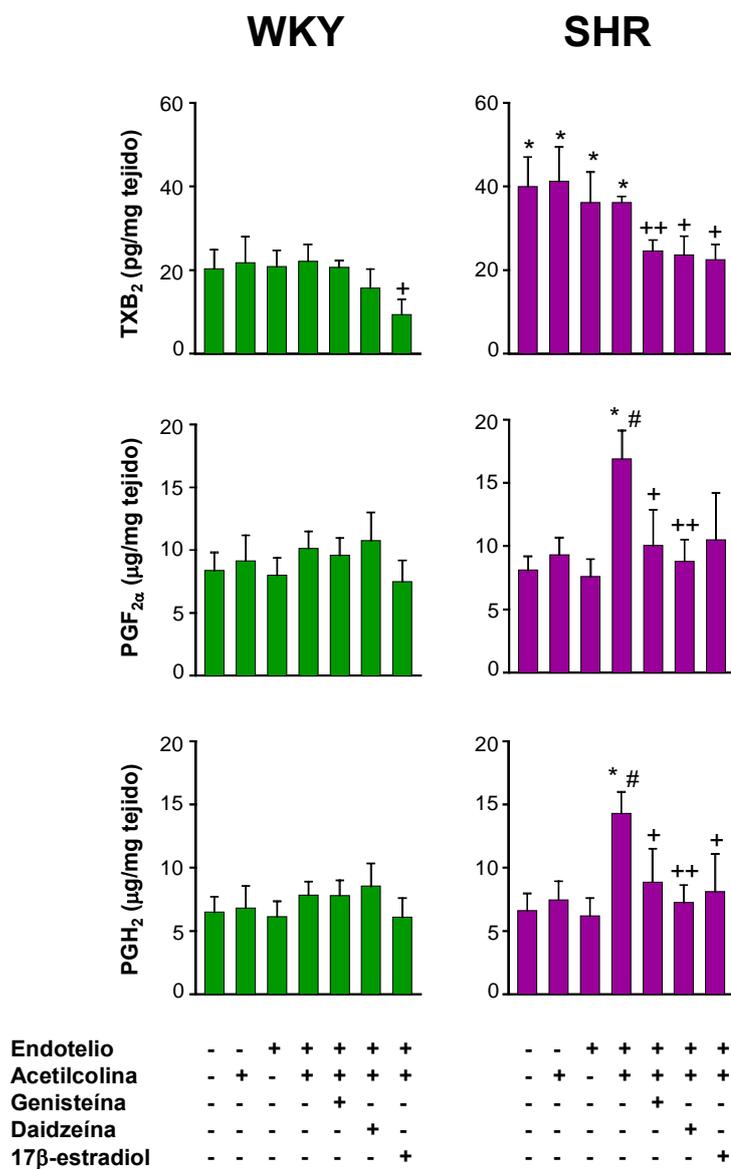
Se determinó la liberación aórtica de TXA<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> y PGH<sub>2</sub> en animales SHR y WKY, en condiciones basales y tras la estimulación con ACh (Figura 17). En WKY, ni la adición de ACh ni la eliminación del endotelio a los anillos aórticos, modificó la liberación de TXA<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> y PGH<sub>2</sub>.

La producción aórtica basal de TXA<sub>2</sub> era mayor en SHR que en WKY pero la ACh no potenció más este incremento. La incubación con genisteína, daidzeína y 17β-estradiol redujo la producción de TXA<sub>2</sub> en SHR.

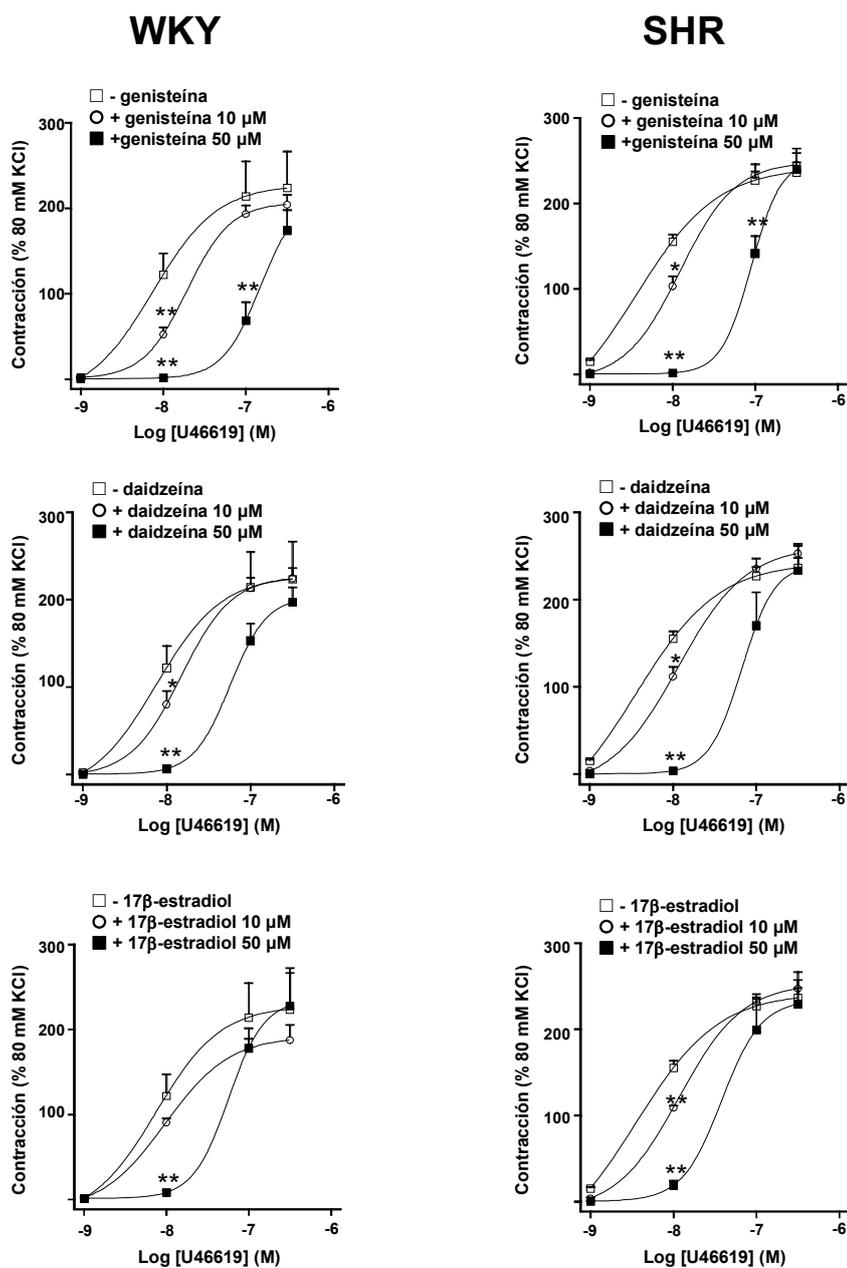
La liberación de PGF<sub>2α</sub> y PGH<sub>2</sub> de aortas con endotelio SHR, sí se incrementó tras la estimulación con ACh y este aumento se inhibió con genisteína, daidzeína y 17β-estradiol.

### **1.6. Efectos de las isoflavonas en la contracción inducida por U46619**

No se observaron diferencias en la respuesta vasoconstrictora al agonista del receptor TP, U46619, en anillos aórticos sin endotelio de SHR y WKY ( $pD_2 = 8,13 \pm 0,03$ ,  $n = 6$  y  $7,97 \pm 0,07$ ,  $n = 7$ , respectivamente;  $P > 0,05$ ). La incubación con genisteína, daidzeína y 17β-estradiol (10 y 50 μM) produjo, de manera dependiente de concentración, un desplazamiento de la curva del U46619 hacia la derecha, tanto en SHR como en WKY (Figura 18).



**Figura 17.** Efectos de genisteína, daidzeína y 17β-estradiol, todos a 10 μM, sobre la producción de TXA<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> y PGH<sub>2</sub> en el medio de incubación de anillos aórticos procedentes de WKY o SHR estimulados con acetilcolina (ACh) en presencia de L-NAME. Los valores expresan la media ± SEM (n = 7-10). # P < 0,05 ACh versus valores basales; \* P < 0,05 versus WKY; + P < 0,05 y ++ P < 0,01, respectivamente, versus anillos con endotelio tratados con ACh en ausencia de isoflavonas.

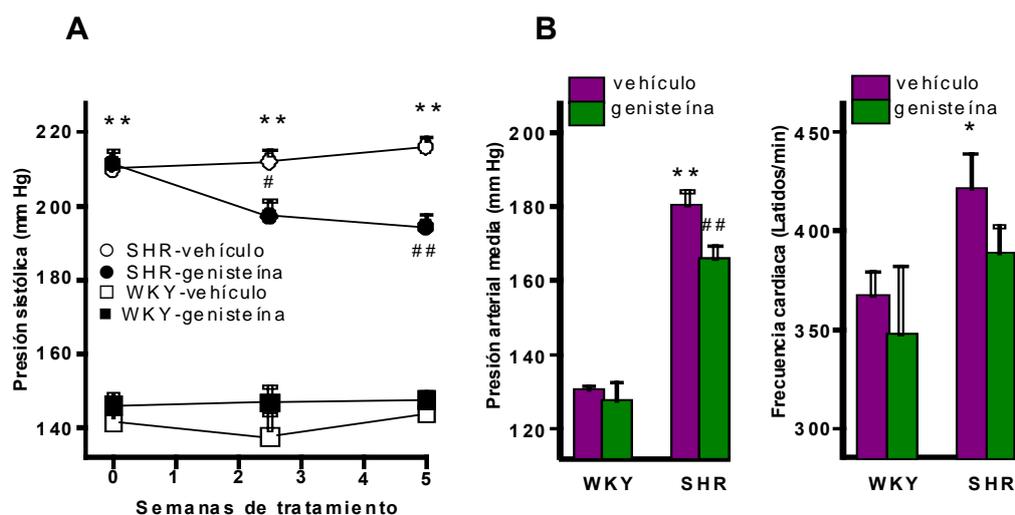


**Figura 18.** Efectos de genisteína, daidzeína y 17β-estradiol, todos a 10 y 50 μM, sobre las contracciones inducidas por U46619 en anillos aórticos desprovistos de endotelio procedentes de WKY y SHR. Los valores expresan la media ± SEM (n = 6-10). \* P < 0,05 y \*\* P < 0,01 versus anillos tratados con vehículo (DMSO).

## 2. EFECTOS DE LA GENISTEÍNA EN EL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN Y LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN SHR. IMPLICACIÓN DE MECANISMOS ESTROGÉNICOS.

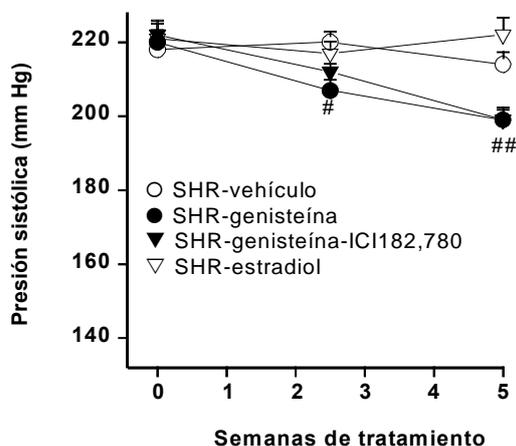
### 2.1. Presión arterial y frecuencia cardiaca

La administración crónica de genisteína redujo de forma progresiva la presión arterial en SHR alcanzando diferencias estadísticamente significativas hacia la mitad del tratamiento (segunda semana), sin provocar ningún cambio en las ratas WKY. Los valores de presión obtenidos en la cola fueron confirmados al realizar medidas de presión arterial por registro directo en animales conscientes. La frecuencia cardiaca en las SHR control era mayor que en los animales WKY control, pero la genisteína no modificó este parámetro ni en SHR ni en WKY (Figura 19).



**Figura 13.** (A) Evolución en el tiempo de la presión arterial sistólica medida mediante pletismografía en la cola de animales WKY-vehículo ( $n = 10$ ), WKY-genisteína ( $n = 10$ ), SHR-vehículo ( $n = 10$ ), SHR-genisteína ( $n = 10$ ) y (B) medidas directas de la presión arterial media y la frecuencia cardiaca de las ratas tratadas con vehículo (WKY y SHR,  $n = 4$ ) y con genisteína (WKY y SHR,  $n = 4$ ), respectivamente. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  versus WKY-vehículo; #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$  versus SHR-vehículo.

El  $17\beta$ -estradiol no cambió la evolución de la presión arterial de las SHR y el antagonista específico de RE, ICI 182,780, no alteró el efecto antihipertensivo inducido por el tratamiento crónico oral con genisteína (Figura 20).



**Figura 20.** Evolución en el tiempo de la presión arterial sistólica medida mediante pletismografía en la cola de SHR-vehículo ( $n = 7$ ), SHR-genisteína ( $n = 7$ ), SHR-genisteína-ICI 182,780 ( $n = 7$ ), SHR-estradiol ( $n = 7$ ). Los valores expresan la media  $\pm$  SEM. # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  versus SHR-vehículo.

## 2.2. Variables morfológicas

En el experimento I, el peso corporal final era significativamente menor en los animales tratados con genisteína que en los tratados con vehículo. En ratas WKY, la genisteína origina una menor ganancia de peso a lo largo del periodo experimental (WKY-vehículo =  $17,1 \pm 0,7$  %; WKY-genisteína =  $7,7 \pm 2,1$  %;  $P < 0,01$ ), mientras que en SHR no afecta a la ganancia de peso (SHR-vehículo =  $2,5 \pm 0,8$  %; SHR-genisteína =  $2,1 \pm 0,7$  %;  $P > 0,05$ ) sino que el menor peso final observado en el grupo genisteína es consecuencia de un peso inicial de los animales inferior al del grupo vehículo. De hecho, en el experimento II, el tratamiento con genisteína no modificó el peso corporal final, sin embargo, el tratamiento con  $17\beta$ -estradiol sí lo redujo

(ganancia de Pcorp en SHR-vehículo =  $1,3 \pm 0,5$  %; SHR-estradiol =  $-13,6 \pm 0,8$  %;  $P < 0,01$ ).

El índice PVI/Pcorp fue mayor en las SHR control que en las ratas WKY control. El tratamiento con genisteína y con  $17\beta$ -estradiol no modificó este parámetro. El índice PVI/PC, considerado como un índice de hipertrofia absoluta del ventrículo izquierdo, fue similar en los cuatro grupos SHR (Tabla 1 y 2).

**Tabla 1.** Peso corporal y peso de los órganos.

Grupos	Pcorp (g)	PC (mg)	PVI (mg)	PR (mg)
<i>Experimento I</i>				
WKY-vehículo (n = 10)	$362 \pm 7$	$1098 \pm 69$	$760 \pm 31$	$1044 \pm 25$
WKY-genisteína (n = 10)	$325 \pm 7$	$1022 \pm 26$	$722 \pm 17$	$989 \pm 20$
SHR-vehículo (n = 10)	$342 \pm 4^*$	$1143 \pm 25$	$863 \pm 20^*$	$1004 \pm 10$
SHR-genisteína (n = 10)	$330 \pm 4^\#$	$1123 \pm 18$	$840 \pm 20$	$951 \pm 19^\#$
<i>Experimento II</i>				
SHR-vehículo (n = 7)	$345 \pm 11$	$1272 \pm 38$	$961 \pm 34$	$1026 \pm 32$
SHR-genisteína (n = 7)	$361 \pm 6$	$1332 \pm 37$	$1014 \pm 27$	$1074 \pm 35$
SHR-genisteína-ICI182,780 (n=7)	$355 \pm 12$	$1310 \pm 57$	$1002 \pm 45$	$1002 \pm 61$
SHR-estradiol (n = 7)	$297 \pm 12^\#$	$1116 \pm 29^\#$	$847 \pm 37^\#$	$878 \pm 37^\#$

*Pcorp indica peso corporal; PC, peso del corazón; PVI, peso del ventrículo izquierdo; PR, peso del riñón. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM. En el Experimento I,  $*P < 0,05$  SHR-vehículo versus WKY-vehículo y  $^\#P < 0,05$  SHR-genisteína versus SHR-vehículo. En el Experimento II,  $^\#P < 0,05$  SHR- $17\beta$ -estradiol versus SHR-vehículo.*

**Tabla 2.** Índices cardíacos y renales.

Grupos	PVI/PC	PVI/Pcorp	PR/Pcorp
<i>Experimento I</i>			
WKY-vehículo (n = 10)	0,70 ± 0,01	2,09 ± 0,07	2,88 ± 0,03
WKY-genisteína (n = 10)	0,71 ± 0,01	2,23 ± 0,03	3,05 ± 0,05
SHR-vehículo (n = 10)	0,76 ± 0,01**	2,52 ± 0,04**	2,94 ± 0,04
SHR-genisteína (n = 10)	0,75 ± 0,01	2,55 ± 0,06	2,88 ± 0,03
<i>Experimento II</i>			
SHR-vehículo (n = 7)	0,75 ± 0,01	2,79 ± 0,12	2,94 ± 0,04
SHR-genisteína (n = 7)	0,76 ± 0,01	2,81 ± 0,06	2,97 ± 0,07
SHR-genisteína-ICI182,780 (n = 7)	0,76 ± 0,01	2,82 ± 0,10	2,81 ± 0,10
SHR-17β-estradiol (n = 7)	0,76 ± 0,01	2,87 ± 0,07	2,96 ± 0,06

*Pcorp indica peso corporal; PC, peso del corazón; PVI, peso del ventrículo izquierdo; PR, peso del riñón. Los valores expresan la media ± SEM. En el Experimento I, \*\*P < 0,01 SHR-vehículo versus WKY-vehículo. En el Experimento II, #P < 0,05 SHR-17β-estradiol versus SHR-vehículo.*

### 2.3. Reactividad vascular

En las aortas de las ratas WKY y SHR tratadas con genisteína, no se observaron diferencias en la respuesta vasodilatadora independiente de endotelio al dador de NO NPS en vasos precontraídos con noradrenalina, ni en la respuesta vasoconstrictora inducida por noradrenalina, al compararlas con sus respectivos controles de los grupos SHR y WKY (Tabla 3).

**Tabla 3.** Parámetros de la curva concentración-respuesta de factores vasoactivos independientes de endotelio.

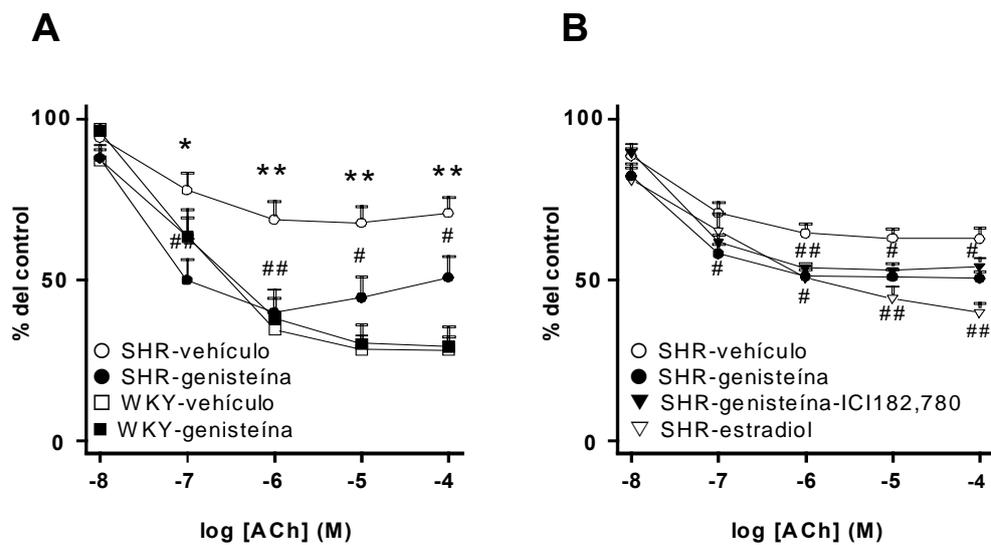
Grupos	Noradrenalina ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$ M)		NPS ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$ M)	
	- log CE <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (g)	- log CI <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)
<i>Experimento I</i>				
WKY-vehículo (n = 10)	8,27 ± 0,10	2,27 ± 0,27	7,36 ± 0,10	98,4 ± 1,0
WKY-genisteína (n = 10)	8,20 ± 0,05	2,66 ± 0,33	7,58 ± 0,17	97,8 ± 2,4
SHR-vehículo (n = 10)	7,94 ± 0,17	1,92 ± 0,26	7,36 ± 0,15	97,0 ± 2,1
SHR-genisteína (n = 10)	7,79 ± 0,10	1,92 ± 0,21	7,46 ± 0,22	96,4 ± 4,8
<i>Experimento II</i>				
SHR-vehículo (n = 7)	7,83 ± 0,06	1,30 ± 0,18	7,94 ± 0,10	99,1 ± 1,0
SHR-genisteína (n = 7)	7,89 ± 0,09	1,45 ± 0,17	7,94 ± 0,08	96,8 ± 2,4
SHR-genisteína-ICI182,780 (n=7)	7,80 ± 0,06	1,31 ± 0,08	7,86 ± 0,15	97,5 ± 2,7
SHR-estradiol (n = 7)	7,81 ± 0,07	1,48 ± 0,13	7,92 ± 0,06	100,2 ± 2,0

Los datos expresan la media ± SEM. Efecto máximo (E<sub>max</sub>) para noradrenalina se expresa como g de contracción y para nitroprusiato sódico (NPS) como porcentaje de relajación de la precontracción con noradrenalina. -log CE<sub>50</sub> es la concentración del fármaco (M) que produce el 50 % del efecto máximo expresado como el logaritmo molar negativo. -log CI<sub>50</sub> es la concentración del fármaco (M) que relaja el 50 % de la precontracción con noradrenalina expresado como el logaritmo molar negativo.

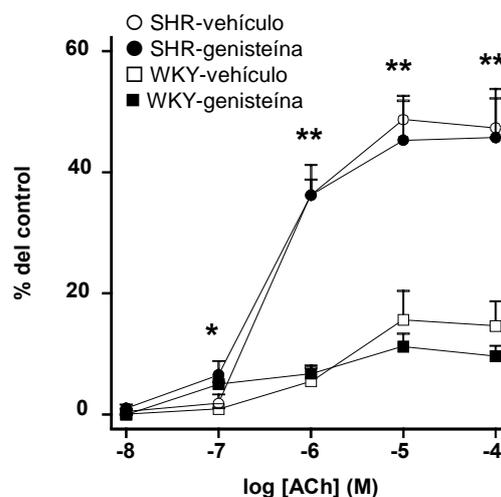
Las aortas procedentes de SHR tratadas con vehículo mostraban una menor respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio a ACh que las procedentes de WKY control (E<sub>max</sub> = 32,5 ± 5,2 % versus 71,9 ± 4,1 %, respectivamente,  $P < 0,05$ ) (Figura 15A). Además, en presencia de L-NAME ( $10^{-4}$  M), las aortas de SHR también tenían una mayor respuesta vasoconstrictora a ACh que sus correspondientes animales normotensos WKY (48,7 ± 3,9 % versus 15,6 ± 4,8 % de la respuesta a KCl 80 mM, respectivamente) (Figura 16). La genisteína potenció la relajación a ACh en SHR

(Figura 21A y 21B), sin producir cambios en la vasoconstricción dependiente de endotelio provocada por ACh (Figura 22).

El experimento II mostró que el ICI 182,780 no modificaba la mejora de la función endotelial inducida por genisteína en SHR (Figura 21B) y que, de forma similar a la genisteína, el  $17\beta$ -estradiol incrementó la vasodilatación inducida por ACh en ratas hipertensas (Figura 21B).



**Figura 15.** Relajación dependiente de endotelio inducida por acetilcolina (ACh) (A) en aortas de SHR-vehículo ( $n = 10$ ), SHR-genisteína ( $n = 10$ ), WKY-vehículo ( $n = 10$ ) y WKY-genisteína ( $n = 10$ ) y (B) en aortas de SHR-vehículo ( $n = 7$ ), SHR-genisteína ( $n = 7$ ), SHR-genisteína-ICI 182,780 ( $n = 7$ ) y SHR- $17\beta$ -estradiol ( $n = 7$ ). Las relajaciones a ACh se realizaron en arterias contraídas con fenilefrina  $10^7$ M. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  versus WKY-vehículo; # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  versus SHR-vehículo.

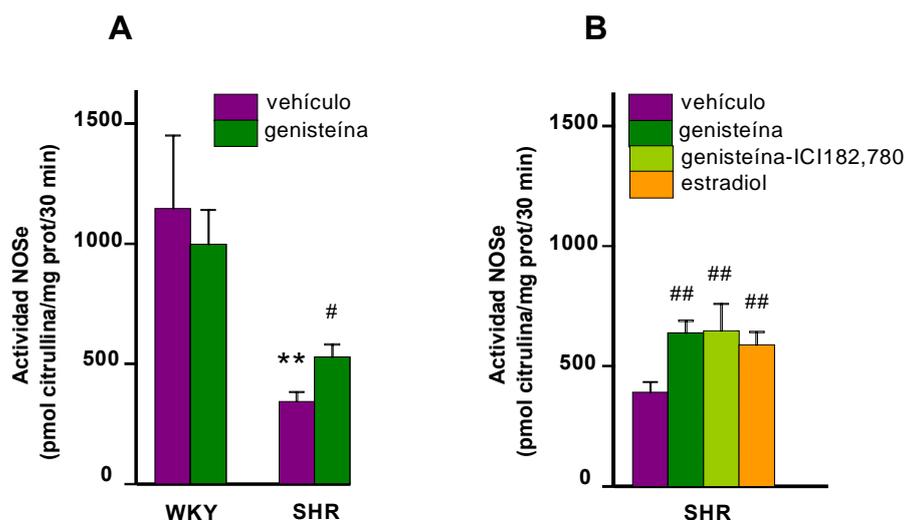


**Figura 22.** Contracción dependiente de endotelio inducida por acetilcolina (ACh) en aortas de SHR-vehículo ( $n = 10$ ), SHR-genisteína ( $n = 10$ ), WKY-vehículo ( $n = 10$ ) y WKY-genisteína ( $n = 10$ ). Las contracciones a ACh se realizaron en arterias tratadas con L-NAME ( $10^{-4}$  M) y se expresaron como porcentaje de la respuesta a KCl 80 mM. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  versus WKY-vehículo.

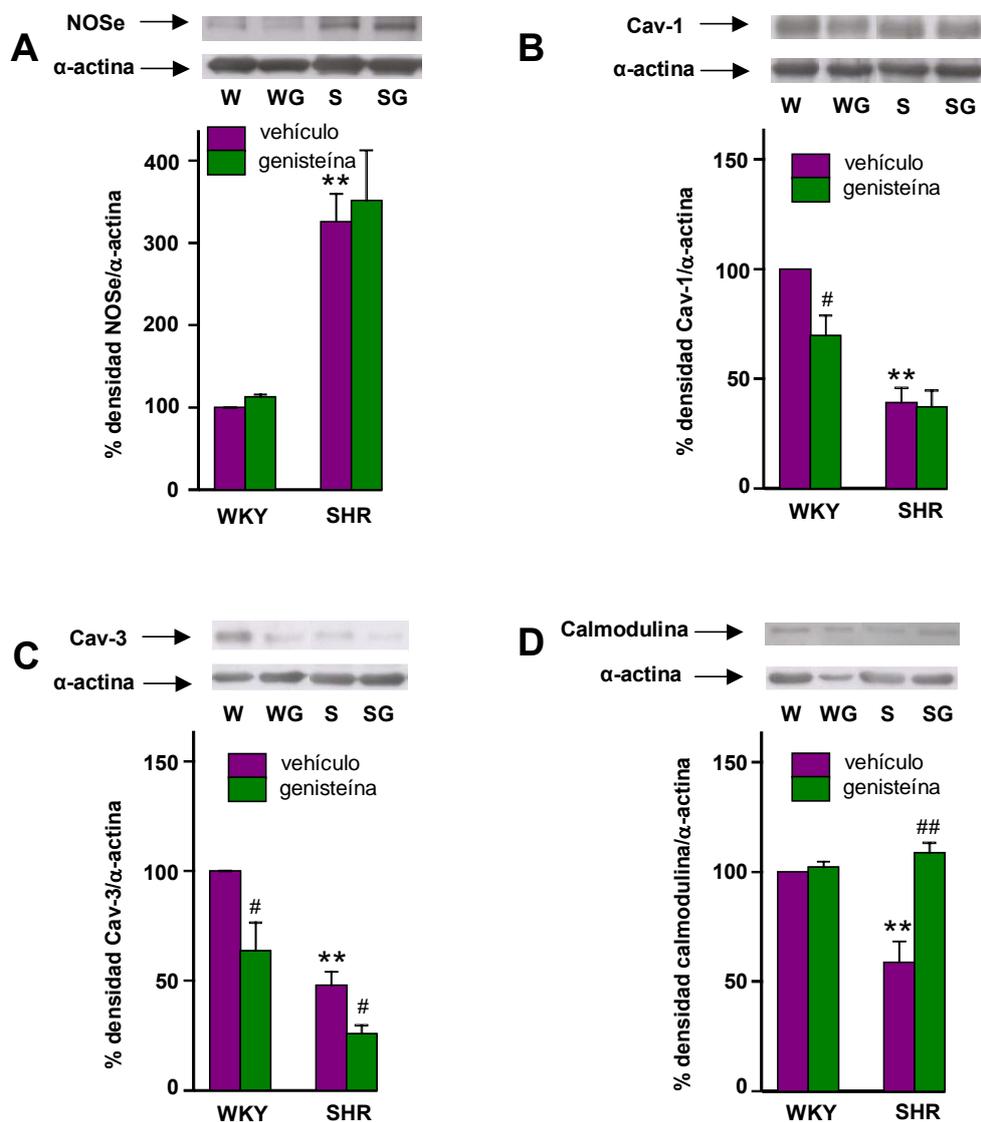
#### 2.4. Actividad NOS vascular y expresión de la NOSe y sus proteínas reguladoras

La actividad NOSe fue menor en los homogenados aórticos de SHR no tratadas que en los de WKY control (Figura 23A). Paradójicamente, la expresión de la proteína NOSe en la aorta estaba incrementada en SHR en comparación con su correspondiente grupo WKY (Figura 24A). Además, se observaron cambios en la expresión de caveolina-1 y -3, dos reguladores alostéricos negativos de la NOSe, y en la calmodulina-1 que regula positivamente la actividad de la NOSe. La expresión de la caveolina-1 y -3 y de la calmodulina-1 fue menor en aortas SHR control que en las WKY (Figura 24B, 24C y 24D).

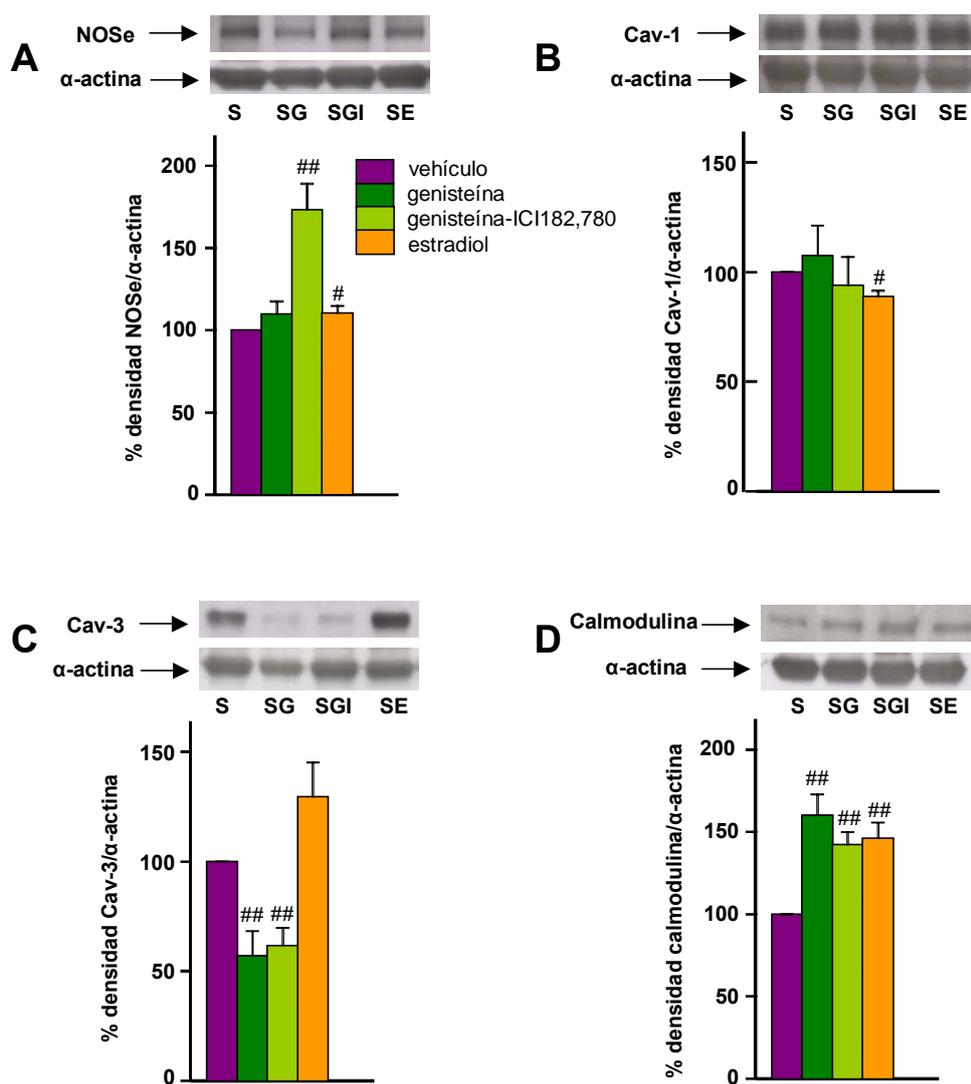
Tras el tratamiento de las SHR con genisteína, la expresión de la proteína NOSe no sufrió ningún cambio (Figura 34A) sin embargo, la genisteína redujo la expresión de la caveolina-1 en WKY (Figura 24B) y de caveolina-3 en animales WKY y SHR (Figura 24C) mientras que la calmodulina-1 se incrementó sólo en SHR (Figura 24D). Cuando tratamos las SHR con ICI 182,780 más genisteína, el ICI 182,780 no modificó ni el incremento de la actividad NOSe vascular (Figura 23B) ni los cambios en la expresión de la caveolina-3 y calmodulina inducidos por la genisteína (Figura 25C y 25D). Sin embargo, los anillos aórticos de este grupo mostraron una regulación al alza en la expresión de NOSe comparada con el grupo de genisteína (Figura 25A). De forma similar a la genisteína, los anillos aórticos SHR tratados con 17 $\beta$ -estradiol durante 5 semanas, mostraban una mayor actividad NOSe (Figura 23B). Sin embargo, el 17 $\beta$ -estradiol incrementaba la expresión de la NOSe y calmodulina-1 (Figura 25A y 25D) y reducía la de la caveolina-1 (Figura 25B).



**Figura 23.** Actividad NOSe determinada por la conversión de L-[ $^3$ H]arginina a L-[ $^3$ H]citrulina en homogenados aórticos (A) de SHR-vehículo ( $n = 10$ ), SHR-genisteína ( $n = 10$ ), WKY-vehículo ( $n = 10$ ) y WKY-genisteína ( $n = 10$ ) y (B) de ratas SHR-vehículo ( $n = 7$ ), SHR-genisteína ( $n = 7$ ), SHR-genisteína-ICI 182,780 ( $n = 7$ ) y SHR-estradiol ( $n = 7$ ). Los valores expresan la media  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0,01$  versus WKY-vehículo; # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  versus SHR-vehículo.



**Figura 24.** Western blots de las proteínas NOSe (A), caveolina-1 (B), caveolina-3 (C) y calmodulina-1 (D) en aorta (representativo de 4 experimentos) de los grupos WKY-vehículo (W), WKY-genisteína (WG), SHR-vehículo (S) y SHR-genisteína (SG), del experimento I. Los resultados se presentan como el cociente abundancia de proteína/ $\alpha$ -actina y en comparación con el cociente de la muestra procedente de ratas WKY control del mismo gel, al que se dio el valor 100%. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0,01$  versus WKY-vehículo; # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  versus SHR-vehículo.

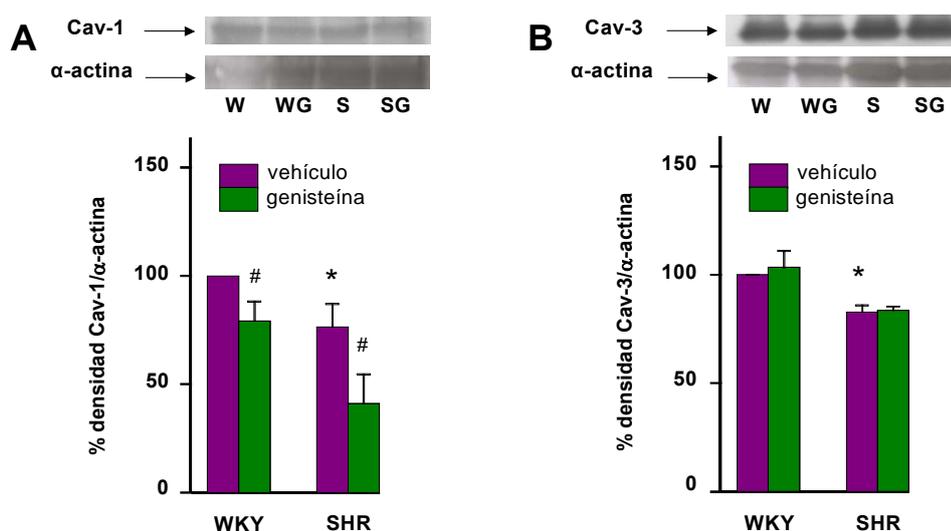


**Figura 19.** Western blots de las proteínas NOSe (A), caveolina-1 (B), caveolina-3 (C) y calmodulina-1 (D) en aorta (representativo de 4 experimentos) de los grupos SHR-vehículo (S), SHR-genisteína (SG), SHR-genisteína-ICI 182,780 (SGI) y SHR-estradiol (SE), del experimento II. Los resultados se presentan como el cociente abundancia de proteína/ $\alpha$ -actina y en comparación con el cociente de la muestra procedente del grupo SHR control del mismo gel, al que se dio el valor 100%. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM. <sup>#</sup> $P < 0,05$ , <sup>##</sup> $P < 0,01$  versus SHR-vehículo.

En arterias sin endotelio, la expresión de calmodulina-1 fue menor que en las arterias intactas, aunque no hubo diferencias entre los grupos (los datos no se muestran), lo que nos indica que los cambios en la expresión de calmodulina-1 se producen en el endotelio y no en el músculo liso.

## 2.5. Expresión de caveolina-1 y -3 en el ventrículo izquierdo

La expresión de caveolina-1 y -3 fue menor en el ventrículo izquierdo de SHR que en el de WKY control. El tratamiento con genisteína redujo la expresión de la caveolina-1 tanto en ratas WKY como en SHR sin afectar a los niveles de caveolina-3 (Figura 26).

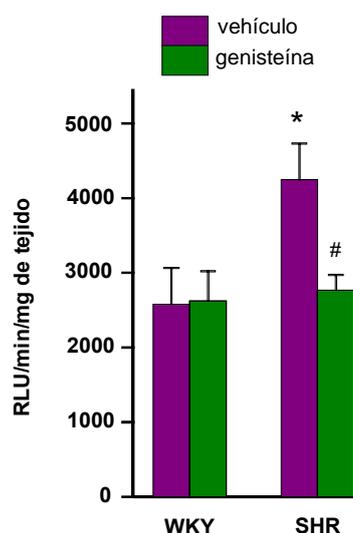


**Figura 26.** Western blots de las proteínas caveolina-1 (A) y caveolina-3 (B) en corazón (representativo de 4 experimentos) de los grupos WKY-vehículo (W), WKY-genisteína (WG), SHR-vehículo (S) y SHR-genisteína (SG), del experimento I. Los resultados se presentan como el cociente abundancia de proteína/α-actina y en comparación con el cociente de la muestra procedente de ratas WKY control del mismo gel, al que se dio el valor 100%. Los valores expresan la media ± SEM. \* $P < 0,05$  versus WKY-vehículo; # $P < 0,05$  versus SHR-vehículo.

## 2.6. Producción vascular de $O_2^-$

No se encontraron diferencias entre la liberación basal de  $O_2^-$  de anillos aórticos SHR y WKY. La estimulación con NADPH 100  $\mu$ M, aumentó los niveles de  $O_2^-$  en ambas cepas pero el incremento fue mayor en SHR que en WKY control. La incubación previa de segmentos aórticos procedentes de ratas WKY y SHR de edad similar con el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, DPI (10  $\mu$ M), suprimió el incremento inducido por NADPH (los datos no se muestran).

El tratamiento crónico con genisteína inhibió la producción de  $O_2^-$  estimulada por NADPH pero sólo en aortas SHR sin producir cambios en las de animales normotensos (Figura 27).

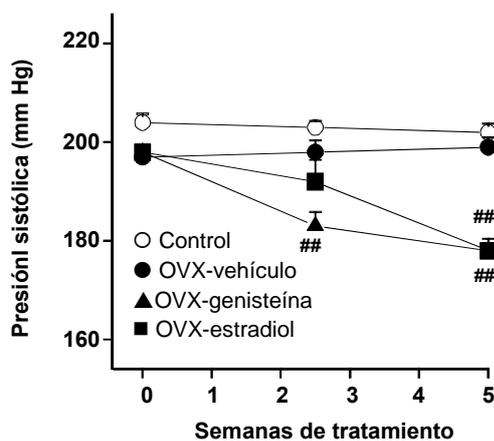


**Figura 27.** Producción de  $O_2^-$  estimulada con NADPH (100  $\mu$ M) en arterias procedentes de SHR-vehículo ( $n = 10$ ), SHR-genisteína ( $n = 10$ ), WKY-vehículo ( $n = 10$ ) y WKY-genisteína ( $n = 10$ ). Los valores expresan la media  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  versus WKY; #  $P < 0,05$  versus SHR-vehículo.

### 3. EFECTOS PROTECTORES DE LA GENISTEÍNA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL Y LA FUNCIÓN VASCULAR EN SHR OVARIECTOMIZADAS.

#### 3.1. Presión arterial

Al inicio del experimento, no se encontraron diferencias en los valores de presión arterial sistólica medida en cola entre los animales ovariectomizados y los no operados. La administración crónica de genisteína, así como la de  $17\beta$ -estradiol, produjo una reducción progresiva de la presión sistólica en SHR ovariectomizadas. Al final de las cinco semanas, la reducción fue, aproximadamente, del 10 % para los animales tratados con genisteína y  $17\beta$ -estradiol (Figura 28).



**Figura 22.** Evolución en el tiempo de la presión arterial sistólica medida mediante pletismografía en la cola de SHR control tratadas con vehículo (Control,  $n = 8$ ), SHR ovariectomizadas tratadas con vehículo (OVX-vehículo,  $n = 7$ ), SHR ovariectomizadas tratadas con genisteína (OVX-genisteína,  $n = 8$ ), SHR ovariectomizadas tratadas con  $17\beta$ -estradiol (OVX-estradiol,  $n = 8$ ). Los valores expresan la media  $\pm$  SEM.  $^{##}P < 0,01$  versus OVX-vehículo.

### 3.2. Variables morfológicas

El peso corporal final era mayor en las ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo que en las ratas sin operar y disminuía en las tratadas con  $17\beta$ -estradiol pero no en las tratadas con genisteína (Tabla 4). El peso uterino, un parámetro a largo plazo de la activación de  $RE\alpha$ , era menor en las ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo que en las sin operar y aumentó sustancialmente con el tratamiento con  $17\beta$ -estradiol mientras que la genisteína no modificó este parámetro. La ovariectomía también condujo a una disminución del peso absoluto y relativo renal que se previno por  $17\beta$ -estradiol pero no por genisteína. El peso del ventrículo izquierdo y el peso del ventrículo izquierdo referido al peso cardíaco, considerado como un índice de hipertrofia ventricular izquierda, era similar en los cuatro grupos de animales. Por tanto, los cambios en el peso del ventrículo izquierdo referido al peso corporal (Tabla 5) parecen deberse a cambios en el peso corporal más que a cambios verdaderos en el tamaño ventricular.

**Table 4.** Peso corporal y peso de los órganos.

Grupos	Pcorp (g)	PC (mg)	PVI (mg)	PR (mg)	PU (mg)
Control (n = 8)	228 ± 5	910 ± 19	684 ± 16	700 ± 18	234 ± 11
OVX-vehículo (n = 8)	252 ± 4*	891 ± 16	671 ± 12	631 ± 9*	54 ± 3*
OVX-genisteína (n = 8)	261 ± 6*	927 ± 16	703 ± 11	667 ± 16	57 ± 3*
OVX-estradiol (n = 8)	212 ± 7 <sup>#</sup>	913 ± 32	689 ± 29	680 ± 20 <sup>#</sup>	170 ± 13* <sup>#</sup>

*Pcorp* indica peso corporal; *PC*, peso del corazón; *PVI*, peso del ventrículo izquierdo; *PR*, peso del riñón; *PU*, peso uterino. Los valores expresan la media ± SEM. \* $P < 0,05$  versus Control; <sup>#</sup> $P < 0,05$  versus OVX-vehículo.

**Table 5.** Índices cardíacos y renales.

Grupos	PVI/PC	PVI/Pcorp	PR/Pcorp
Control (n = 8)	0,75 ± 0,01	3,00 ± 0,05	3,07 ± 0,06
OVX-vehículo (n = 8)	0,75 ± 0,01	2,67 ± 0,04*	2,51 ± 0,03*
OVX-genisteína (n = 8)	0,76 ± 0,01	2,70 ± 0,05*	2,56 ± 0,04*
OVX-estradiol (n = 8)	0,75 ± 0,01	3,25 ± 0,11 <sup>#</sup>	3,22 ± 0,07 <sup>#</sup>

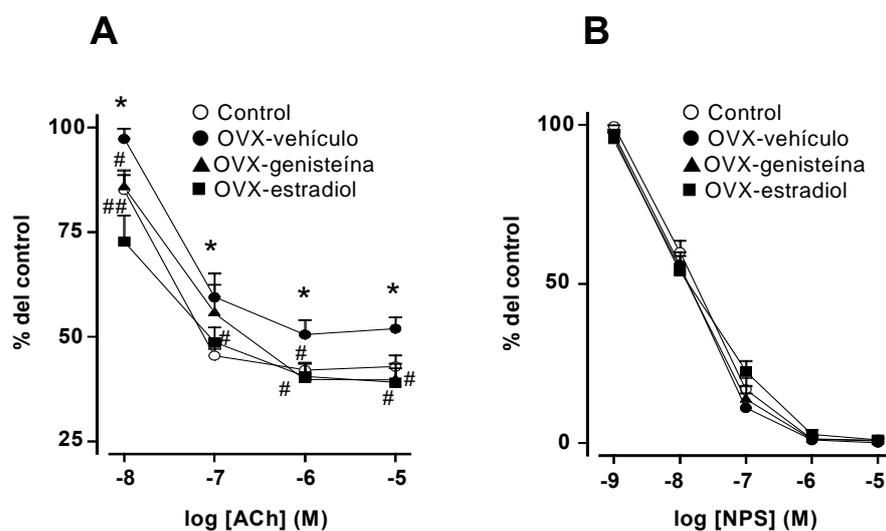
*Pcorp* indica peso corporal; *PC*, peso del corazón; *PVI*, peso del ventrículo izquierdo; *PR*, peso del riñón. Los valores expresan la media ± SEM. \**P* < 0,05 versus Control; <sup>#</sup>*P* < 0,05 versus OVX-vehículo.

### 3.3. Niveles de estrógenos en plasma

Los niveles plasmáticos de estradiol estaban significativamente reducidos en SHR ovariectomizadas tratadas con placebo o genisteína (valores no detectados en ambos grupos) en comparación con los animales control ( $25,7 \pm 3,7$  pg/ml, n = 4) y se normalizaban con el tratamiento con  $17\beta$ -estradiol ( $29,7 \pm 3,6$  pg/ml, n = 4).

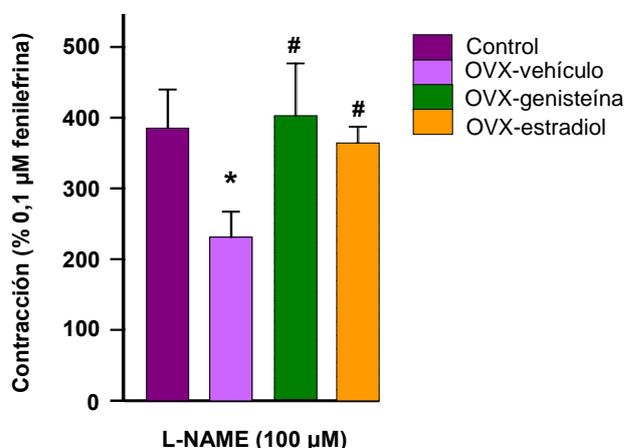
### 3.4. Reactividad vascular

En anillos aórticos precontraídos, la relajación dependiente de endotelio inducida por ACh, era menor en las aortas procedentes de ratas ovariectomizadas (Figura 29A). Sin embargo, no se observaron diferencias en la respuesta vasodilatadora independiente de endotelio a NPS entre animales sin operar y ovariectomizados (Figura 29B). El tratamiento con genisteína o  $17\beta$ -estradiol aumentó la relajación inducida por ACh de anillos aórticos de ratas ovariectomizadas (Figura 29A) sin afectar a la respuesta del NPS (Figura 29B).



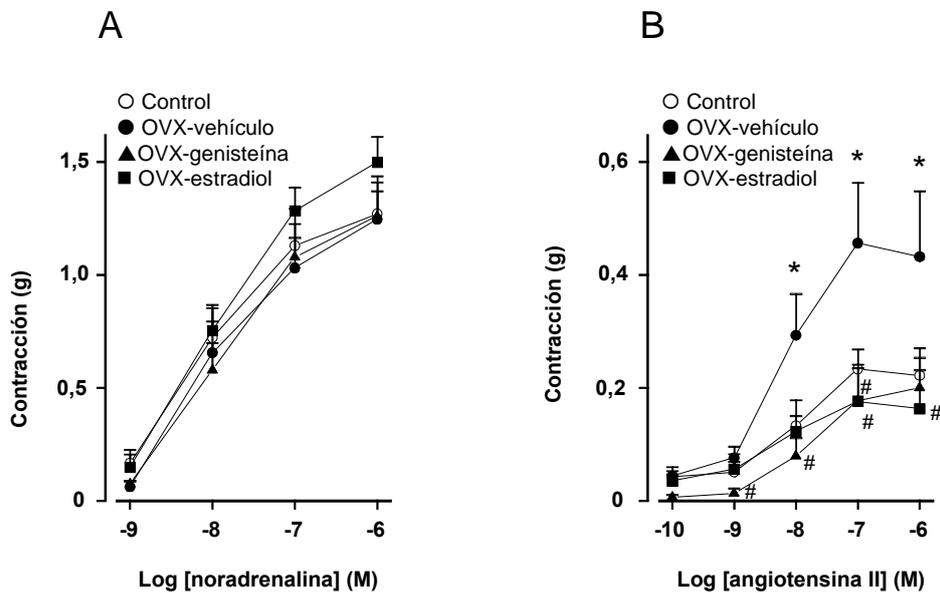
**Figura 29.** Relajación dependiente de endotelio inducida por acetilcolina (ACh) (A) y relajación independiente de endotelio inducida por nitroprusiato sódico (NPS) (B) en aortas de SHR control tratadas con vehículo (Control,  $n = 8$ ), SHR ovariectomizadas tratadas con vehículo (OVX-vehículo,  $n = 8$ ), SHR ovariectomizadas tratadas con genisteína (OVX-genisteína,  $n = 8$ ) y SHR ovariectomizadas tratadas con  $17\beta$ -estradiol (OVX-estradiol,  $n = 8$ ). Las relajaciones a ACh se realizaron en arterias contraídas con fenilefrina  $10^{-6}$  M y las relajaciones a NPS en anillos precontraídos con noradrenalina  $10^{-6}$  M. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  versus Control, # $P < 0,05$  y ## $P < 0,01$  versus OVX-vehículo.

El inhibidor de la NOS L-NAME, indujo una contracción mayor en los animales sin operar que en los ovariectomizados (Figura 30) lo que indica una formación de NO basal reducida en las SHR ovariectomizadas. Esta contracción se incrementó por genisteína o  $17\beta$ -estradiol en anillos procedentes de ratas ovariectomizadas lo que sugiere una formación mayor de NO en estos vasos.



**Figura 30.** Contracción inducida por *L-NAME* (100  $\mu\text{M}$ ) en anillos aórticos de SHR control tratadas con vehículo (Control,  $n = 8$ ), SHR ovariectomizadas tratadas con vehículo (OVX-vehículo,  $n = 8$ ), SHR ovariectomizadas tratadas con genisteína (OVX-genisteína,  $n = 8$ ) y SHR ovariectomizadas tratadas con  $17\beta$ -estradiol (OVX-estradiol,  $n = 8$ ). Las anillos se contraieron con fenilefrina (0,1  $\mu\text{M}$ ) hasta aproximadamente el 40 % de la contracción máxima. La contracción a *L-NAME* se presenta como porcentaje de la respuesta a fenilefrina. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  versus Control, # $P < 0,05$  versus OVX-vehículo.

No se observaron diferencias en la respuesta vasoconstrictora inducida por noradrenalina de ratas sin operar y ovariectomizadas (Figura 21A). Sin embargo, las contracciones a Ang II fueron mayores tras la ovariectomía (Figura 31B). El tratamiento con genisteína o  $17\beta$ -estradiol redujo las contracciones provocadas por Ang II de anillos aórticos de SHR ovariectomizadas sin afectar a la respuesta a noradrenalina (Figura 31A).

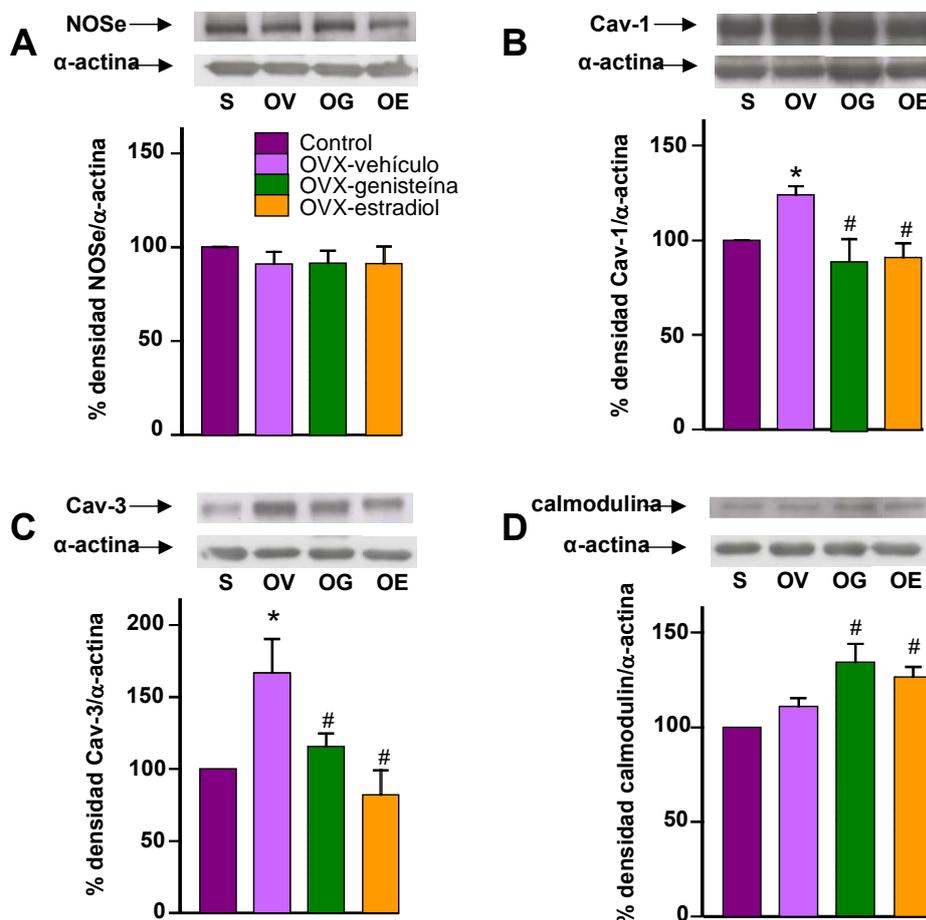


**Figura 31.** Contracción inducida por noradrenalina (A) y angiotensina II (B) en anillos aórticos sin endotelio de SHR control tratadas con vehículo (Control,  $n = 8$ ), SHR ovariectomizadas tratadas con vehículo (OVX-vehículo,  $n = 8$ ), SHR ovariectomizadas tratadas con genisteína (OVX-genisteína,  $n = 8$ ) y SHR ovariectomizadas tratadas con  $17\beta$ -estradiol (OVX-estradiol,  $n = 8$ ). Se presenta como fuerza de contracción (g). Los valores expresan la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  versus Control, # $P < 0,05$  versus OVX-vehículo.

### 3.5. Expresión de la NOSe y sus proteínas reguladoras y del receptor AT-1 en aorta de rata

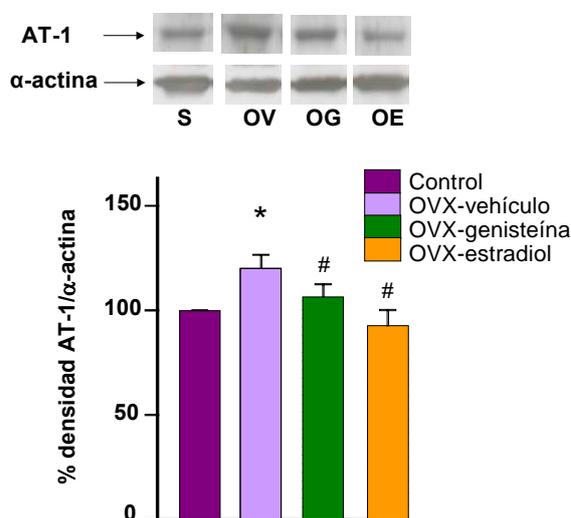
La expresión de la proteína NOSe fue la misma en ratas ovariectomizadas que en ratas control (Figura 32A). Tras esto, se examinó los cambios en la expresión de caveolina-1 y -3, dos reguladores alostéricos negativos de la NOSe, y de calmodulina-1, que regula positivamente la actividad de la NOSe. La expresión de la caveolina-1 y -3 fue mayor en aortas de SHR ovariectomizadas que en las de no operadas (Figura 32B y 32C) mientras que no hubo cambios en la calmodulina-1 (Figura 32D).

Después del tratamiento de las ratas ovariectomizadas con genisteína o  $17\beta$ -estradiol durante cinco semanas, la expresión de la NOSe no se modificó (Figura 32A), mientras que la de caveolina -1 y la -3 se redujo (Figura 32B y 32C) y la de calmodulina-1 se incrementó (Figura 32D).



**Figura 32.** Western blots de las proteínas NOSe (A), caveolina-1 (B), caveolina-3 (C) y calmodulina-1 (D) en aorta (representativo de 4 experimentos) de SHR control tratadas con vehículo (Control, S) SHR ovariectomizadas tratadas con vehículo (OVX-vehículo, OV), SHR ovariectomizadas tratadas con genisteína (OVX-genisteína, OG) y SHR ovariectomizadas tratadas con  $17\beta$ -estradiol (OVX-estradiol, OE). Los resultados se presentan como el cociente abundancia de proteína/ $\alpha$ -actina y en comparación con el cociente de la muestra procedente de ratas control del mismo gel, al que se dio el valor 100%. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  versus Control, # $P < 0,05$  versus OVX-vehículo.

La expresión del receptor AT-1 fue mayor en aortas de ratas ovariectomizadas que en las aortas de los animales no operados (Figura 33). El tratamiento con genisteína o  $17\beta$ -estradiol normalizó la expresión de este receptor.

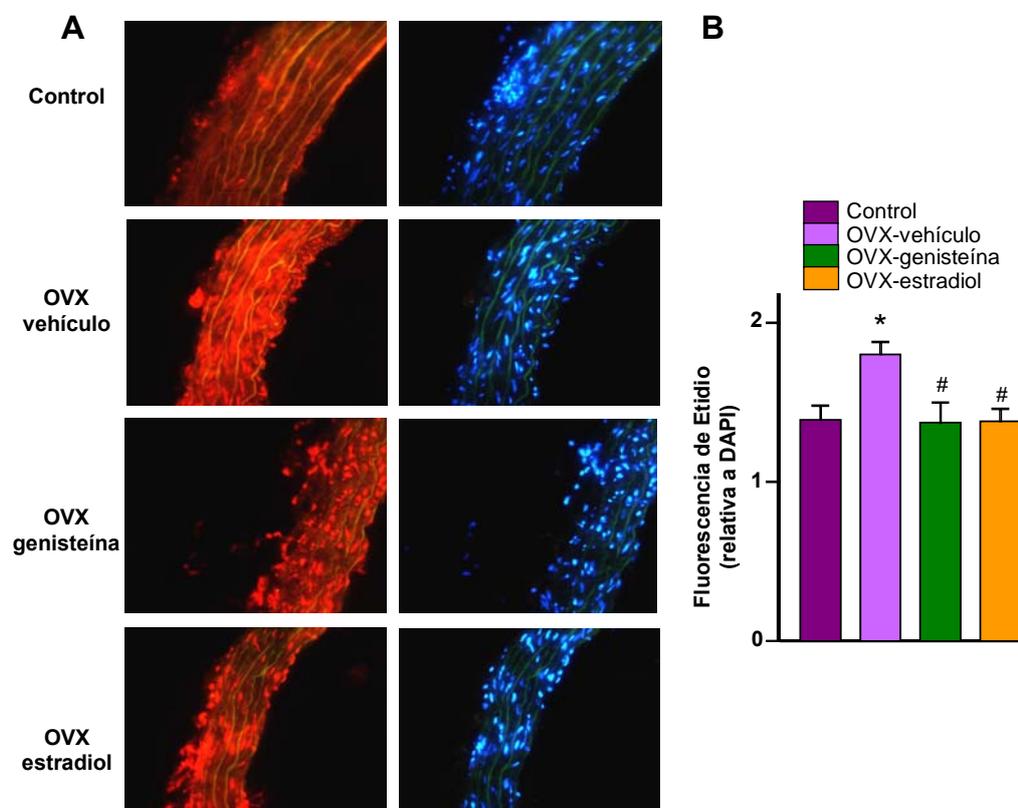


**Figura 33.** Western blots del receptor AT-1 en aorta (representativo de 4 experimentos) de SHR control tratadas con vehículo (Control, S), SHR ovariectomizadas tratadas con vehículo (OVX-vehículo, OV), SHR ovariectomizadas tratadas con genisteína (OVX-genisteína, OG) y SHR ovariectomizadas tratadas con  $17\beta$ -estradiol (OVX-estradiol, OE). Los resultados se presentan como el cociente abundancia de proteína/ $\alpha$ -actina y en comparación con el cociente de la muestra procedente de ratas control del mismo gel, al que se dio el valor 100%. Los valores expresan la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  versus Control, # $P < 0,05$  versus OVX-vehículo.

### 3.6. Detección *in situ* de la producción de $O_2^-$ en aorta de rata

Para estudiar la producción de  $O_2^-$  en la pared vascular, se analizó la fluorescencia roja de etidio en secciones de aorta previamente incubadas con DHE. Los núcleos rojos se observaron en el endotelio, la capa media y la adventicia (Figura 34A). La fluorescencia roja se cuantificó y los datos se normalizaron con la fluorescencia azul del marcador nuclear DAPI (Figura 34B). Los anillos de SHR ovariectomizadas mostraban mayor señal en la adventicia, media y en el endotelio que los de ratas sin operar. La señal de anillos aórticos procedentes de animales ovariectomizados tratados

con genisteína o  $17\beta$ -estradiol era similar a la de los anillos de los no operados (Figura 34A y 34B).



**Figura 34.** Localización *in situ* de la producción de  $O_2^-$  en anillos aórticos. (A) Las imágenes de la izquierda muestran las arterias incubadas con DHE que produce fluorescencia roja cuando se oxida a etidio por  $O_2^-$  con la autofluorescencia verde de la elastina. Las imágenes de la derecha muestran la fluorescencia azul del marcador nuclear DAPI con la autofluorescencia verde de la elastina (400 x). (B) Los valores medios de fluorescencia roja de etidio relativa a la azul del DAPI en arterias SHR control tratadas con vehículo (Control), SHR ovariectomizadas tratadas con vehículo (OVX-vehículo), SHR ovariectomizadas tratadas con genisteína (OVX-genisteína) y SHR ovariectomizadas tratadas con  $17\beta$ -estradiol (OVX-estradiol). \* $P < 0,05$  versus Control, # $P < 0,05$  versus OVX-vehículo.

## DISCUSIÓN

---

## 1. EFECTOS *IN VITRO* DE GENISTEÍNA Y DAIDZEÍNA SOBRE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN SHR

En este estudio, demostramos por primera vez que los fitoestrógenos derivados de la soja, genisteína y daidzeína, así como el estrógeno natural  $17\beta$ -estradiol, mejoran la función endotelial en arterias aisladas de animales machos hipertensos, restableciendo la respuesta vasodilatadora e inhibiendo las contracciones dependientes de endotelio a ACh. Esta observación confirma experiencias previas realizadas en animales hembras, donde el tratamiento con genisteína mejoraba la respuesta dependiente de endotelio a agonistas en arterias coronarias ateroscleróticas de monos hembra (Honore y cols., 1997) y en anillos aórticos de ratas ovariectomizadas (Squadrito y cols., 2000). Por tanto, el presente estudio indica que el efecto de las isoflavonas no parece ser específico de género.

También se conoce que la administración crónica, vía oral, de genisteína incrementa la vasodilatación dependiente de endotelio a ACh *ex vivo* en SHR (Kitayama y cols., 2002). En nuestro estudio, genisteína, daidzeína y  $17\beta$ -estradiol, incrementan la relajación dependiente de endotelio en arterias de SHR tras la incubación *in vitro* y a corto plazo, lo que indica que estos efectos se producen de forma aguda y directamente sobre la pared de los vasos excluyéndose cambios en la expresión de genes o en mecanismos neurohumorales.

La ACh se usa ampliamente para estudiar la función endotelial en la hipertensión y en la enfermedad isquémica cardíaca (Vanhouette, 1996). Estimula receptores muscarínicos de células endoteliales y conduce a la síntesis y liberación de numerosos factores vasoactivos. Entre ellos se incluyen el NO, sustancias vasodilatadoras derivadas de la COX ( $PGI_2$ ), sustancias vasoconstrictoras derivadas de la COX ( $TXA_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGH_2$ ) y FHDE, que contribuyen a la variación de respuestas dependiente de endotelio en función del vaso estudiado y de las condiciones experimentales. Por tanto, la respuesta a ACh (vasodilatación o vasoconstricción) depende de la actividad de estas vías y del tono vascular preexistente.

El NO es el vasodilatador más importante liberado por el endotelio y en algunos vasos, como en la aorta de rata, la vasodilatación dependiente de endotelio se debe casi exclusivamente a la liberación de NO (Vanhoutte y Millar, 1985; Nagao y cols., 1992). Además, la reducida biodisponibilidad del NO es un suceso clave en la patogénesis de la disfunción endotelial que se produce en la hipertensión y en otras enfermedades vasculares (Vanhoutte, 1996).

Los niveles reducidos de NO en la pared de los vasos pueden deberse a:

- 1) una disminución de la síntesis de NO, y/o
- 2) un incremento en la oxidación del NO por ERO.

Respecto a la primera afirmación, se han encontrado datos muy dispares sobre los cambios en la actividad y en la expresión de la NOS aórtica de SHR, habiéndose descrito tanto una regulación al alza como una inhibición de dicha enzima (Chou y cols., 1998; Vaziri y cols., 1998; Zecchin y cols., 2003). En este estudio, hemos encontrado una menor actividad NOS en SHR que en WKY. Las isoflavonas y el 17 $\beta$ -estradiol incrementaban la actividad NOS de homogenados aórticos en ambas cepas. Sin embargo, no está clara la contribución de este aumento de la actividad a la mejora de la relajación dependiente de endotelio en SHR, puesto que el aumento de la actividad de lo NOS no produjo cambios en la relajación de aortas WKY.

Respecto al segundo punto, en numerosos trabajos se ha asociado el exceso en la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> con la destrucción del NO y la disfunción endotelial de SHR (Suzuki y cols., 1995; Cai y Harrison, 2000). De hecho, hemos encontrado que el tratamiento exógeno con SOD mejoraba la relajación inducida por ACh en anillos SHR. Además, en nuestro estudio, la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> estimulada por NADPH era mayor en anillos aórticos SHR que en los anillos WKY y esta producción era fuertemente disminuida por DPI, que es un inhibidor de las enzimas que contienen flavina como la NAD(P)H oxidasa, principal fuente de O<sub>2</sub><sup>-</sup> de las células vasculares (Mohazzab y cols., 1994). También encontramos que genisteína, daidzeína y 17 $\beta$ -estradiol sólo reducían la producción aórtica de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en anillos SHR pero no en los WKY. Estos resultados sugieren que genisteína y daidzeína no actúan como

captadores (“scavenger”) de  $O_2^-$  (Ruiz-Larrea y cols., 1997) sino que reducen específicamente la elevada actividad NAD(P)H oxidasa de SHR. Además, la SOD no incrementó la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio a la ACh en arterias que habían sido tratadas con las isoflavonas o el  $17\beta$ -estradiol. Este dato nos indica que el efecto inhibitor de la generación vascular de  $O_2^-$  originado contribuye a la mejora de la función endotelial de SHR inducida por estos fármacos, puesto que la adición de un “scavenger” como la SOD, no potencia su efecto beneficioso sobre la función endotelial.

Por tanto, la mayor biodisponibilidad de NO en presencia de genistéina, daidzeína y  $17\beta$ -estradiol parece que se debe a un incremento en la síntesis de NO y a una disminución de la producción de  $O_2^-$  asociada a la NAD(P)H oxidasa. Este último efecto, además de la potenciación de la relajación mediada por NO e inducida por ACh, se produjo sólo en SHR. Estos efectos protectores no se deben a un aumento de la sensibilidad de las CMLV al NO en SHR, puesto que ni las isoflavonas ni el  $17\beta$ -estradiol modificaban la respuesta relajante independiente de endotelio inducida por el donador de NO, NPS.

Además de la reducida biodisponibilidad del derivado endotelial NO, la liberación de factores vasoconstrictores derivados del endotelio en respuesta a la estimulación con ACh está incrementada en SHR y puede que contrarreste los efectos de los factores relajantes derivados del endotelio (Iwama y cols., 1992; Ge y cols., 1995; Vanhoutte, 1996). La activación de la COX-1 endotelial provoca la producción de estos factores contráctiles que activan los receptores TP de las CMLV (Yang y cols., 2003). Así, los inhibidores de la COX aumentan la relajación e inhiben las contracciones inducidas por la ACh en SHR (Ge y cols., 1995).

Las contracciones dependientes de endotelio provocadas por la ACh en aortas SHR se asocian a una mayor expresión de la COX-1, a una elevada liberación de  $PGH_2$  y a una hipersensibilidad del músculo liso a este prostanóide, pero no se afectan por inhibidores de la síntesis de tromboxano (Ge y cols., 1995; Yang y cols., 2003).

De acuerdo con esto, en el presente estudio, la ACh induce contracciones y liberación de PGH<sub>2</sub> (pero no de TXA<sub>2</sub>) dependiente de endotelio en SHR, mientras que eran casi ausentes en WKY. Genisteína, daidzeína y 17β-estradiol reducían estas contracciones y la liberación de PGH<sub>2</sub> provocada por ACh en SHR. La inhibición de la COX-1 (Rosenstock y cols., 1997; Wang y cols., 2000) podría estar involucrada en estos efectos. Sin embargo, los efectos inhibitorios de las isoflavonas se observaron sólo en SHR, lo que sugiere que no inhiben a la COX como tal, sino que reducen la elevada actividad que ésta enzima presenta en SHR.

Se ha sugerido que el O<sub>2</sub><sup>-</sup> endotelial y la producción de peróxido de hidrógeno, que, a su vez, activan a la COX-1 (Yang y cols., 2003), contribuyen en las contracciones dependientes de endotelio inducidas por ACh en aortas SHR. Por tanto, el efecto inhibitorio de las isoflavonas y el estrógeno natural 17β-estradiol, en la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> estimulada por NADPH en SHR, tal vez justifique la reducción específica de la liberación endotelial de PGH<sub>2</sub> en SHR.

Además, genisteína, daidzeína y 17β-estradiol inhibían la respuesta contráctil al agonista del receptor TP U46619, en anillos sin endotelio de ambas cepas, lo que estaba de acuerdo con estudios previos realizados en varios lechos vasculares de animales normotensos (Martinez y cols., 2000; Janssen y cols., 2001). Las isoflavonas y el estrógeno producían, de forma concentración-dependiente, un desplazamiento de la curva al U46619 hacia la derecha. Estos efectos sugieren una inhibición competitiva de los receptores TP, que está de acuerdo con el desplazamiento competitivo del [<sup>3</sup>H]U46619 provocado por genisteína y daidzeína en plaquetas (Nakashima y cols., 1991).

Por tanto, parece que genisteína, daidzeína y 17β-estradiol disminuyen las contracciones dependientes de endotelio por un doble mecanismo: inhibiendo la síntesis de PGH<sub>2</sub> a nivel endotelial y reduciendo su acción en la CMLV.

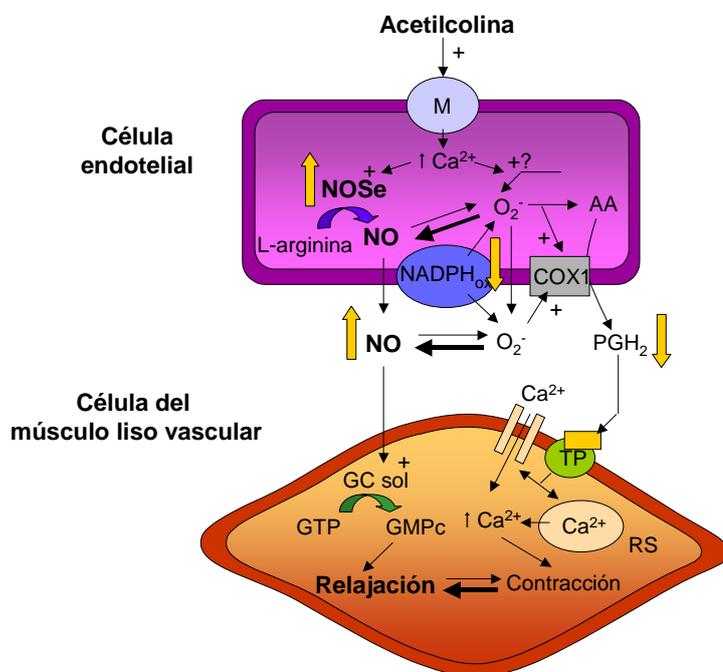
La genisteína y la daidzeína son estructuralmente muy similares, difieren sólo en la sustitución de la posición 5 (grupo hidroxilo ausente en la daidzeína), y ambas muestran analogía estructural con el 17β-estradiol. Las dos isoflavonas interaccionan

con el RE con mayor selectividad por el receptor  $\beta$  que por el  $\alpha$ , siendo la genisteína de 10 a 100 veces más potente que la daidzeína (Kuiper y cols., 1998). Por tanto, genisteína y daidzeína pueden actuar uniéndose al RE y ejercer efectos en los tejidos vasculares semejantes a los del estrógeno (Makela y cols., 1999). Sin embargo, a pesar de la respuesta similar de las isoflavonas y el  $17\beta$ -estradiol, no pudimos confirmar que el RE clásico medie estos efectos porque el ICI 182,780, antagonista específico del RE  $\alpha$  y  $\beta$ , no modificó los efectos de genisteína, daidzeína y  $17\beta$ -estradiol ni en la relajación ni en la contracción inducida por ACh. Este hecho está de acuerdo con estudios que muestran que la mejora de la función endotelial, consecuencia de la administración aguda de estos fármacos, no se afecta por el ICI 182,780 (Karamsetty y cols., 2001).

La genisteína es también un inhibidor bien conocido de una amplia variedad de tirosín kinasas (Ogawara y cols., 1989), pero la daidzeína (Ogawara y cols., 1989) y el  $17\beta$ -estradiol (Von Eye Corleta y cols., 1992) carecen de esta actividad sobre tirosín kinasas. El perfil similar de los tres compuestos sobre la actividad NOS, la producción de  $O_2^-$  estimulada por NADPH, la liberación de  $PGH_2$  y las contracciones inducidas por U46619, sugiere que la inhibición de la tirosín kinasa no está involucrada en estos efectos de la genisteína.

Estos resultados demuestran que los fitoestrógenos genisteína y daidzeína, actúan como el estrógeno natural  $17\beta$ -estradiol, restableciendo la función endotelial en SHR. Este efecto no parece estar mediado por la activación del RE o por la inhibición de tirosín kinasas. Las causas de la mejora de la relajación a ACh en anillos aórticos SHR son el aumento de la actividad NOS y el efecto protector de la inactivación de NO provocada por el  $O_2^-$  generado del sistema NAD(P)H oxidasa. Además, las isoflavonas y el estradiol inhiben las contracciones dependientes de endotelio a ACh en SHR reduciendo la liberación endotelial de  $PGH_2$  y su respuesta vasoconstrictora inducida por la activación del receptor TP (Figura 35). Estos resultados pueden explicar los

efectos protectores agudos de estos compuestos en la disfunción endotelial de la hipertensión.



**Figura 35.** Mecanismos involucrados en los efectos protectores de las isoflavonas sobre la respuesta endotelial provocada por acetilcolina en aortas de SHR. AA=ácido araquidónico; GMPc=GMP cíclico; COX1=ciclooxigenasa 1; M=receptor muscarínico; NO=óxido nítrico; NOSe=óxido nítrico sintasa endotelial; NADPH<sub>ox</sub>=NAD(P)H oxidasa; O<sub>2</sub><sup>-</sup>=aniones superóxido; PGH<sub>2</sub>=prostaglandina H<sub>2</sub>; GC sol=guanilato ciclasa soluble; RS=retículo sarcoplásmico; TP=receptores TP; +=activación; ?=lugar de formación desconocido. Cambios de actividad y niveles: ↑=aumento, ↓=disminución. Bloqueo de receptor: ■

## 2. EFECTOS DE LA GENISTEÍNA EN EL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN Y LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN SHR. IMPLICACIÓN DE MECANISMOS ESTROGÉNICOS

Los principales hallazgos del presente estudio son:

- 1) El tratamiento crónico vía oral de machos SHR con la isoflavona de la soja genisteína (10 mg/kg), redujo la presión arterial y restableció la vasodilatación dependiente de endotelio, asociada a NO, sin producir efectos en WKY.
- 2) La mejora de la disfunción endotelial inducida por la genisteína en SHR está acompañada con un incremento en la actividad NOS, consecuencia de los cambios en la expresión de sus proteínas reguladoras, produciéndose una reducción de la caveolina-3 y un aumento de la expresión de la calmodulina-1. Además, la genisteína redujo la producción vascular de  $O_2^-$  estimulada por NADPH en SHR.
- 3) Todos estos cambios no se deben a la activación de REs puesto que la administración crónica conjunta con el antagonista del RE, ICI 182,780, no modificó los efectos protectores de la genisteína.

En el apartado anterior describimos como *in vitro*, los fitoestrógenos derivados de la soja, genisteína y daidzeína, y el estrógeno natural  $17\beta$ -estradiol, mejoran la función endotelial en arterias aisladas de animales machos hipertensos, restableciendo la alterada respuesta vasodilatadora a ACh. De manera análoga a Kitayama y cols. (2002), nosotros también hemos encontrado que el tratamiento crónico vía oral con genisteína incrementa la vasodilatación dependiente de endotelio a ACh en machos SHR pero no en los WKY. Como se comentó anteriormente, en aorta de rata, la vasodilatación originada por la ACh se debe casi enteramente, a la liberación endotelial de NO y a la subsiguiente activación de la GCs en las CMLV (Vanhoutte y

Millar, 1985; Nagao y cols., 1992). En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos observado que, la vasodilatación independiente de endotelio inducida por el activador de la GCs NPS, es similar en SHR y WKY, y no se afecta por la genisteína. Este dato nos indica que la disfunción endotelial y la mejora provocada por la genisteína se deben a cambios en la biodisponibilidad del NO derivado del endotelio más que a efectos posteriores en las CMLV.

La alteración de la vasodilatación dependiente de endotelio también puede ser causada por cambios en la liberación de sustancias vasoconstrictoras derivadas de endotelio (Auch-Schwelk y cols., 1990; Yang y cols., 2003). De hecho, conforme con investigaciones previas (Auch-Schwelk y cols., 1990) y nuestros estudios *in vitro*, las SHR mostraban una elevada respuesta vasoconstrictora dependiente de endotelio inducida por ACh en arterias tratadas con el inhibidor de la NOS L-NAME. Esta respuesta se suprime por el antagonista del receptor del tromboxano, SQ-29,548 (Yang y cols., 2003), indicándose así la participación de los prostanoïdes vasoconstrictores liberados por el endotelio. Sin embargo, el tratamiento crónico con genisteína no modificó la vasoconstricción inducida por la ACh lo que sugiere que el efecto protector de la genisteína en la función endotelial no es debido a cambios en la vasoconstricción dependiente de endotelio.

Todos estos datos indican que la genisteína mejora la función endotelial en SHR incrementando la biodisponibilidad del NO. Los mecanismos implicados pueden ser:

- 1) Cambios en la actividad y/o expresión de la NOSe.
- 2) Disminución en los niveles vasculares de  $O_2^-$  y, por lo tanto, una reducción de la inactivación de NO provocada por  $O_2^-$  (Xu y cols., 2004; estudios *in vitro*).

En relación con el primer punto, sabemos que la NOSe es la principal fuente de NO del endotelio. La NOSe está cuantitativamente asociada con las caveolinas, proteínas estructurales de la caveola que inhiben a la NOSe (Feron y cols., 1996; Garcia-Cardena y cols., 1997; Ju y cols., 1997). La estimulación de la célula con agonistas que movilizan  $Ca^{2+}$  promueve que la calmodulina se una a la NOSe y se

disocie de la caveolina activándose la enzima. Por tanto, la caveolina-1 y -3 así como la calmodulina, modulan la actividad catalítica de la NOSe regulando la producción de NO y sus efectos biológicos.

La síntesis reducida de NO asociada a la disfunción endotelial puede estar causada por muchos factores tales como una alterada expresión de la NOSe, modificaciones post-transduccionales de la enzima (modificaciones en la fosforilación o en ácidos grasos), interacciones con proteínas de choque calórico (HSP90) y caveolinas, o concentraciones subóptimas del sustrato L-arginina o del cofactor BH<sub>4</sub> (Huang, 2003).

En consonancia con estudios previamente publicados (Vaziri y cols., 1998), hemos hallado que la actividad basal de la NOS en aorta de SHR era menor que en la de WKY lo que trae consigo una menor relajación dependiente de endotelio y unos niveles de presión arterial más altos. En nuestro estudio, la genisteína aumentó la actividad de la NOS en SHR, lo que contribuye a explicar, al menos en parte, la mejora de la relajación dependiente de endotelio inducida por la ACh. Este efecto no se observó en WKY lo que sugiere que la genisteína no interfiere directamente con el sitio catalítico de la NOSe sino más bien en su expresión, en la abundancia de cofactores o de otras proteínas que interactúan con la NOSe. Ya comentamos, que los datos publicados sobre la regulación de la expresión de la NOSe vascular en SHR son dispares; se ha descrito tanto una disminución (Chou y cols., 1998) como un incremento de la expresión de la proteína NOSe (Vaziri y cols., 1998; Piech y cols., 2003) con respecto a WKY. Las razones posibles de esta discrepancia son las diferencias en la edad de sacrificio y en la cepa de SHR utilizada. En nuestro estudio, en contraste con la reducida actividad de la NOS, la expresión de la NOSe aórtica era mayor en SHR que en WKY y este incremento de la NOSe se acompañaba con una reducción de la expresión de la caveolina-1 y -3. De acuerdo con Piech y cols. (2003), los cambios en la expresión de la NOSe y sus reguladores alostéricos, como las caveolinas, pueden entenderse como un mecanismo compensatorio para mantener la producción de NO activo en caso de un elevado estrés oxidativo. De hecho, nosotros

hemos encontrado que agentes que reducen la producción vascular de  $O_2^-$  y el estrés oxidativo, como la quercetina, de forma compensatoria, reducen la expresión de la NOSe y aumentan la de caveolina-1 (Sánchez y cols., 2006). A pesar de estos cambios en la expresión proteica, la actividad NOSe está aumentada, posiblemente por un menor desacoplamiento de la NOSe consecuencia de la menor oxidación del cofactor  $BH_4$  (Landmesser y cols., 2003).

El aumento de la actividad de la NOS en SHR inducido por la genisteína puede ser debido, al menos en parte, a una menor expresión de caveolina-3 (regulador negativo de la NOSe) y a una regulación al alza de calmodulina-1 (regulador positivo de la NOSe) a pesar de no producirse cambios en la expresión de la NOSe. Por tanto, la disminución en la caveolina-3 y el incremento de la calmodulina, pueden conducir a una hiperactividad de la NOS y a un aumento en la producción de NO.

En relación con el segundo apartado, sabemos que entre las ERO, el  $O_2^-$  juega un papel crítico en la inactivación del NO, y la disfunción endotelial en SHR se ha asociado en muchas publicaciones con una excesiva generación de  $O_2^-$  (Suzuki y cols., 1995; Cai y Harrison, 2000). De hecho, en nuestro estudio *in vitro* la incubación con SOD mejora la relajación de los anillos aórticos inducida por ACh en SHR. Además, en un estudio de nuestro grupo de investigación recientemente publicado (Sánchez y cols., 2006) hemos demostrado que el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa apocinina, también mejora esta respuesta relajante, lo que sugiere que la excesiva producción de  $O_2^-$  por el sistema NAD(P)H oxidasa vascular es el responsable de la disfunción endotelial en estos animales hipertensos.

En la presente Tesis Doctoral también hemos encontrado que la producción de  $O_2^-$  estimulada por NADPH es mayor en anillos aórticos de SHR que en los de WKY. Además, la genisteína reduce sólo la producción aórtica de  $O_2^-$  estimulada por NADPH en anillos de SHR pero no en los WKY. Estos datos sugieren que la genisteína reduce específicamente la hiperactividad del sistema NAD(P)H oxidasa en SHR. Los mecanismos implicados en este efecto se desconocen.

Por tanto, el aumento en la biodisponibilidad de NO inducido por el tratamiento crónico con genisteína, parece ser debido al aumento de la síntesis de NO y la reducción de la producción de  $O_2^-$ .

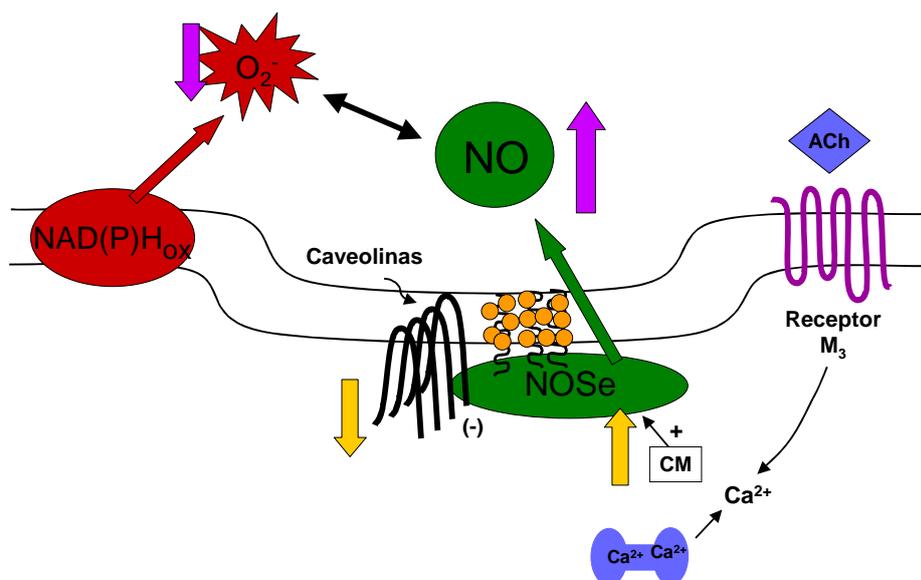
Una de las causas más importantes de desarrollo de hipertrofia cardiaca es la elevación mantenida de la presión arterial (Frohlich y cols., 1992). Nuestros resultados muestran que la hipertensión conduce a un incremento en el índice PVI/Pcorp, una medida de hipertrofia ventricular relativa, y en PVI/PC, una medida de hipertrofia ventricular absoluta. El tratamiento con genisteína no afectó a ningún parámetro de hipertrofia cardiaca. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en ratas hipertensas ovariectomizadas (Nevala y cols., 2002). La carencia de efectos protectores de la genisteína en la hipertrofia cardiaca de SHR, a pesar de sus efectos antihipertensores, puede deberse a: i) el pequeño grado de reducción de presión arterial, insuficiente para reducir la hipertrofia cardiaca asociada a la hipertensión arterial; ii) los cambios en la expresión en las caveolinas cardiacas inducidos por la genisteína. Las caveolinas interaccionan directamente con muchos receptores de factores de crecimiento como los de factor de crecimiento epidérmico, PDGF y VEGF, lo que origina una inhibición de su función (Couet y cols., 1997; Liu y cols., 1999; Yamamoto y cols., 1999). De hecho, la expresión de caveolinas es significativamente más baja en adultos SHR que en WKY (Fujita y cols., 2001, resultados presentes). El tratamiento crónico con genisteína redujo la expresión de la caveolina-1 cardiaca en SHR y en WKY, sin producir cambios en la caveolina-3. Por tanto, podemos especular que la inhibición de la señal de los factores de crecimiento por las caveolinas podría jugar un papel facilitador del desarrollo de la hipertrofia cardiaca tras el tratamiento con genisteína.

Como hemos comentado anteriormente, la genisteína es un ligando del  $RE\alpha$  y del  $RE\beta$  que muestra una mayor afinidad por el receptor  $\beta$  (Makela y cols., 1999; Kuiper y cols., 1997). Squadrito y cols. (2000) demostraron que la genisteína ejercía efectos

protectores similares en la función endotelial al  $17\beta$ -estradiol en ratas ovariectomizadas. En nuestros experimentos *in vitro* también observamos la respuesta similar de las isoflavonas y del estradiol. En el presente estudio *in vivo*, tanto el  $17\beta$ -estradiol como la genisteína, potencian la relajación dependiente de endotelio a ACh y la actividad NOS en SHR, sin embargo, encontramos diferencias en la expresión de NOSe y sus proteínas reguladoras: el  $17\beta$ -estradiol incrementa la NOSe y disminuye la caveolina-1, mientras que la genisteína no tiene efectos sobre la NOSe y reduce la caveolina-3. Estos resultados sugieren la implicación de mecanismos diferentes en la regulación de la NOSe (posiblemente de RE $\beta$  para genisteína y de RE $\alpha$  y RE $\beta$  para  $17\beta$ -estradiol). Sin embargo, la interacción de la genisteína con el RE ha sido excluida puesto que la administración conjunta con el antagonista del RE, ICI 182,780, no modificó los cambios inducidos por la genisteína sobre la presión arterial, la función endotelial, la actividad NOS y la expresión de proteínas aórticas de SHR. Estos resultados están de acuerdo con experimentos *in vitro* que muestran que la genisteína induce cambios en la contractilidad de miocitos cardiacos (Liew y cols., 2003) o mejora la función endotelial en SHR (estudios *in vitro*) sin verse afectada por el bloqueo del RE $\alpha$  y RE $\beta$ . En contra de esto, se ha informado que el ICI 182,780 previene el incremento del RNAm de la NOSe inducido por genisteína en ratas ovariectomizadas (Wang y cols., 2003) a pesar de que estos investigadores usaron una dosis más baja de ICI 182,780 (1,5 mg/kg/día s.c.) durante un corto periodo de tiempo (10 días). Sorprendentemente, en el grupo ICI 182,780-genisteína está incrementada la expresión de NOSe en comparación con el grupo genisteína. El significado de este efecto no está claro puesto que no se traduce en cambios en la actividad NOSe. Podría ser interpretado como que la inhibición de los RE $\alpha$  y RE $\beta$  modula la actividad de otros factores de transcripción implicados en la expresión de NOSe, tales como los PPAR- $\gamma$ . De hecho, la activación de RE $\alpha$  y RE $\beta$  regula a la baja la actividad transcripcional de PPAR- $\gamma$  (Dang y cols., 2003). Por tanto, podríamos especular que el ICI 182,780 podría facilitar la actividad agonista de PPAR- $\gamma$  de la genisteína (Dang y

cols., 2003), lo que conduciría a un incremento en la expresión de NOSe. Otro posible mecanismo de los efectos protectores de esta isoflavona podría ser la inhibición de las tirosín kinasas (Akiyama y cols., 1987; Duarte y cols., 1997; Kitayama y cols., 2002; Bermejo y cols., 2003). Sin embargo, la participación de estos mecanismos en los efectos protectores de genisteína requiere más investigaciones que se escapan del objetivo de nuestro estudio.

En resumen, hemos demostrado que el tratamiento oral con la isoflavona genisteína, de manera independiente de RE, reduce la presión arterial y mejora la función endotelial en SHR, sin provocar cambios en WKY. Estos efectos se acompañan de un aumento de la actividad vascular de la NOS asociado a una reducción de la expresión de la caveolina-3, un aumento de la calmodulina-1 y a la menor producción de  $O_2^-$  (Figura 36).



**Figura 36.** Mecanismos involucrados en los efectos crónicos de la genisteína sobre la actividad NOSe en SHR. Abreviaturas: ACh=acetilcolina; CM=calmodulina; NAD(P)H<sub>ox</sub>=NAD(P)H oxidasa; NO=óxido nítrico; NOSe=óxido nítrico sintasa endotelial; O<sub>2</sub><sup>-</sup>=aniones superóxido. Cambios en la expresión (de amarillo): ↑=aumento, ↓=disminución. Cambios de cantidad (en morado): ↑=aumento, ↓=disminución.

### **3. EFECTOS PROTECTORES DE LA GENISTEÍNA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL Y LA FUNCIÓN VASCULAR EN SHR OVARIECTOMIZADAS**

Numerosas publicaciones han demostrado que el tratamiento crónico con el fitoestrógeno genisteína mejora la función endotelial en mujeres postmenopáusicas y ratas normotensas ovariectomizadas. En este estudio mostramos por primera vez que:

- 1) El tratamiento crónico vía oral de SHR ovariectomizadas con la isoflavona genisteína reduce la presión arterial sistólica y potencia la vasodilatación dependiente de endotelio y NO.
- 2) La mejora de la función endotelial inducida por genisteína en SHR se acompaña de cambios en la expresión de las proteínas reguladoras de la NOSe, tales como una reducción de las caveolinas-1 y -3 y un incremento de la calmodulina-1.
- 3) La genisteína restablece los cambios inducidos por la ovariectomía, en los que se incluyen la mayor respuesta vasoconstrictora a Ang II, la regulación a la alza de la expresión del receptor AT-1 y el incremento de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> vascular.
- 4) Todos los efectos de la genisteína son semejantes a los del estrógeno natural 17β-estradiol. Sin embargo, a diferencia del estrógeno, la genisteína no tiene efectos uterotróficos.

La disfunción endotelial es un predictor independiente de mal pronóstico para la mayoría de las enfermedades cardiovasculares, incluyendo la hipertensión esencial (Mendelsohn y cols., 1999). Como ya hemos ido comentando, la característica fisiopatológica más importante de la disfunción endotelial es la reducida biodisponibilidad del NO endotelial. La SHR es un modelo animal bien conocido y ampliamente utilizado, caracterizado por disfunción endotelial, que se agrava después

de la ovariectomía y que se asemeja a lo observado en mujeres postmenopáusicas (Dantas y cols., 1999). Más específicamente, en nuestro estudio, las SHR ovariectomizadas presentaban una reducida respuesta relajante a ACh, vasodilatador dependiente de endotelio y NO, sin presentar alteración en la respuesta a NPS, dador de NO que relaja las arterias de forma independiente de endotelio. Además, los anillos aórticos de ratas ovariectomizadas mostraban una reducida contracción en respuesta a L-NAME (inhibidor de la NOSe). Todos estos datos indican que las ratas ovariectomizadas presentan disfunción endotelial caracterizada por una reducida biodisponibilidad de NO. La isoflavona genisteína y el estrógeno natural restablecían la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio a ACh sin afectar a la respuesta a NPS e incrementaban la contracción inducida por L-NAME.

Los mecanismos potenciales por los que la ovariectomía disminuye la respuesta al derivado endotelial NO y la mejora provocada por genisteína y estradiol pueden deberse a:

- 1) Cambios en la actividad y/o expresión de la NOSe.
- 2) Cambios en los niveles vasculares de  $O_2^-$  que conduce a la inactivación del NO.
- 3) Cambios en la sensibilidad de la vía NO-GMPc en las CMLV.

La respuesta a NPS no se modificaba por la ovariectomía ni por los tratamientos, por lo que los cambios en la capacidad del NO de activar la síntesis de GMPc o sus efectos posteriores en músculo liso pueden descartarse. Como ya se comentó en el apartado anterior, la síntesis reducida de NO asociada a la disfunción endotelial podría deberse a una expresión alterada de la NOSe, modificaciones post-transduccionales de la enzima (p.ej. modificaciones en fosforilación o en ácidos grasos), interacciones con HSP90 y caveolinas, o concentraciones subóptimas del sustrato L-arginina o del cofactor  $BH_4$  (Huang, 2003). De acuerdo a Wassmann y cols. (2001) pero en contra de Widder y cols. (2003), hemos encontrado que la expresión de la NOSe en aorta de SHR no se modifica con la ovariectomía ni con la terapia estrógena.

Recientemente, se ha analizado la expresión de la caveolina-1 después de la ovariectomía y el tratamiento con estradiol. Nawate y cols. (2005) demostraron que la ovariectomía producía un incremento paradójico en la relajación dependiente de NO endotelial que se asoció con una reducida expresión de caveolina-1 en arterias mesentéricas de rata y que estos efectos revertían con estradiol. En ratas ovariectomizadas el tratamiento con estradiol también conducía a un incremento en la expresión del ARNm de caveolina-1 en aortas sin endotelio (Watanabe y cols., 2004). En contraposición con estos hallazgos, Xu y cols. (2001) mostraron una mayor expresión de caveolina-1 y una reducida vasodilatación dependiente de NO en arterias cerebrales después de la ovariectomía. En línea con el último estudio, nosotros hemos encontrado que la ovariectomía en SHR conduce a una mayor expresión de caveolina-1 y -3 que se revierte con el estradiol. Además, la terapia sustitutiva estrogénica produce un aumento de la expresión de calmodulina. Por tanto, estos cambios en la expresión de los moduladores de la NOSe están de acuerdo con el empeoramiento de la disfunción endotelial observada tras la ovariectomía y su mejora con la terapia estrogénica. Es muy interesante comprobar como los efectos de la genisteína son paralelos a los del estradiol, reduciendo la expresión de las caveolinas e incrementando la de la calmodulina lo que sugiere un mecanismo común para el estrógeno natural y el fitoestrógeno.

Además, el  $O_2^-$  rápidamente inactiva el NO y es el principal agente implicado en el inicio y desarrollo de la disfunción endotelial (Cai y Harrison, 2000). Nosotros demostramos que la ovariectomía conduce a una mayor producción de  $O_2^-$  en la pared de los vasos que se previene con genisteína y estradiol. Este efecto contribuye, de manera adicional, a explicar los cambios en la función endotelial.

La activación del receptor AT-1 induce vasoconstricción y proliferación celular y conduce a la liberación de ERO en la pared de los vasos (Griendling y cols., 1993). Se ha demostrado que el estrógeno causa una regulación a la baja del receptor AT-1 vascular y que la deficiencia de estrógenos está acompañada de una sobreexpresión

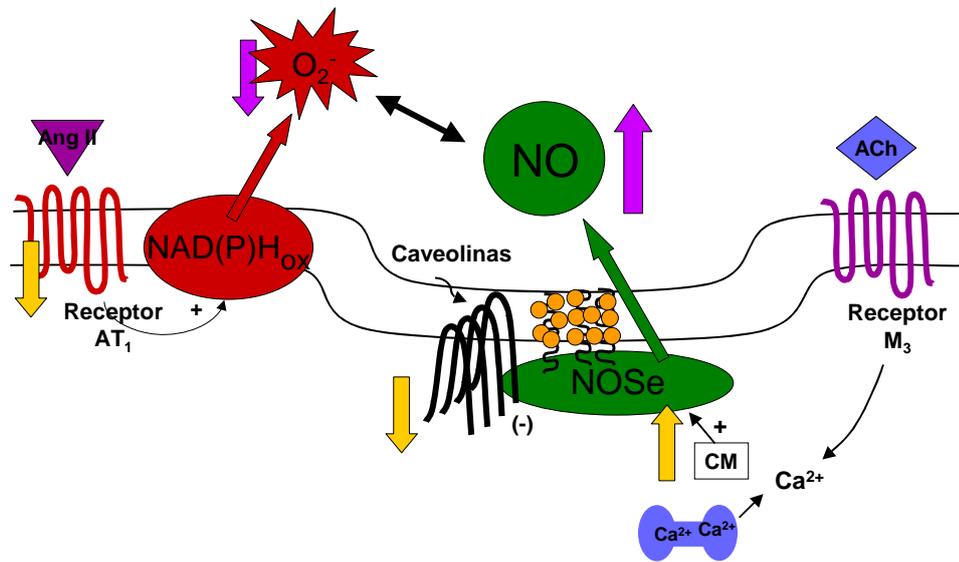
del receptor AT-1 (Nickenig y cols., 1998). De acuerdo con esto, en nuestro estudio, la ovariectomía incrementaba la expresión del receptor AT-1 y en SHR ovariectomizadas, la genisteína, al igual que el estradiol, prevenía la sobreexpresión de este receptor. Además, ambos fármacos también inhibían la vasoconstricción inducida por Ang II. Por el contrario, la vasoconstricción provocada por noradrenalina no se modificó ni por la ovariectomía ni por los fármacos lo que sugiere que la inhibición de la respuesta contractora de Ang II se debe a cambios en la densidad de receptor AT-1 más que a cambios en la señal de transducción. La menor expresión del receptor AT-1 está conforme con la disminución de la producción de  $O_2^-$  y la mejora de la función endotelial. De hecho, los antagonistas del receptor AT-1 mejoran la función endotelial en SHR (Rodrigo y cols., 1997).

Los mecanismos involucrados en la menor expresión del receptor AT-1 no están claros. Estos efectos tal vez estén mediados por la activación del RE o por la actividad agonista sobre PPAR- $\gamma$ . Este último mecanismo se ha involucrado recientemente en los efectos inhibitorios *in vitro* de genisteína sobre la expresión del receptor AT-1 y la producción de  $O_2^-$  en las células endoteliales aórticas de “stroke-prone” SHR (Xu y cols., 2004). También es interesante anotar que la Ang II modula la expresión de la caveolina-1 (Ishizaka y cols., 1998) y por tanto se podría especular que los cambios en la expresión de la caveolina-1 tras la ovariectomía y el tratamiento con genisteína y estradiol podrían ser secundarios a diferencias en la actividad del receptor AT-1.

Genisteína y  $17\beta$ -estradiol muestran efectos protectores similares, en lo que a la función vascular se refiere. Por el contrario, mientras que  $17\beta$ -estradiol aumenta el peso uterino, los efectos beneficiosos de genisteína sobre la presión arterial y la función endotelial no se acompañan de cambios en el peso uterino. La carencia de efectos uterotróficos de la genisteína se debe a su baja afinidad por el RE $\alpha$  que contrasta con la potencia similar del  $17\beta$ -estradiol sobre el RE $\alpha$  y RE $\beta$  (Makela y cols., 1999). Por tanto, nuestros resultados sugieren que la activación del RE $\beta$  es

suficiente para explicar los efectos vasculares de los estrógenos. Sin embargo, no podemos excluir que parte de los efectos protectores de genisteína impliquen mecanismos independientes de RE. De hecho, en nuestros estudios *in vitro* en arterias de machos SHR, encontramos que el tratamiento agudo (20 minutos) con genisteína aumentó la vasodilatación dependiente de endotelio y dicho aumento no se modificó por ICI 182,780, antagonista específico de RE $\alpha$  y RE $\beta$ . De igual forma, en nuestro anterior estudio *in vivo* realizado en machos SHR, la administración conjunta de genisteína con el antagonista del RE, no modificó los efectos protectores de genisteína.

Este estudio demuestra que el tratamiento crónico con genisteína reduce la presión arterial, la disfunción endotelial y la elevada respuesta de la Ang II en SHR ovariectomizadas, en la misma medida que la repleción de estrógenos. A estos efectos contribuye el incremento de la actividad NOS que resulta de la reducción de la expresión de caveolina-1 y -3 y del aumento de la expresión de la calmodulina-1 así como la disminución de la expresión del receptor AT-1 y de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> vascular (Figura 37). Estos descubrimientos sugieren que la genisteína puede usarse como agente terapéutico para prevenir las complicaciones vasculares de la menopausia, especialmente en mujeres hipertensas.



**Figura 37.** Mecanismos involucrados en los efectos crónicos de la genisteína sobre la actividad NOSe y NAD(P)H oxidasa en SHR ovariectomizadas. Abreviaturas: ACh=acetilcolina; Ang II=angiotensina II; CM=calmodulina; NAD(P)H<sub>ox</sub>=NAD(P)H oxidasa; NO=óxido nítrico; NOSe=óxido nítrico sintasa endotelial; O<sub>2</sub><sup>-</sup>=aniones superóxido. Cambios en la expresión (de amarillo): ↑=aumento, ↓=disminución. Cambios de cantidad (en morado): ↑=aumento, ↓=disminución.

## **CONCLUSIONES**

---

- 1) Las isoflavonas genisteína y daidzeína, *in vitro*, actúan como el estrógeno natural  $17\beta$ -estradiol, restableciendo la función endotelial en SHR, de manera independiente del receptor estrogénico. Los mecanismos de este efecto protector son: aumento de la actividad NOS, reducción de la producción de  $O_2^-$  e inhibición de la liberación endotelial de  $PGH_2$  y de su respuesta vasoconstrictora.
- 2) El tratamiento oral con la isoflavona genisteína produce, un aumento de la actividad NOS en SHR asociado a una reducción de la expresión de la caveolina-3 y un aumento de la calmodulina-1, sin cambios en WKY. Estas acciones son independientes del receptor estrogénico.
- 3) El tratamiento crónico con genisteína reduce la presión arterial, la disfunción endotelial y la elevada respuesta de Ang II en SHR ovariectomizadas, en la misma medida que la repleción de estrógenos. Estos efectos se deben al incremento de la actividad NOS que resulta de la reducción de la expresión de caveolina-1 y -3, del aumento de la expresión de la calmodulina-1, de la disminución de la expresión del receptor AT-1 y de la producción vascular de  $O_2^-$ .

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- 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**:1455-9.
- Adlercreutz H, Hamalainen E, Gorbach S, Goldin B. Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan. *Lancet*. 1992;**339**:1233.
- Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S. Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet*. 1993;**342**:1209-10.
- Adlercreutz H. Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncology*. 2002;**3**:364-73.
- Ahluwalia A, Hobbs AJ. Endothelium-derived C-type natriuretic peptide: more than just a hyperpolarizing factor. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;**26**:162-7.
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 1987;**262**:5592-5.
- Albertazzi P, Pansini F, Bonaccorsi G, Zanotti L, Forini E, De Aloysio D. The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. *Obstet Gynecol*. 1998;**91**:6-11.
- Alekel DL, Germain A St., Pererson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2000;**72**:844-52.
- Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med*. 1995;**333**:276-82.
- Anderson JW. Diet first, then medication for hypercholesterolemia. *JAMA*. 2003;**290**:531-3.
- Angus JA, Cocks TM. Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol Ther*. 1989;**41**:303-52.
- Arjmandi BH, Lucas EA, Khalil DA, Devareddy L, Smith BJ, McDonald J, Arquitt AB, Payton ME, Mason C. One year soy protein supplementation has positive effects on bone formation markers but not bone density in postmenopausal women. *Nutr J*. 2005;**4**:8.
- Arnal JF, Clamens S, Pechet C, Negre-Salvayre A, Allera C, Girolami JP, Salvayre R, Bayard F. Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;**93**:4108-13.
- Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension*. 1990;**15**:699-703.
- Awe SO, Tsakadze NL, D'Souza SE, Adeagbo AS. Tert-butyl hydroperoxide-mediated vascular responses in DOCA-salt hypertensive rats. *Vascul Pharmacol* 2003;**40**:51-7.

- 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**:750-8.
- 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**:1780-4.
- 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.
- Baum JA, Teng H, Erdman JW Jr, Weigel RM, Klein BP, Persky VW, Freels S, Surya P, Bakhit RM, Ramos E, Shay NF, Potter SM. Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell low-density-lipoprotein receptor messenger NA in hypercholesterolemic, postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1998;**68**:545-51.
- 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-H8.
- 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**:1810-5.
- Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust Vet J.* 1946;**22**:2-12.
- Bermejo A, Zarzuelo A, Duarte J. In vivo vascular effects of genistein on a rat model of septic shock induced by lipopolysaccharide. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;**42**:329-38.
- Best LC, Martin TJ, Russel RG, Preston FE. Prostacyclin increases cyclic AMP activity in platelets. *Nature.* 1977;**267**:850-2.
- 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-C15.
- 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**:1842-7.
- 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**:161-7.

- 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-C6.
- 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**:1189-97.
- 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**:549-72.
- Borradaile NM, de Dreu LE, Wilcox LJ, Edwards JY, Huff MW. Soya phytoestrogens, genistein and daidzein, decrease apolipoprotein B secretion from HepG2 cells through multiple mechanisms. *Biochem J.* 2002;**366**:531-9.
- Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium derived nitric oxide. *J Clin Invest.* 1990;**85**:587-90.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;**72**:248-54.
- 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**:429-36.
- 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**:1362-7.
- 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.
- Bugiardini R, Manfrini O, Pizzi C, et al. Endothelial function predicts future development of coronary artery disease: a study of women with chest pain and normal coronary angiograms. *Circulation* 2004;**109**:2518-23.
- Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension.* 2000;**35**:746-51.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;**87**:840-4.
- Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 1996;**78**:415-23.
- 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.

- Cassidy A, Bingham S, Setchell KD. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1994;**60**:333-40.
- Cassidy A, Potential tissue selectivity of dietary phytoestrogens and estrogens, *Curr Opin Lipidol.* 1999;**10**:47-52.
- Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Circ Res.* 1997;**81**:885-92.
- 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–R24.
- Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul PW. ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol.* 2002;**16**:938-46.
- Chen AC, Berhow MA, Tappenden KA, Donovan SM. Genistein inhibits intestinal cell proliferation in piglets. *Pediatr Res.* 2005;**57**:192–200.
- Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol.* 1988;**95**:1165-74.
- Chen YM, Ho SC, Lam SS, Ho SS, Woo JL. Beneficial effect of soy isoflavones on bone mineral content was modified by years since menopause, body weight, and calcium intake: a double-blind, randomized, controlled trial. *Menopause.* 2004;**11**:246–54.
- Chen Z, 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**:401-6.
- Chen Z, Zheng W, Custer LJ, Dai Q, Shu XO, Jin F, Franke AA. Usual dietary consumption of soy foods and its correlation with the excretion rate of isoflavonoids in overnight urine samples among Chinese women in Shanghai. *Nutr Cancer.* 1999b;**33**:82-7.
- Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 1999c;**443**:285-9.
- 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**:643-8.
- Clarkson TB, Anthony MS, Morgan TM. Inhibition of postmenopausal atherosclerosis progression: a comparison of the effects of conjugated equine estrogens and soy phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;**86**:41-7.

- Clarkson TB. Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Nutr.* 2002;**132**:566S-9S.
- Cocks TM, Angus JA. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature.* 1983;**305**: 627-30.
- 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 Ca<sup>2+</sup> ATPase and inhibition of stores-operated Ca<sup>2+</sup> influx. *Circ Res.* 1999;**84**:210-9.
- Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation.* 1995;**92**:3337-49.
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 2001;**49**:507-21.
- Cornwell T, Cohick W, Raskin I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry.* 2004;**65**:995-1016.
- Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem.* 1997;**272**:30429-38.
- 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-H5.
- Crouse JR, Morgan TM, Terry JG, Ellis J, Vitolins M, Burke GL. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med.* 1999;**159**:2070-6.
- 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**:331-7.
- Dang ZC, Audinot V, Papapoulos SE, Boutin JA, Lowik CW. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Biol Chem.* 2003;**278**:962-7.
- Dantas AP, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1999;**34**:914-9.
- Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res.* 2002;**90**:413-9.
- Dart A, Silagy C, Dewar E, Jennings G, Mc-Neil J. Aortic distensibility and left ventricular structure and function in isolated systolic hypertension. *Eur Heart J.* 1993;**14**:1465-70.

- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;**109**:III27-III32.
- 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**:3042-7.
- 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.
- Dean SA, Tan J, O'Brien ER, Leenen FH. 17beta-estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;**288**:R759-R66.
- Delbosc S, Cristol JP, Descomps B, Mimran A, Jover B. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension*. 2002;**40**:142-7.
- den Tonkelaar I, Keinan-Boker L, Veer PV, Arts CJ, Adlercreutz H, Thijssen JH, Peeters PH. Urinary phytoestrogens and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;**10**:223-8.
- Dewell A, Hollenbeck CB, Bruce B. The effects of soyderived phytoestrogens on serum lipids and lipoproteins in moderately hypercholesterolemic postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;**87**:118-21.
- Doerge DR, Sheehan DM. Goitrogenic and estrogenic activity of soy isoflavones. *Environ Health Perspect*. 2002;**110**:349-53.
- 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-C81.
- 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.
- Duarte J, Ocete MA, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Effect of tyrosine kinase and tyrosine phosphatase inhibitors on aortic contraction and induction of nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol*. 1997;**338**:25-33.
- 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*. 2001;**133**:117-24.
- Duncan AM, Merz-Demlow BE, Xu X, Phipps WR, Kurzer MS. Premenopausal equol excretors show plasma hormone profiles associated with lowered risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;**9**:581-6.

- Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS. Phyto-oestrogens. *Best Practice Res Clin Endocrinol Metab.* 2003;**17**:253-71.
- Duranti M, Lovati MR, Dani V, Barbiroli A, Scarafoni A, Castiglioni S, Ponzone C, Morazzoni P. The alpha' subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver beta-VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. *J Nutr.* 2004;**134**:1334-9.
- Ebisawa H, Koshihara Y. Inhibitory effects of soy-isoflavones on osteoclastogenesis in human bone marrow cell culture. *Soy Protein Res.* 2001;**4**:129-34.
- Edwards G, Dora K, Gardener M, Weston A. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature.* 1998;**396**:269-71.
- Emori T, Hirata Y, Imai T, Eguchi S, Kano K. Cellular mechanism of natriuretic peptides induced inhibition of endothelin-1 biosynthesis in rat endothelial cells. *Endocrinology.* 1993;**133**:2474-80.
- Emori T, Hirata Y, Ohta K, Kano K, Eguchi S. Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension.* 1991;**18**:165-70.
- 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.* 2004;**43**:399-404.
- Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2004;**15**:1983-92.
- 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**:1059-63.
- Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;**82**:4258-65.
- Ercan E, Tengiz I, Ercan HE, Nalbantgil I. Left ventricular hypertrophy and endothelial functions in patients with essential hypertension. *Coron Artery Dis.* 2003;**14**:541-4.
- Erdman JW. Soy protein and cardiovascular disease – A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the AHA. *Circulation.* 2000;**102**:2555-9.
- Evans BA, Griffiths K, Morton MS. Inhibition of 5 alpha-reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *J Endocrinol.* 1995;**147**:295–302.
- Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, Malluche HH. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int.* 1998;**8**:274-81.

- Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarisation of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1988;**93**:515-24.
- Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem*. 1996;**271**:22810-4.
- Fleming I, Bauersachs J, Schafer A, Scholz D, Aldershvile J, Busse R. Isometric contraction induces the Ca<sup>2+</sup>-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;**96**:1123-8.
- 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.
- Forstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1995;**352**:351-64.
- Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis*. 1998;**19**:2151-8.
- Frohlich ED, Apstein C, Chobanian AV, Devereux RB, Dustan HP, Dzau V, Fauad-Tarazi F, Horan MJ, Marcus M, Massie B, et al. The heart in hypertension. *N Engl J Med*. 1992;**327**:998-1008.
- Fujimoto T. Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol*. 1993;**120**:1147-57.
- Fujio Y, Fumiko Y, Takahashi K, Shibata N. Responses of smooth muscle cells to platelet-derived growth factor are inhibited by herbimycin-A tyrosine kinase inhibitor1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;**195**:79-83.
- Fujita T, Toya Y, Iwatsubo K, Onda T, Kimura K, Umemura S, Ishikawa Y. Accumulation of molecules involved in alpha1-adrenergic signal within caveolae: caveolin expression and the development of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2001;**51**:709-16.
- Fukui K, Tachibana N, Wanezaki S, Tsuzaki S, Takamatsu K, Yamamoto T, Hashimoto Y, Shimoda T. Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats. *J Agric Food Chem*. 2002;**50**:5717-21.
- 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.
- Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;**299**:818-24.
- Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor and contracting factor. *FASEB J*. 1989;**3**:2007-18.

- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;**288**:373-6.
- Furchgott RF. The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries to acetylcholine and some other nitrovasodilators. *Trends Pharmacol Sci*. 1981;**2**:173-6.
- Gallagher G, Sumpio BE. Vascular endothelial cells. In: Sumpio BE, Sidawy AS, eds. *Basic Science of Vascular Disease*. Mt. Kisco: Futura Publishing Co., 1997;151-86.
- 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**:91-9.
- Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004; **93**:105-13
- 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**:25437-40.
- 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**:477-86.
- 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**:429-35.
- 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 H<sub>2</sub> in the SHR aorta. *Circ Res*. 1995;**76**:1003-10.
- Ge T, Vanhoutte PM, Boulanger CM. Increased response to prostaglandin H<sub>2</sub> precedes changes in PGFsynthase 1 expression in the SHR aorta. *Acta Pharmacol Sinica*. 1999;**20**:1087-92.
- Gebremedhin D, Ma YH, Falck JR, Roman RJ, Van Rollins M, Harder DR. Mechanism of action of cerebral epoxyeicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1992;**263**:H519-H25.
- Gianazza E, Eberini I, Arnoldi A, Wait R, Sirtori CR. A proteomic investigation of isolated soy proteins with variable effects in experimental and clinical studies. *J Nutr*. 2003;**133**:9-14.
- Gilligan DM, Quyyumi AA, Cannon RO 3rd. Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women. *Circulation*. 1994;**89**:2545-51.

- Glazier MG, Bowman MA. A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. *Arch Intern Med.* 2001;**161**:1161-72.
- 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**:1567-72.
- 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**:1769-75.
- Goldwyn S, Lazinsky A, Wei H. Promotion of health by soy isoflavones: efficacy, benefit and safety concerns. *Drug Metabol Drug Interact.* 2000;**17**:261-89.
- Golfman LS, Hata T, Beamish RE, Dhalla NS. Role of endothelin in heart function in health and disease. *Can J Cardiol.* 1993;**9**:635-53.
- 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**:392-8.
- Gorman RR, Bunting S, Miller OV. Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin. *Prostaglandins.* 1977;**13**:377-88.
- Gragasin FS, Xu Y, Arenas IA, Kainth N, Davidge ST. Estrogen reduces angiotensin II-induced nitric oxide synthase and NAD(P)H oxidase expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;**23**:38-44.
- 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-H87.
- Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.* 2003;**108**:1912-6.
- Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation.* 1993;**87**:1816-28.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;**86**:494-501.
- Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol.* 1995;**57**:707-36.

- 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–e6.
- Grover AK, Samson SE, Robinson S, Kwan CY. Effects of peroxynitrite on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump in pig coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;**284**:C294–C301.
- 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–H403.
- Hajjar DP, Weksler BB, Falcone DJ, Hefron 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**:479–85.
- 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**:653–58.
- Han KK, Soares JM, Haidar MA, Rodrigues de Lima G, Baracat EC. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstet Gynecol.* 2002;**99**:389–94.
- Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kuzuya M, Satake S, Ishikawa T, Hidaka H, Iguchi A. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;**214**:847–55.
- Helmeste DM, Tang SW. Tyrosine kinase inhibitors regulate serotonin uptake in platelets. *Eur J Pharmacol.* 1995;**280**:R5–R7.
- Hermansen K, Søndergaard M, Høie L, Carstensen M, Brock B. Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care.* 2001;**24**:228–33.
- 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**:1259–67.
- Herrington DM, Reboussin DM, Brosnihan KB, Sharp PC, Shumaker SA, Snyder TE, Furberg CD, Kowalchuk GJ, Stuckey TD, Rogers WJ, Givens DH, Waters D. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2000;**343**:522–9.

- 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**:868-75.
- 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**:3459-67.
- Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett*. 1995;**360**:291-3.
- Hodgson JM, Puddey IB, Beilin LJ, Mori TA, Croft KD. Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations: a randomized controlled trial in humans. *J Nutr*. 1998;**128**:728-32.
- Hodgson JM, Puddey IB, Croft KD, Mori TA, Rivera J, Beilin LJ. Isoflavonoids do not inhibit in vivo lipid peroxidation in subjects with high-normal blood pressure. *Atherosclerosis*. 1999;**145**:167-72.
- Honing ML, Smits P, Morrison PJ, Rabelink TJ. Bradykinin-induced vasodilation of human forearm resistance vessels is primarily mediated by endothelium-dependent hyperpolarization. *Hypertension*. 2000;**35**:1314-8.
- Honore EK, Williams JK, Anthony MS, Clarkson TB. Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertil Steril*. 1997;**67**:148-54.
- Horn-Ross PL, John EM, Lee M, Stewart SL, Koo J, Sakoda LC, Shiau AC, Goldstein J, Davis P, Perez-Stable EJ. Phytoestrogen consumption and breast cancer risk in a multiethnic population: the Bay Area Breast Cancer Study. *Am J Epidemiol*. 2001;**154**:434-41.
- Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 1998;**58**:3833-8.
- Hu S, Kim HS. Activation of K<sup>+</sup> channel in vascular smooth muscles by cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Eur J Pharmacol*. 1993;**230**:215-21.
- 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's Arch Pharmacol*. 1988;**338**:438-42.
- Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep*. 2003;**5**:473-80.
- 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-H8.

- 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-H72.
- 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**:353-8.
- 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**:2863-7.
- Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama Y, Ito M, Wang X, Suda T, Ikegami S. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology*. 1999;**140**:1893-900.
- Ishizaka N, Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension*. 1998;**32**:459-66.
- Iwama Y, Kato T, Muramatsu M, Asano H, Shimizu K, Toki Y, Miyazaki Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T. Correlation with blood pressure of the acetylcholine-induced endothelium-derived contracting factor in the rat aorta. *Hypertension*. 1992;**19**:326-32.
- 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**:8557-65.
- Janssen LJ, Lu-Chao H, Netherton S. Excitation-contraction coupling in pulmonary vascular smooth muscle involves tyrosine kinase and Rho kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;**280**:L666-L74.
- Ji J, Benishin C, Pang P. Nitric oxide selectively inhibits intracellular Ca<sup>2+</sup> release elicited by inositol trisphosphate but not caffeine in rat vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;**285**:16-21.
- 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**:18522-25.
- 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.
- Karamsetty MR, Klinger JR, Hill NS. Phytoestrogens restore nitric oxide-mediated relaxation in isolated pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;**297**:968-74.

- 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**:375-80.
- Key TJ, Sharp GB, Appleby PN, Beral V, Goodman MT, Soda M, Mabuchi K. Soya foods and breast cancer risk: a prospective study in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Br J Cancer*. 1999;**81**:1248-56.
- Khan S, Higdon N, Meisheri K. Coronary vasorelaxation by nitroglycerin: involvement of plasmalemmal calcium-activated K<sup>+</sup> channels and intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;**284**:838-46.
- 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**:1891-5.
- 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**:172-7.
- Kiely M, Faughnan M, Wahala K, Brants H, Mulligan A. Phyto-oestrogen levels in foods: the design and construction of the VENUS database. *Br J Nutr*. 2003;**89**:S19-S23.
- Kinlay S, Behrendt D, Fang JC, Delagrangre 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**:629-34.
- Kitayama J, Kitazono T, Ooboshi H, Ago T, Ohgami T, Fujishima M, Ibayashi S. Chronic administration of a tyrosine kinase inhibitor restores endothelial functional and morphological changes of the basilar artery during chronic hypertension. *J Hypertens*. 2002;**20**:2205-11.
- Knight DC, Eden JA. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet Gynecol*. 1996;**87**:897-904.
- Kohn M, Yokokawa K, Horio T, Yasunari K, Murakawa K, Takeda T. Atrial and brain natriuretic peptides inhibit the endothelin-1 secretory response to angiotensin II in porcine aorta. *Circ Res*. 1992;**70**:241-47.
- 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**:834-42.
- Krazeisen A, Breitling R, Moller G, Adamski J. Phytoestrogens inhibit human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;**171**:151-62.
- Kreijkamp-Kaspers S, Kok L, Bots ML, Grobbee DE, Lampe JW, van der Schouw YT. Randomized controlled trial of the effects of soy protein containing isoflavones on vascular function in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2005;**81**:189-95.

- 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-H6.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997;**138**:863-70.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998;**139**:4252-63.
- Kulling SE, Rosenberg B, Jacobs E, Metzler M. The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol*. 1999;**73**:50-4.
- 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<sup>+</sup> channel. *Nature*. 1989;**337**:555-7.
- Kurzer MS, Xu X. Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr*. 1997;**17**:353-81.
- Kurzer MS. Phytoestrogen supplement use by women. *J Nutr*. 2003;**133**:1983S-6S.
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003;**111**:1201-9.
- Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004;**109**:II27-II33.
- 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**:3073-8.
- Lansman JB, Hallan TJ, Rink TJ. Single-stretch activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers. *Nature*. 1987;**325**:811-3.
- Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol*. 1997;**273**:L119-L26.
- Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;**285**:R277-R97.
- Le Bail JC, Champavier Y, Chulia AJ, Habrioux G. Effects of phytoestrogens on aromatase, 3beta and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sci*. 2000;**66**:1281-91.

- Lee YS, Chen X, Anderson JJB. Physiological concentrations of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblasttype cells. *Nutr Res.* 2001;**21**:1287-98.
- 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**:23790-5.
- Li JM, Shah AM. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem.* 2003;**278**:12094-100.
- Li L, Fink GD, Watts SW, Northcott CA, Galligan JJ, Pagano PJ, Chen AF. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation.* 2003a;**107**:1053-8.
- Li L, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. Vasopressin induces vascular superoxide via endothelin-1 in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension.* 2003c;**41**:663-8.
- Li L, Watts SW, Baner AK, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced venoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension.* 2003b;**42**:316-21.
- Liew R, Williams JK, Collins P, MacLeod KT. Soy-derived isoflavones exert opposing actions on Guinea pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;**304**:985-93.
- Lincoln TM. Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther.* 1989;**41**:479-502.
- Lindner V, Kim SK, Karas RH, Kuiper GG, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Increased expression of estrogen receptor-beta mRNA in male blood vessels after vascular injury. *Circ Res.* 1998;**83**:224-9.
- Liu J, Razani B, Tang S, Terman BI, Ware JA, Lisanti MP. Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. Angiogenesis inhibitors block vascular endothelial growth factor-induced down-regulation of caveolin-1. *J Biol Chem.* 1999;**274**:15781-5.
- Lovati MR, Manzoni C, Corsini A, Granata A, Frattini R, Fumagalli R, Sirtori CR. Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. *J Nutr.* 1992;**122**:1971-8.
- Lovati MR, Manzoni C, Gianazza E, Arnoldi A, Kurowska E, Carroll KK, Sirtori CR. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *J Nutr.* 2000;**130**:2543-9.
- Lovati MR, Manzoni C, Gianazza E, Sirtori CR. Soybean protein products as regulators of liver low-density lipoprotein receptors. I. Identification of active b-conglycinin subunits. *J Agric Food Chem.* 1998;**46**:2474-80.

- 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**:48794-800.
- 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.* 1990;**3**:55-8.
- Luscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1986;**8**:344-8.
- Lydeking-Olsen E, Beck-Jensen J-E, Setchell KDR, Holm-Jensen T. Soymilk or progesterone for prevention of bone loss. A 2 year randomized, placebo-controlled trial. *Eur J Nutr.* 2004;**43**:246-57.
- MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS, Shaul PW. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ Res.* 1997;**81**:355-62.
- Makela S, Savolainen H, Aavik E, Myllarniemi M, Strauss L, Taskinen E, Gustafsson JA, Hayry P. Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;**96**:7077-82.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;**79**:727-47.
- 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.
- Manzoni C, Lovati MR, Gianazza E, Sirtori CR. Soybean protein products as regulators of liver low-density lipoprotein receptors. II. a-a' rich commercial soy concentrate and a' deficient mutant differently affect low-density lipoprotein receptor activation. *J Agric Food Chem.* 1998;**46**:2481-4.
- Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest.* 1997;**99**:1351-60.
- 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**:229-39.
- Martinez MC, Randriamboavonjy V, Ohlmann P, Komaz N, Duarte J, Schneider F, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Involvement of protein kinase C, tyrosine kinases, and Rho kinase in Ca<sup>2+</sup> handling of human small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;**279**:H1228-H38.

- McClain RM, Wolz E, Davidovich A, Pfannkuch F, Bausch J. Subchronic and chronic safety studies with genistein in dogs. *Food Chem Toxicol.* 2005;**43**:1461-82.
- McDonnell DP, Connor CE, Wijayaratne A, Chang CY, Norris JD. Definition of the molecular and cellular mechanisms underlying the tissue-selective agonist/antagonist activities of selective estrogen receptor modulators. *Recent Prog Horm Res.* 2002;**57**:295-316.
- McGuire JJ, Ding H, Triggle CR. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Can J Physiol Pharmacol.* 2001;**79**:443-70.
- Mei J, Yeung SSC, Kung AWC. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin Endocrinol. Metab.* 2001;**86**:5217-21.
- Mendelowitz D, Bacal K, Kunze D. Bradykinin-activated calcium influx pathway in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol.* 1992; **262**:H942-H8.
- Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999;**340**:1801-11.
- Meng GH, Lewis P, Wahala K, Adlercreutz H, Tikkanen MJ. Incorporation of esterified soybean isoflavones with antioxidant activity into low density lipoprotein. *Biochem Biophys.* 1999;**1438**:369-76.
- 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**:414-8.
- Meyer BJ, Larkin TA, Owen AJ, Astheimer LB, Tapsell LC, Howe PRC. Limited lipid-lowering effects of regular consumption of whole soybean foods. *Ann Nutr Metab.* 2004;**48**:67-78.
- 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**:25907-12.
- 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**:845-8.
- Miksicek RJ. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995;**208**:44-50.
- 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-H8.

- Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: Implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;**263**:681-4.
- 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-L83.
- Mishra SK, Abbot SE, Choudhury Z, Cheng M, Khatab N, Maycock NJ, Zavery A, Aaronson PI. Endothelium-dependent relaxation of rat aorta and main pulmonary artery by the phytoestrogens genistein and daidzein. *Cardiovasc Res*. 2000;**46**:539-46
- Mitchell JA, Sheng H, Forstermann U, Murad F. Characterization of nitric oxide synthases in non-adrenergic non-cholinergic nerve containing tissue from the rat anococcygeus muscle. *Br J Pharmacol*. 1991;**104**:289-91.
- 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**:1141-6.
- Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol*. 1994;**266**:H2568-H72.
- Molsiri K, Khemapech S, Patumraj S, Siriviriyakul P. Preventive mechanism of genistein on coronary endothelial dysfunction in ovariectomized rats: an isolated arrested heart model. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2004;**31**:59-66.
- 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**:137-44.
- Monach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. *Am J Clin Nutr*. 2005;**81**:230S-42S.
- 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**:663-5.
- Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*. 1991;**21**:361-74.
- Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin. *Pharmacol Rev*. 1978;**30**:293-331.
- 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 Invest Med*. 2002;**50**:19-24.
- Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Altavilla D, Ientile R, Squadrito F. Effects of genistein and

- hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res.* 2002;**17**:1904-12.
- Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull.* 2001;**24**:351-6.
- Munro IC, Harwood M, Hlywka JJ, Stephen AM, Doull J, Flamm WG, Adlercreutz H. Soy isoflavones: a safety review. *Nutr Rev.* 2003;**61**:1-33.
- Nabulsi AA, Folsom AR, White A, Patsch W, Heiss G, Wu KK, Szklo M. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. *N Engl J Med.* 1993;**328**:1069-75.
- Nadar S, Blann AD, Lip GY. Antihypertensive therapy and endothelial function. *Curr Pharm Des.* 2004;**10**:3607-14.
- Nagao T, Illiano S, Vanhoutte PM. Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am J Physiol.* 1992; **263**:H1090-H4.
- Nagao T, Vanhoutte PM. Hyperpolarisation as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J Physiol.* 1992;**445**:355-67.
- Nagata C, Kabuto M, Kurisu Y, Shimizu H. Decreased serum estradiol concentration associated with high dietary intake of soy products in premenopausal Japanese women. *Nutr Cancer.* 1997;**29**:228-33.
- Nagata C, Takatsuka N, Kawakami N, Shimizu H. Soy product intake and hot flashes in Japanese women: results from a community-based prospective study. *Am J Epidemiol.* 2001;**153**:790-3.
- Nakashima S, Koike T, Nozawa Y. Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits thromboxane A<sub>2</sub>-mediated human platelet responses. *Mol Pharmacol.* 1991;**39**:475-80.
- 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**:1099-104.
- Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD. Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *JAMA.* 2002;**288**:872-81.
- 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.
- Nestel PJ, Yamashita T, Sasahara T, Pomeroy S, Dart A, Komesaroff P, Owen A, Abbey M. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;**17**:3392-8.

- Nevala R, Lassila M, Finckenberg P, Paukku K, Korpela R, Vapaatalo H. Genistein treatment reduces arterial contractions by inhibiting tyrosine kinases in ovariectomized hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2002;**452**:87-96.
- Newbold RR, Banks EP, Bullock B, Jefferson WN. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res.* 2001.**61**:4325-28.
- Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stablein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Bohm M. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation.* 1998;**97**:2197-201.
- 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-H65.
- Nishizaka MK, Zaman MA, Green SA, Renfro KY, Calhoun DA. Impaired endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in hypertensive subjects with hyperaldosteronism. *Circulation.* 2004;**109**:2857-61.
- Ogawara H, Akiyama T, Watanabe S, Ito N, Kobori M, Seoda Y. Inhibition of tyrosine protein kinase activity by synthetic isoflavones and flavones. *J Antibiot.* 1989;**42**:340-3.
- Ogita H, Liao J. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium.* 2004; **11**:123-32.
- Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest.* 1993;**91**:2546-51.
- 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**:93-8.
- 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**:445-52.
- Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T. Expression of estrogen receptor beta in rat bone. *Endocrinology.* 1997;**138**:4509-12.
- Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;**286**:R233-R49.
- 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**:985-90.

- Pallosi 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**:933-5.
- 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**:22-7.
- 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**:3131-9.
- Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, Mendelsohn ME. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res.* 2002;**90**:1087-92.
- Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *J Hypertens.* 2001;**19**:415-20.
- Park JB, Schiffrin EL. Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens.* 2001;**19**: 921-30.
- Parkin DM. Cancers of the breast, endometrium and ovary: geographic correlations. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1989;**25**:1917-25.
- Passauer J, Bussemaker E, Lassig G, Gross P. Kidney transplantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with endstage renal disease. *Transplantation.* 2003;**75**:1907-10.
- Pershad Singh HA, Szollosi J, Benson S, Hyun WC, Feuerstein BG, Kurtz TW. Effects of ciglitazone on blood pressure and intracellular calcium metabolism. *Hypertension.* 1993;**21**:1020-3.
- Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroroberto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001;**104**:191-6.
- Perticone F, Maio R, Tripepi G, Zoccali C. Endothelial dysfunction and mild renal insufficiency in essential hypertension. *Circulation.* 2004;**110**:821-5.
- 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**:456-67.
- Pienta KJ, Goodson JA, Esper PS. Epidemiology of prostate cancer: molecular and environmental clues. *Urology.* 1996;**48**:676-83.
- 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**:946-52.

- Pino AM, Valladares LE, Palma MA, Mancilla AM, Yanez M, Albala C. Dietary isoflavones affect sex hormonebinding globulin levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;**85**:2797-800.
- Pocock VJ, Sales GD, Milligan SR. Comparison of the oestrogenic effects of infant milk formulae, oestradiol and the phytoestrogen coumestrol delivered continuously in the drinking water to ovariectomised mice. *Food Chem Toxicol.* 2002;**40**:643-51.
- Quyyumi AA. Prognostic value of endothelial function. *Am J Cardiol.* 2003;**91**:19H-24H.
- 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**:124-8.
- Randall MD, Kendall DA. Anandamide and endothelium-derived hyperpolarizing factor act via a common vasorelaxant mechanism in rat mesentery. *Eur J Pharmacol.* 1998;**346**:51-3.
- Rassi CM, Lieberherr M, Chaumaz G, Pointillart A, Cournot G. Downregulation of osteoclast differentiation by daidzein via caspase. *J Bone Miner Res.* 2002;**17**:630-8.
- Redon J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Saez GT. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension.* 2003;**41**:1096-101.
- Reis SE, Gloth ST, Blumenthal RS, Resar JR, Zacur HA, Gerstenblith G, Brinker JA. Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women. *Circulation.* 1994;**89**:52-60.
- 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**:335-41.
- 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**:1238-44.
- Rodrigo E, Maeso R, Muñoz-García R, Navarro-Cid J, Ruilope LM, Cachofeiro V, Lahera V. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: consequences of chronic treatment with losartan or captopril. *J Hypertens.* 1997;**15**:613-8.
- Rosenberg Zand S, Jenkins DJ, Diamandis EP. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;**62**:35-49.
- Rosenstock M, Danon A, Rimon G. Prostaglandin H synthase: protein synthesis-independent regulation in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol.* 1997;**273**:C1749-C55.

- 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**:1636-40.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2002;**288**:321-33.
- Rowland IR, Wiseman H, Sanders TAB, Adlercreutz H, Bowey EA. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer.* 2000;**36**:27-32.
- Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor(s). *Am J Physiol.* 1986;**50**:H822-H7.
- Ruiz-Larrea MB, Mohan AR, Paganga G, Miller NJ, Bolwell GP, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res.* 1997;**26**:63-70.
- Ruiz-Velasco V, Zhong J, Hume J, Keef K. Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ Res.* 1998;**82**:557-65.
- Sakabe K, Okuma M, Karaki S, Matsuura S, Yoshida T, Aikawa H, Izumi S, Kayama F. Inhibitory effect of natural and environmental estrogens on thymic hormone production in thymus epithelial cell culture. *Int J Immunopharmacol.* 1999;**21**:861-8.
- Samman S, Lyons Wall PM, Chan GS, Smith SJ, Petocz P. The effect of supplementation with isoflavones on plasma lipids and oxidizability of low density lipoprotein in premenopausal women. *Atherosclerosis.* 1999;**147**:277-83.
- Sanchez M, Galisteo M, Vera R, Villar IC, Zarzuelo A, Tamargo J, Perez-Vizcaino F, Duarte J. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2006;**24**:75-84.
- Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc.* 2003;**36**:147-56.
- Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation.* 2000;**101**:1899-906.
- 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**:1653-9.

- 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**:71-8.
- Schiffrin 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**:105-10.
- Schiffrin EL, Touyz RM. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: Benefits of AT1 receptor blockade. *J Am Coll Cardiol*. 2003;**42**:911-3.
- Schiffrin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens*. 2004;**17**:1192-200.
- 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 $\beta$ . *Nature*. 2000;**404**:197-201.
- Schoene NW, Guidry CA. Dietary soy isoflavones inhibit activation of rat platelets. *J Nutr Biochem*. 1999;**10**:421-6.
- 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**:3037-43.
- 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**:806-10.
- Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr*. 2001;**131**:1362S-75S.
- Setchell KD, Faughnan MS, Avades T, Zimmer-Nechemias L, Brown NM, Wolfe BE, Brashear WT, Desai P, Oldfield MF, Botting NP, Cassidy A. Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of <sup>13</sup>C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2003;**77**:411-9.
- Setchell KD, Gosselin SJ, Welsh MB, Johnston JO, Balistreri WF, Kramer LW, Dresser BL, Tarr MJ. Dietary estrogens--a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology*. 1987;**93**:225-33.
- Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE. Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet*. 1997;**350**:23-7.
- Setchell KD. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr*. 1998;**68**:1333S-46S.

- Setchell KD. Soy isoflavones—benefits and risks from nature’s selective estrogen receptor modulators (SERMs). *J Am Coll Nutr.* 2001;**20**:354S-62S.
- Setchell KDR, Brown NM, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol – a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr.* 2002;**132**:3577-84.
- Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer.* 1991;**63**:963-6.
- Shimokado K, Yokota T, Umezawa K, Sasaguri T, Ogata J. Protein tyrosine kinase inhibitors inhibit chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1994;**14**:973-81.
- Shimokado K, Umezawa K, Ogata J. Tyrosine kinase inhibitors inhibit multiple steps of the cell cycle of vascular smooth muscle cells. *Exp Cell Res.* 1995;**220**:266-73.
- 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**:1197-203.
- Shimokawa H, Matoba T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol Res.* 2004;**49**:543-9.
- Simonson MS, Wann S, Mene P. Endothelin stimulates phospholipase C, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest.* 1989;**83**:708-12.
- 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**:231-7.
- Sirtori CR. Risks and benefits of soy phytoestrogens in cardiovascular diseases, cancer, climacteric symptoms and osteoporosis. *Drug Saf.* 2001;**24**:665-82.
- Song J, Davis MJ. Chloride and cation currents activated by bradykinin in coronary venular endothelial cell. *Am J Physiol.* 1994;**267**:H2508-H15.
- 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**:22524-31.
- Spence LA, Lipscomb ER, Cadogan J, Martin B, Wastney ME, Peacock M, Weaver CM. The effect of soy protein and soy isoflavones on calcium metabolism in postmenopausal women: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr.* 2005;**81**:916-22.
- Squadrito F, Altavilla D, Crisafulli A, Saitta A, Cucinotta D, Morabito N, D'Anna R, Corrado F, Ruggeri P, Frisina N, Squadrito G. Effect of genistein on endothelial function in postmenopausal women, a randomized, double-blind, controlled study. *Am J Med.* 2003;**114**:470-6.

- Squadrito F, Altavilla D, Morabito N, Crisafulli A, D'Anna R, Corrado F, Ruggeri P, Campo GM, Calapai G, Caputi AP, Squadrito G. The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium dependent vasodilation in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2002;**163**:339-47.
- Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Cucinotta D, Minutoli L, Deodato B, Ferlito M, Campo GM, Bova A, Caputi AP. Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats. *Cardiovasc Res*. 2000;**45**:454-62.
- Strom BL, Schinnar R, Ziegler EE, Barnhart KT, Sammel MD, Macones GA, Stallings VA, Drulis JM, Nelson SE, Hanson SA. Exposure to soy-based formula in infancy and endocrinological and reproductive outcomes in young adulthood. *JAMA*. 2001;**286**:807-14.
- Stuehr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;**37**:339-59.
- Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson 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**:933-8.
- 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**:2569-75.
- Suthar AC, Banavalikar MM, Biyani MK. Pharmacological activities of Genistein, an isoflavone from soy (*Glycine max*): part II--anti-cholesterol activity, effects on osteoporosis & menopausal symptoms. *Indian J Exp Biol*. 2001b;**39**:520-5.
- Suthar AC, Banavalikar MM, Biyani MK. Pharmacological activities of Genistein, an isoflavone from soy (*Glycine max*): part I--anti-cancer activity. *Indian J Exp Biol*. 2001a;**39**:511-9.
- 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**:948-54.
- Suzuki H, Swee A, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension*. 1995;**25**:1083-9.
- 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**:571-80.

- 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**:2222-9.
- 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**:1298-303.
- 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**:802-8.
- Tamaoki J, Tagaya E, Nishimura K, Isono K, Nagai A. Role of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in cyclic GMP-mediated relaxation of canine pulmonary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 1997;**122**:112-6.
- 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**:853-63.
- Teede HJ, Dalais FS, Kotsopoulos D, Liang Y, Davis S, McGrath BP. Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;**86**:3053-60.
- 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**:105-14.
- Thambyrajah J, Landray MJ, McGlynn FJ, Jones HJ, Wheeler DC, Townend JN. Abnormalities of endothelial function in patients with predialysis renal failure. *Heart* 2000;**83**:205-9.
- Tikkanen MJ, Wahala K, Ojala S, Vihma V, Adlercreutz H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;**95**:3106-10.
- 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**:1205-13.
- 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*. 2003;**23**:981-7.
- Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signalling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004;**44**:248-52.

- 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**:811-7.
- Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest.* 1997;**100**:27793-9.
- Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R.: Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet.* 2001;**358**:2127-8.
- 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.
- Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* 1990;**323**:27-36.
- Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertens.* 1996;**14**:S83-S93.
- Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol.* 2005;**144**:449-58.
- Vanhoutte PM, Miller VM. Heterogeneity of endothelium-dependent responses in mammalian blood vessels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1985;**7**:S12-S23.
- Vanhoutte PM. Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation.* 1993;**87**:V9-V17.
- 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**:179-85.
- Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1998;**31**:1248-54.
- Vega-Lopez S, Yeum KJ, Lecker JL, Ausman LM, Johnson EJ, Devaraj S, Jialal I, Lichtenstein AH. Plasma antioxidant capacity in response to diets high in soy or animal protein with or without isoflavones. *Am J Clin Nutr.* 2005;**81**:43-9.
- 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**:1439-41.
- 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**:913-9.
- 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**:1106-15.
- Viridis 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**:1352-7.
- Von Eye Corleta H, Strowitzki T, Kellerer M, Haring HU. Insulin-like growth factor I-dependent tyrosine kinase activity in stromal cells of human endometrium in vitro. *Am J Physiol.* 1992;**262**:E863-E8.
- Wagner JD, Cefalu WT, Anthony MS, Litwak KN, Zhang L, Clarkson TB. Dietary soy protein and estrogen replacement therapy improve cardiovascular risk factors and decrease aortic cholesteryl ester content in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Metabolism.* 1997;**46**:698-705.
- Walker HA, Dean TS, Sanders TAB, Jackson G, Ritter JM, Chowienczyk PJ. The phytoestrogen genistein produces acute nitric oxide-dependent dilation of human forearm vasculature with similar potency to 17 $\beta$ -estradiol. *Circulation.* 2001;**103**:258-62.
- 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**: 347-57.
- Wang D, Gutkowska J, Marcinkiewicz M, Rachelska G, Jankowski M. Genistein supplementation stimulates the oxytocin system in the aorta of ovariectomized rats. *Cardiovasc Res.* 2003;**57**:186-94.
- Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Booren AM, Gray I, Dewitt DL. Cyclooxygenase active bioflavonoids from Balaton tart cherry and their structure activity relationships. *Phytomedicine.* 2000;**7**:15-9.
- Wang X, Abdel-Rahman AA. Estrogen modulation of eNOS activity and its association with caveolin-3 and calmodulin in rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;**282**:H2309-H15.
- 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**:967-72.
- 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-H5.
- Washburn S, Burke GL, Morgan T, Anthony M. Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause.* 1999;**6**:7-13.

- Wassmann S, Baumer AT, Strehlow K, van Eickels M, Grohe C, Ahlbory K, Rosen R, Bohm M, Nickenig G. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2001;**103**:435-41.
- Watanabe T, Akishita M, Nakaoka T, He H, Miyahara Y, Yamashita N, Wada Y, Aburatani H, Yoshizumi M, Kozaki K, Ouchi Y. Caveolin-1, Id3a and two LIM protein genes are upregulated by estrogen in vascular smooth muscle cells. *Life Sci*. 2004;**75**:1219-29.
- 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-L12.
- Welch WJ, Wilcox CS. AT1 receptor antagonist combats oxidative stress and restores nitric oxide signaling in the SHR. *Kidney Int*. 2001;**59**:1257-63.
- Widder J, Pelzer T, von Poser-Klein C, Hu K, Jazbutyte V, Fritzemeier KH, Hegele-Hartung C, Neyses L, Bauersachs J. Improvement of endothelial dysfunction by selective estrogen receptor-alpha stimulation in ovariectomized SHR. *Hypertension*. 2003;**42**:991-6.
- Williams JK, Anthony MS, Herrington DM. Interactive effects of soy protein and estradiol on coronary artery reactivity in atherosclerotic, ovariectomized monkeys. *Menopause*. 2001;**8**:307-13.
- Williams JK, Clarkson TB. Dietary soy isoflavones inhibit in-vivo constrictor responses of coronary arteries to collagen-induced platelet activation. *Coron Artery Dis*. 1998;**9**:759-64.
- Wiseman H, O'Reilly JD, Adlercreutz H, Mallet AI, Bowey EA, Rowland IR, Sanders TA. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr*. 2000;**72**:395-400.
- Wong CK, Keung WM. Bovine adrenal 3[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase (E.C. 1.1.1.145)/5-ene-4-ene isomerase (E.C. 5.3.3.1): characterization and its inhibition by isoflavones. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999;**71**:191-202.
- 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, Lamontagne D, de Champlain J. Antioxidative properties of acetylsalicylic Acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2002;**105**:387-92.
- 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**:1466-72.

- Xu HL, Galea E, Santizo RA, Baughman VL, Pelligrino DA. The key role of caveolin-1 in estrogen-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase function in cerebral arterioles in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;**21**:907-13.
- Xu JW, Ikeda K, Yamori Y. Genistein inhibits expressions of NADPH oxidase p22phox and angiotensin II type 1 receptor in aortic endothelial cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2004;**27**:675-83.
- Yaffe K, Grady D, Pressman A, Cummings S. Serum estrogen levels, cognitive performance, and risk of cognitive decline in older community women. *J Am Geriatr Soc.* 1998;**46**:816-21.
- Yamaguchi M. Isoflavone and bone metabolism: its cellular mechanism and preventive role in bone loss. *J Health Sci.* 2002;**48**:209-22.
- Yamakoshi J, Piskula MK, Izumi T, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Obata A, Kikuchi M. Isoflavone aglycone-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *J Nutr.* 2000;**130**:1887-93.
- Yamamoto M, Toya Y, Jensen RA, Ishikawa Y. Caveolin is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor signaling. *Exp Cell Res.* 1999;**247**:380-8.
- 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**:104-10.
- 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**:143-8.
- 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**:460-5.
- Yellayi S, Naaz A, Szewczykowski MA, Sato T, Woods JA, Chang J, Segre M, Allred CD, Helferich WG, Cooke PS. The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: a human health concern? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;**99**:7616-21.
- 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**:616-23.
- 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**:2080-5.
- Yuan JM, Wang QS, Ross RK, Henderson BE, Yu MC. Diet and breast cancer in Shanghai and Tianjin, China. *Br J Cancer.* 1995;**71**:1353-8.

- Zanzinger J. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. *Auton Neurosci.* 2002;**98**:24-7.
- Zecchin HG, Bezerra RM, Carvalheira JB, Carvalho-Filho MA, Metzke K, Franchini KG, Saad MJ. Insulin signalling pathways in aorta and muscle from two animal models of insulin resistance-the obese middle-aged and the spontaneously hypertensive rats. *Diabetologia.* 2003;**46**:479-91.
- 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-F8.
- Zhang Y, Song TT, Cunnick JE, Murphy PA, Hendrich S. Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J Nutr.* 1999;**129**:399-405.
- 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.* 2003;**108**:1238-45.
- Zhou MS, Jaimes EA, Raij L. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress. *Hypertension.* 2004;**44**:186-90.
- Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgins J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science.* 2002;**295**:505-8.
- Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol.* 2000;**50**:139-48.
- Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, Wu-Williams AH, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF, Hyer MB. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst.* 1993;**85**:1819-27.
- 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.* 2002;**13**:490-6.
- 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**:2113-7.
- 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.* 2002;**62**:339-45.

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**:375-84.