

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**Efectos preventivos de quercetina sobre la
disfunción endotelial inducida por Endotelina-1.**

Tesis Doctoral para aspirar
al Grado de Doctor que presenta el
Licenciado D. Miguel Romero Pérez

2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Miguel Romero Pérez
D.L.: GR. 2632-2009
ISBN: 978-84-692-4169-1

A Maite

A mis padres

A mis hermanos

*El pesimista se queja del viento,
el optimista espera que cambie,
el realista ajusta las velas.*

William Arthur Ward

*“la teoría es asesinada tarde o temprano
por la experiencia”.*

Albert Einstein

*"un buen científico es aquel que puede
unir su imaginación con la realidad
mediante el puente de la ciencia"*

A. Bernardin

Abreviaturas empleadas.

Aa	Aminoácido.	cDNA	DNA complementario.
Ach	Acetilcolina.	Chele	Celeritrina.
ADMA	Dimetil arginina asimétrica.	COMT	Catecol-o-metil transferasa.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.	COX	Ciclooxigenasa.
Akt	Proteín kinasa B.	c-Src	Tirosín kinasa independiente de receptor c-Src.
Ang II	Angiotensina II.	CuZn-SOD	SOD dependiente de cobre y cinc.
AP-1	Activador de proteína 1.	DAG	Diacilglicerol.
Apo	Apocinina.	DAPI	Dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol.
ARA-II	Antagonistas del receptor de angiotensina II.	DHE	Dihidroetidio.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.	DMSO	Dimetilsulfóxido.
ATP	Adenosín trifosfato.	DOCA	Acetato de deoxicorticosterona
BH₂	Dihidrobiopterina.	DPI	Difeniléniodonio.
BH₄	Tetrahidrobiopterina.	DTT	Ditiotreitilol.
Big-ETs	Endotelinas de 37-41 aminoácidos.	ECL	Desarrollo de quimioluminiscencia.
Cat	Catalasa.	ECA	Enzima convertidora de angiotensina II.
CaMK-II	Proteína kinasa II dependiente de calcio/calmodulina.	ECE	Enzima convertidora de endotelina.
CDKs	Kinasas dependientes de ciclinas.		

Abreviaturas

EDHF	Factor hiperpolarizante derivado de endotelio.	HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-etanosulfónico.
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético.	H₂O₂	Peróxido de hidrógeno.
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético.	HTA	Hipertensión arterial.
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial.	IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.
ERK 1/2	Kinasas reguladas por señales extracelulares 1/2.	IGF	Factor de crecimiento de insulina.
ET_A	Receptor de endotelina tipo A.	IL	Interleuquina.
ET_B	Receptor de endotelina tipo B.	IP₃	Inositol trifosfato.
ETs	Endotelinas.	Iso	Isorramnetina.
ET-1	Endotelina 1.	JNK	Kinasa c-jun-NH ₂ -terminal.
ET-2	Endotelina 2.	LDL	Lipoproteínas de baja densidad.
ET-3	Endotelina 3.	L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginina metil éster.
ET-4	Endotelina 4.	LO ·	Radical lipídico.
GC	Guanilato ciclasa.	LOO ·	Radical lipídico.
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico.	LOX	Lipooxigenasa.
GPx	Glutation peroxidasa.	M	Molar.
HCl	Ácido hipocloroso.	MAPKs	Proteín kinasas activadas por mitógeno.
HDL	Lipoproteínas de alta densidad.	MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1.
		MDA	Malonildialdehido.

MLCK	Kinasa de cadenas ligeras de miosina.	ONOO⁻	Peroxinitrito.
MMPs	Metaloproteasas de matriz.	P70^{56k}	proteína S6 kinasa ribosomal.
MAPK	Proteínas kinasas activadas por mitógeno.	PD 98059	2'-Amino-3'-metoxiflavona =Inhibidor de ERK1/2.
MAPKK	Proteínas kinasas kinasas activadas por mitógeno =MEK.	PDEs	Fosfodiesterasas.
MAPKKK	Proteínas kinasas kinasas kinasas activadas por mitógeno.	PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
Mn-SOD	SOD dependiente de manganeso.	PDK	Proteína kinasa dependiente de fosfatidilinositol-3,4,5-P ₃ .
NA	Noradrenalina.	PGs	Prostaglandinas.
NAD⁺	Nicotinamín adenín dinucleótido oxidado.	PGI₂	Prostaciclina.
NADH	Nicotinamín adenín dinucleótido reducido.	PI3K	Fosfatidil inositol-3-kinasa.
NADPH	Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato.	PKB	Proteín kinasa B = Akt.
NF-κβ	Factor de transcripción nuclear κβ.	PKC	Proteín kinasa C.
NO	Óxido nítrico.	PKG	Proteín kinasa G.
NO₂⁺	Radicales nitritos.	PLC	Fosfolipasa C.
NOS	Óxido nítrico sintasa.	PLD	Fosfolipasa D.
O₂⁻	Radical superóxido.	PMA	12-miristato 13-acetato forbol.
OH⁻	Radical hidroxilo.	PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo.
		PP2	4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil) pirazolo[3,4-d] pirimidina.

Abreviaturas

PP3	4-amino-7-fenilpirazolo [3,4-d] pirimidina.	SEM	Error estándar de la media
PPAR	Receptor para el activador de la proliferación de peroxisomas.	Sep	Sepiapterin
PTK	Proteín tirosina kinasa.	SGLT1	Transportador de glucosa dependiente de sodio tipo 1.
PTP	Proteín tirosina fosfatasa.	SH2	Src homólogo 2.
PVDF	Fluoruro de polivinilideno.	SHR	Rata espontáneamente hipertensa.
PyK₂	Tirosina kinasa 2 rica en prolina.	SNC	Sistema nervioso central.
Quer	Quercetina.	SOD	Superóxido dismutasa.
Rac-1	Proteína G de bajo peso molecular Rac 1.	SP 600125	Antra[1,9-cd]pirazol-6(2H)-1,9-pirazoloantrona = Inhibidor de SAPK/JNK.
RLU	Unidades relativas de luminiscencia.	SP-SHR	Rata espontáneamente hipertensa con tendencia a infarta cerebral.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.	SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona.
r.p.m.	Revoluciones por minuto.	TBARs	Substancias reactivas del ácido tiobarbitúrico.
RT-PCR	Retrotranscriptasa inversa-reacción de la polimerasa en cadena.	TBS-T	Tampón Tris salino tamponado al 0.1% de Tween 20.
SAPK/JNK	Proteína kinasa activada por estrés/c-Jun N-terminal kinasa =JNK.	TGF-β	Factor de crecimiento transformante β .
SB 203580	4-(4-Fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)1H-imidazol =Inhibidor de p38 ^{mapk} .	TNF-α	Factor de necrosis tumoral α .
SDS	Dodecilsulfato sódico.	TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano.
		TXA₂	Tromboxano A ₂ .

UDP	Uridín difosfato.	VSMC	Células del músculo liso vascular.
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular.	XO	Xantina oxidasa.
VIC	Péptido vasconstrictor intestinal = ET-4.		

Índice.

INTRODUCCIÓN	1
1. SISTEMA DE ENDOTELINAS	3
1.1. Estructura.....	3
1.2. Biosíntesis, regulación y lugares de generación.....	5
1.3. Receptores de ET-1.....	8
1.4. Vías de señalización de ET-1.....	11
1.5. Efectos de ET-1.....	14
2. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL, ESTRÉS OXIDATIVO Y ET-1	21
2.1. Disfunción endotelial: Definición y concepto.....	21
2.2. Disfunción endotelial y estrés oxidativo.....	22
2.2.a. Papel de la NAD(P)H oxidasa en el estrés oxidativo vascular.....	27
- Estructura, función y localización.....	27
- Actividad mediada por ET-1.....	29
- Efectos <i>in vitro</i> de la activación de NAD(P)H oxidasa.....	30
- Efectos <i>in vivo</i> de la actividad de NAD(P)H oxidasa.....	31
2.2.b. Papel de la xantina oxidasa.....	31
2.2.c. Papel del desacoplamiento de la eNOS.....	32
2.2.d. Papel de las enzimas antioxidantes.....	34
2.3. Disfunción endotelial y ET-1.....	34
2.4. Valor pronóstico de la disfunción endotelial.....	37
2.5. Tratamiento de la disfunción endotelial.....	38
3. FLAVONOIDES	40
3.1. Generalidades.....	40
3.2. Biodisponibilidad y metabolismo de quercetina.....	45
3.3. Efectos vasculares <i>in vitro</i> de quercetina.....	47
3.3.a. Efecto directo sobre el tono del músculo liso y la proliferación de fibras musculares.....	47

3.3.b. Efectos sobre el óxido nítrico.	48
3.3.c. Efectos antioxidantes.	50
3.3.d. Efectos sobre el factor hiperpolarizante derivado de endotelio.	51
3.3.e. Efectos sobre ET-1.	51
3.3.f. Efectos sobre la apoptosis y la proliferación de células endoteliales.	52
3.4. Efectos <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i> de quercetina.	52
3.4.a. Sobre la función endotelial en la hipertensión.	52
3.4.b. Sobre la oxidación de LDL y aterosclerosis.	55
3.4.c. Sobre las enfermedades cardiovasculares.	56
3.4.d. Sobre el infarto cerebral.	56
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.	59
JUSTIFICATION AND AIMS.	65
MATERIAL Y MÉTODOS.	71
1.1. Animales de experimentación.	73
1.2. Pruebas de reactividad vascular.	74
1.3. Detección <i>in situ</i> de la producción vascular de O_2^-	76
1.4. Medida de la producción vascular de O_2^-	77
1.5. Expresión vascular mediante RT-PCR y Western Blot.	79
1.6. Determinación de la actividad PKC vascular.	84
1.7. Reactivos.	85
1.8. Análisis estadístico.	85

RESULTADOS	87
1. Efecto de Quercetina e Isorramnetina sobre la Disfunción Endotelial inducida por Endotelina-1 in Vitro.....	89
1.1. Disfunción endotelial.....	89
1.2. Localización de la producción in situ de O_2^-	94
1.3. Efectos en la producción vascular de O_2^-	96
1.4. Efectos en la expresión de las subunidades p47 ^{phox} y p22 ^{phox} del sistema NAD(P)H oxidasa.....	99
1.5. Papel de la PKC.....	100
1.6. Papel de c-Src.....	103
1.7. Papel de las MAPKs.....	111
DISCUSIÓN	117
1. Efecto de Quercetina e Isorramnetina sobre la Disfunción Endotelial inducida por Endotelina-1 in Vitro. Participación de la PKC.....	119
2. Participación de c-Src y MAPKs en la vía de señalización de ET-1.....	125
3. Limitaciones del estudio.....	130
CONCLUSIONES	133
CONCLUSIONS	137
BIBLIOGRAFÍA	141

Índice de Figuras y Tablas.

Figuras.

Figura 1. Estructura de las endotelinas.....	4
Figura 2. Síntesis, regulación y acciones vasculares de ET-1.....	10
Figura 3. Efectos de ET-1.....	20
Figura 4. Mecanismos causantes de la disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares.....	23
Figura 5. Esquema de la producción de ROS y sus interacciones con el NO.....	24
Figura 6. Mecanismos de señalización redox dependientes en las CMLV y sus efectos fisiológicos mediados por ROS, que tienden a producir y mantener la hipertensión.....	26
Figura 7. Desacoplamiento de la eNOS.....	33
Figura 8. Estructura general de los flavonoides y numeración de sus sustituyentes.....	40
Figura 9. Principales grupos de flavonoides y sus representantes más significativos.....	42

Figura 10 Esquema de las actividades biológicas de los flavonoides y sus principales efectos saludables.....	44
Figura 11 A. Efectos de ET-1 sobre la función vascular. Curva concentración-respuesta relajante a acetilcolina en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina.....	89
Figura 11 B. Efectos de ET-1 sobre la función vascular. Curva concentración-respuesta contractil a fenilefrina.....	89
Figura 12 A. Efectos de quercetina sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1. Curva concentración-respuesta relajante a acetilcolina en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina.....	91
Figura 12 B. Efectos de isoramnetina sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1. Curva concentración-respuesta relajante a acetilcolina en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina.....	91
Figura 12 C. Efectos de quercetina e isoramnetina sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1. Curva concentración-respuesta contractil a fenilefrina.....	91
Figura 13 A. Participación de los radicales superóxido en la disfunción endotelial inducida por ET-1. Curva concentración-respuesta relajante a acetilcolina en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina.....	93
Figura 13 B. Efectos de apocinina, sepiapterin y L-NAME en la disfunción endotelial inducida por ET-1. Curva concentración-respuesta relajante a acetilcolina en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina.....	93

Figura 13 C. Participación de los radicales superóxido en la disfunción endotelial inducida por ET-1. Curva concentración-respuesta contractil a fenilefrina.....93

Figura 14 A. Microfotografías mostrando el efecto de quercetina e isoramnetina sobre la producción vascular de radicales superóxido inducida por ET-1, mediante DHE y DAPI.....95

Figura 14 B. Efectos de quercetina e isoramnetina sobre la producción vascular de radicales superóxido inducida por ET-1, medido mediante la relación fluorescencia de etidio/fluorescencia DAPI en anillos aórticos.....95

Figura 15 A. Efectos de ET-1 sobre la producción vascular de radicales superóxido medida mediante quimioluminiscencia con lucigenina.....97

Figura 15 B. Efecto de quercetina sobre el aumento en la producción vascular de radicales superóxido inducida por ET-1, medido mediante quimioluminiscencia con lucigenina.....97

Figura 15 C. Efecto de isoramnetina sobre el aumento en la producción vascular de radicales superóxido inducida por ET-1, medido mediante quimioluminiscencia con lucigenina.....97

Figura 16 A. Papel del endotelio en el aumento en la producción vascular de radicales superóxido inducida por ET-1, medido mediante quimioluminiscencia con lucigenina. La producción de superóxido fue estimulada por el ionóforo de calcio A23187.....98

Figura 16 B. Efectos de quercetina e isoramnetina sobre la producción vascular de radicales superóxido inducida por ET-1, medido mediante quimioluminiscencia con

lucigenina. La producción de superóxido fue estimulada por el ionóforo de calcio A23187.....98

Figura 17 A. Efectos de quercetina e isorramnetina co-incubadas durante 2 horas con ET-1 sobre la expresión vascular de p47phox a nivel de RNA mensajero mediante RT-PCR.....99

Figura 17 B. Efectos de quercetina e isorramnetina co-incubadas durante 2 horas con ET-1 sobre la expresión vascular de p22phox a nivel de RNA mensajero mediante RT-PCR.....99

Figura 17 C. Efectos de quercetina e isorramnetina co-incubadas durante 2 horas con ET-1 sobre la expresión vascular de p47phox a nivel proteico mediante western blot.....99

Figura 17 D. Efectos de quercetina e isorramnetina co-incubadas durante 2 horas con ET-1 sobre la expresión vascular de p22phox a nivel proteico mediante western blot.....99

Figura 18 A. Papel de la proteína kinasa C. Efecto de celeritrina (1 μ M) sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1 (10 nM). Curva de relajación concentración-respuesta a acetilcolina en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina.....101

Figura 18 B. Papel de la proteína kinasa C. Efecto de celeritrina (1 μ M) sobre la el aumento en la expresión vascular de p47^{phox} inducida por ET-1 (10 nM) a nivel proteico mediante western blot.....101

Figura 18 C. Papel de la proteína kinasa C. Efecto de celeritrina (1 μ M) sobre la producción vascular de radicales superóxido (O_2^-) inducida por ET-1 (10 nM) medida mediante quimioluminiscencia con lucigenina.....101

Figura 18 D. Papel de la proteína kinasa C. Efectos de quercetina (10 μ M), isorramnetina (10 μ M) o celeritrina (1 μ M) sobre la producción vascular de radicales superóxido inducida por 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) (1 μ M), medida mediante quimioluminiscencia con lucigenina.....101

Figura 19. Efectos de quercetina (10 μ M), isorramnetina (10 μ M) o celeritrina (1 μ M) sobre la actividad vascular de PKC inducida por 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) (1 μ M) o ET-1 (10 nM) incubados durante 30 minutos.....102

Figura 20 A. Papel de la tirosina kinasa c-Src. Microfotografías mostrando el efecto de PP2 y PP3 sobre la producción vascular de radicales superóxido inducida por ET-1, mediante DHE y DAPI.....104

Figura 20 B. Papel de la tirosina kinasa c-Src. Efectos de PP2 y PP3 sobre la producción vascular de radicales superóxido inducida por ET-1, medido mediante la relación fluorescencia de etidio/fluorescencia DAPI en anillos aórticos.....104

Figura 20 C. Papel de la tirosina kinasa c-Src. Efectos de PP2 y PP3 sobre la producción vascular de radicales superóxido inducida por ET-1, medido mediante quimioluminiscencia con lucigenina.....104

Figura 21 A. Papel de la tirosina kinasa c-Src. Efectos de PP2 y PP3 sobre el aumento de la expresión vascular de p47phox inducido por ET-1 (10nM) a nivel de RNA mensajero mediante RT-PCR.....105

Figura 21 B. Papel de la tirosina kinasa c-Src. Efectos de PP2 y PP3 sobre el aumento de la expresión vascular de p47phox inducido por ET-1 (10nM) a nivel proteico mediante western blot.....105

Figura 22 A. Efectos sobre la actividad de la tirosina kinasa c-Src inducidos por ET-1. Efectos de PP2 sobre el aumento de la expresión vascular de fosfo-Src inducido por ET-1 (10nM) a nivel proteico mediante western blot.....107

Figura 22 B. Efectos sobre la actividad de la tirosina kinasa c-Src inducidos por ET-1. Efectos de PP2 sobre el aumento de la expresión vascular de Src inducido por ET-1 (10nM) a nivel proteico mediante western blot.....107

Figura 22 C. Efectos sobre la actividad de la tirosina kinasa c-Src inducidos por ET-1. Relación en porcentaje de los valores de expresión de fosfo-Src y Src.....107

Figura 22 D. Efectos sobre la actividad de la tirosina kinasa c-Src inducidos por ET-1. Efecto de PP2 sobre el aumento de la expresión vascular de Src inducido por ET-1 (10nM) a nivel de RNA mensajero mediante RT-PCR.....107

Figura 23 A. Efectos sobre la activación de la tirosina kinasa c-Src inducidos por ET-1. Efecto de PP2 sobre el aumento de la expresión vascular de fosfo-cortactin inducido por ET-1 (10nM) a nivel proteico mediante western blot.....109

Figura 23 B. Efectos sobre la activación de la tirosina kinasa c-Src inducidos por ET-1. Efectos de quercetina (10µM) e isorramnetina (10µM) sobre el aumento de la expresión vascular de fosfo-cortactin inducido por ET-1 (10nM) a nivel proteico mediante western blot.....109

Figura 24. Implicación de la PKC en la activación de la tirosina kinasa c-Src inducida por ET-1. Expresión vascular de c-Src en anillos aórticos incubados durante 2 horas con vehículo (DMSO, 0,1%) o el inhibidor selectivo de PKC, celeritrina (Chele, 1 μ M) en presencia o ausencia de ET-1 (10 nM).....110

Figura 25 A. Papel de las MAPKs. Microfotografías mostrando el efecto de PD98059 (10 μ M), SB203580 (10 μ M) o SP600125 (25 μ M) sobre la producción vascular de radicales superóxido inducida por ET-1, mediante DHE y DAPI.....112

Figura 25 B. Papel de las MAPKs. Efectos de PD98059 (10 μ M), SB203580 (10 μ M) o SP600125 (25 μ M) sobre la producción vascular de radicales superóxido inducida por ET-1, medido mediante la relación fluorescencia de etidio/fluorescencia DAPI en anillos aórticos.....112

Figura 26. Papel de las MAPKs. Efectos de PD98059 (10 μ M), SB203580 (10 μ M) o SP600125 (25 μ M) sobre el aumento de la expresión vascular de p47phox inducido por ET-1 (10nM) a nivel proteico mediante western blot.....113

Figura 27. Efecto de ET-1 (10 nM) sobre la fosforilación de ERK1/2 a diferentes tiempos de incubación.....114

Figura 28 A. Implicación de PKC y c-Src en el aumento de la fosforilación de ERK1/2 inducido por ET-1. Efectos del inhibidor de las kinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2), PD98059 (10 μ M) y del inhibidor selectivo de c-Src, PP2 (10 μ M) sobre el aumento de la fosforilación de ERK1/2 inducida por ET-1 a nivel proteico mediante western blot.....115

Figura 28 B. Implicación de PKC y c-Src en el aumento de la fosforilación de ERK1/2 inducido por ET-1. Efectos del inhibidor de PKC, celeritrina (10 μ M) sobre el aumento de

la fosforilación de ERK1/2 inducida por ET-1 a nivel proteico mediante western blot.....115

Figura 29 A. Efectos de quercetina e isorramnetina sobre la fosforilación de ERK1/2 inducida por ET-1. Efectos de quercetina (Quer) (1 μ M y 10 μ M) co-incubada durante 2 horas con ET-1 sobre el aumento de la fosforilación de ERK1/2 inducida por ET-1 a nivel proteico mediante western blot.....116

Figura 29 B. Efectos de quercetina e isorramnetina sobre la fosforilación de ERK1/2 inducida por ET-1. Efectos de isorramnetina (Iso) (1 μ M y 10 μ M) co-incubada durante 2 horas con ET-1 sobre el aumento de la fosforilación de ERK1/2 inducida por ET-1 a nivel proteico mediante western blot.....116

Figura 30. Esquema de disfunción endotelial inducida por endotelina-1(ET-1) y efecto sobre ella de los flavonoides quercetina e isorramnetina.....129

Tablas.

Tabla 1. Respuestas contráctiles a fenilefrina (1 μ M) y valores de pD_2 y E_{max} para relajaciones inducidas por acetilcolina en anillos aórticos incubados con ET-1 (10 nM) durante 2 horas calculados a partir de los datos de la Figura 1.....90

Tabla 2. Respuestas contráctiles a fenilefrina (1 μ M) y valores de pD_2 y E_{max} para relajaciones inducidas por acetilcolina en anillos aórticos incubados con quercetina (1 μ M o 10 μ M) o isorramnetina (1 μ M o 10 μ M) en presencia o en ausencia de ET-1 (10 nM) durante 2 horas calculados a partir de los datos de la Figura 2.....92

Introducción.

Introducción.

1. Sistema de endotelinas

1.1. Estructura.

En la década de los 80, Hickey y cols. (1985) describieron por primera vez la existencia de un factor endógeno vasoconstrictor liberado por células endoteliales cultivadas. Posteriormente, Yanagisawa y cols. (1988) aislaron y clonaron este factor endógeno vasoconstrictor, que recibió el nombre de endotelina-1.

Las endotelinas (ETs) constituyen una familia de péptidos endógenos de 21 aminoácidos (Aa) con una importante actividad biológica en el organismo. Se han identificado 4 isoformas de endotelina: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) y endotelina-3 (ET-3), así como una isoforma murina de ET-2 llamada endotelina-4 (ET-4) o péptido vasoconstrictor intestinal (VIC, *vasoactive intestinal contractor*) (Inoue et al., 1989; Rosendorff, 1996).

La familia de ETs tiene en común su estructura en forma de bucle provocada por la presencia de dos puentes disulfuro internos entre las cisteínas en posición 1-15 y 3-11 del extremo N-terminal y un grupo de 6 Aa hidrofóbicos en el extremo C-terminal. La estructura en forma de bucle y el extremo C-terminal hidrofóbico son esenciales para la actividad biológica de las ETs (Nakajima *et al.*, 1989). La ET-2 presenta 2 sustituciones en posiciones 6 y 7, mientras que la ET-3 presenta 6 sustituciones en posiciones 2, 4, 5, 6, 7 y 14, respecto a la ET-1 (Figura 1).

La ET-1 es la isoforma más importante de esta familia y la más abundante en la vasculatura. Se caracteriza por ser la única isoforma que se sintetiza en el endotelio.

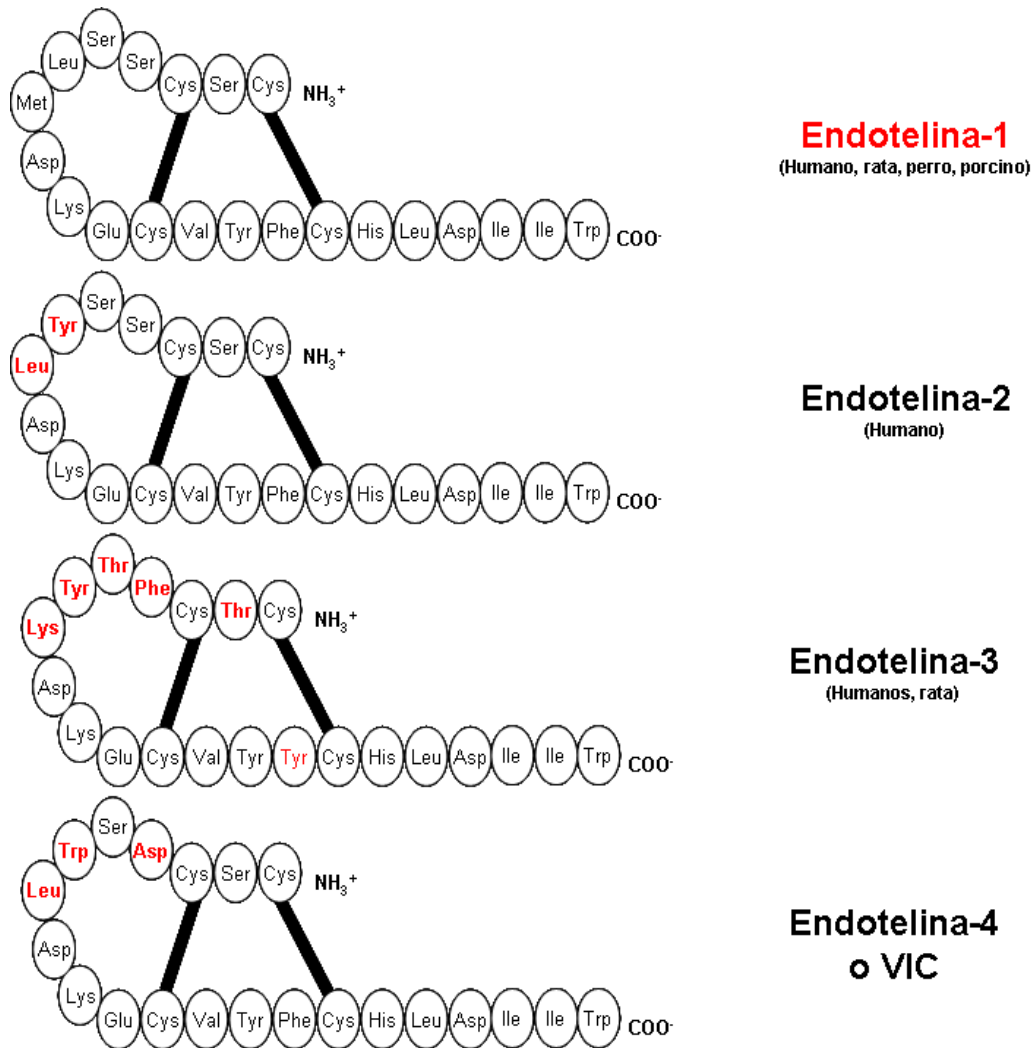


Figura 1. Estructura de las ETs. Todas las isoformas conservan los últimos seis Aa del extremo carboxilo, así como, dos puentes disulfuro que se establecen entre los cuatro residuos de cisteína presentes en las posiciones 1-15 y 3-11.

1.2. Biosíntesis, regulación y lugares de generación

Cada isoforma de ET está expresada por un gen diferente, que da lugar a un precursor específico para cada isoforma llamado preproendotelina (péptido de 212 Aa). La producción de las isoformas activas de ET es un proceso bifásico, con una primera fase donde los isopéptidos preproendotelina son transformados en péptidos de 37-41 Aa llamados big-endotelinas (big-ETs) por acción de endopeptidasas; y una segunda fase, donde estas big-ETs dan lugar a los péptidos activos de 21 Aa (ET-1, ET-2 y ET-3) por acción de las enzimas convertidoras de endotelina (ECEs) (Denault *et al.*, 1995; Tostes *et al.*, 2008). No obstante, la síntesis de las endotelinas puede ser llevada a cabo por otras vías ECEs-independientes, mediadas por enzimas del tipo quimasas, que rompen la big-ET en la unión Tyr³¹-Gly³² dando lugar a las ETs de 31 Aa (ET-1¹⁻³¹, ET-2¹⁻³¹, ET-3¹⁻³¹), o bien endopeptidasas o metaloproteinasas (metaloproteinasa-2 o metaloproteinasa-9 vasculares) (Turner *et al.*, 1997; Kishi *et al.*, 1998; D'Orléans-Juste *et al.*, 2003; Alonso y Radomski, 2003; Böhm y Pernow, 2007).

Las ECEs son una familia de zinc metaloproteinasas unidas a membrana (Denault *et al.*, 1995). Se han identificado dos tipos, ECE-1 y ECE-2, que se diferencian por su localización y pH óptimo para su actividad (Shimada *et al.*, 1994).

ECE-1 se localiza en diversos tipos de células, pero es en las células endoteliales donde está mayoritariamente expresada (Korth *et al.*, 1999). ECE-1 es activa a pH neutro, lo que hace que sea activa tanto intracelularmente como en la membrana plasmática. Se han identificado 4 isoformas de ECE-1 (ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c, ECE-1d) con igual eficacia pero diferente funcionalidad y distribución en los tejidos (Valdenaire *et al.*, 1999). Estas cuatro isoformas de ECE-1 difieren en su localización celular, así, mientras que la ECE-1b es intracelular, las otras isoformas se localizan en la membrana plasmática teniendo una acción extracelular. Además la ECE-1b puede dimerizarse con las otras isoformas membranales regulando la actividad de estas últimas (Muller *et al.*, 2003b).

ECE-2 está localizada intracelularmente, es activa a un pH=5.8 y se localiza en diversos tipos de células incluyendo neuronas.

Tanto ECE-1 como ECE-2 presenta mayor afinidad por big-ET-1 que por big ET-2 o big ET-3.

Las endotelinas son sintetizadas en diversos tejidos del organismo. ET-1 es sintetizada fundamentalmente en las células endoteliales, lo cual está estrechamente relacionado con la mayor expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para pre-proendotelina-1 y la presencia de ECEs intracelulares en las células endoteliales (Plumpton *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1994). La ET-1 también es sintetizada en las células del músculo liso vascular (VSMC, *vascular smooth muscle cells*), corazón, riñón, pituitaria posterior y sistema nervioso central (SNC), pero a una concentración mucho menor (Agapitov *et al.*, 2002). ET-2 es sintetizada en células endoteliales, corazón y riñón (Howard *et al.*, 1992). ET-3 es sintetizada en células endocrinas, gastrointestinales y del SNC, pero no en células endoteliales (Gray *et al.*, 1995). En el SNC, la ET-3 ejerce su acción a través de receptores de ET tipo B (ET_B), actuando como un neuropéptido implicado en la migración de las células de las crestas neurales (Hosoda *et al.*, 1994).

La producción de ET-1 por las células endoteliales está regulada en el proceso de síntesis del péptido, pero no en su liberación, ya que la célula endotelial no tiene gránulos de reserva donde la ET-1 sea almacenada y posteriormente liberada. Sin embargo, existen indicios de que la ET-1 preformada puede almacenarse en unos depósitos intracelulares específicos de las células endoteliales llamados cuerpos de Weibel-Palade, desde donde es liberada en respuesta a un estímulo externo (Russell *et al.*, 1998). No obstante, los mecanismos de liberación de esta ET-1 almacenada no se conocen bien.

Una vez sintetizada, la ET-1 es liberada continuamente desde las células endoteliales vasculares, actuando en la regulación del tono vascular y ejerciendo acciones paracrinas, endocrinas, autocrinas y secretoras (Brunner *et al.*, 2006). Además, la ET-1 es liberada por otras células del organismo como VSMC, cardiomiocitos, leucocitos, macrófagos, células mesangiales y células del túbulo renal (Tostes *et al.*, 2008).

La producción y liberación de ET-1 es estimulada por diversos agentes como: hormonas vasoactivas (angiotensina-II, vasopresina, cortisol, adrenalina, trombina, insulina), factores de crecimiento (factor de crecimiento transformante (TGF- β , *transforming growth factor β*); factores de crecimiento de insulina (IGF, *insulina growth factor*)), factores metabólicos (glucosa, lipoproteínas de baja densidad (LDL, *low density lipoprotein*), colesterol), hipoxia, cambios en las fuerzas de cizallamiento de la pared vascular, radicales libres, endotoxinas y ciclosporina (Tamarisa *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1995). Existe una implicación de la proteína cinasa C (PKC, *protein kinase C*) Ca^{2+} -dependiente en dicha estimulación, inhibiéndose la expresión de la ET-1 en presencia de inhibidores de PKC y quelantes de calcio (Emori *et al.*, 1991). Otros factores que también disminuyen la expresión del gen de la ET-1 son el óxido nítrico (NO, *nitric oxide*) derivado del endotelio (Warner *et al.*, 1992; Boulanger y Luscher, 1990), los péptidos natriuréticos (Emori *et al.*, 1993; Kohno *et al.*, 1992), que elevan el guanósín monofosfato cíclico (GMPc) y disminuyen la actividad de PKC, y la heparina (Imai *et al.*, 1993; Yokokawa *et al.*, 1993).

Por otra parte, el factor fisiológico que desempeña el papel más importante para la regulación de la producción y liberación de ET-1 es el cambio de flujo sanguíneo. El aumento de flujo sanguíneo promueve vasodilatación activando receptores de células endoteliales con liberación de NO y disminución en la producción y liberación de ET-1 (Kuchan y Frangos, 1993; Miller y Burnett, 1992).

El aclaramiento de ET-1 (mecanismos por los que se degrada e inactiva) tiene lugar por diferentes mecanismos (internalización de receptores de ET_B y degradación enzimática por endopeptidasas) que se producen principalmente en pulmones y en otros órganos como riñones, hígado y corazón (Dupuis *et al.*, 1996; Dupuis *et al.*, 1999; Johnström *et al.*, 2005). El aclaramiento de ET-1 por internalización de receptores de ET_B , descrito por primera vez por Fukuroda *et al.* (1994), es un mecanismo por el que se mantienen niveles plasmáticos bajos de ET-1, cercanos al rango vasodilatador.

En condiciones fisiológicas, las ETs no son hormonas circulantes sino que ejercen una acción autocrina y paracrina en el organismo, debido a que los niveles plasmáticos que se alcanzan son muy bajos (Kedzierski *et al.*, 2001).

La activación del sistema de ETs en hipertensión arterial (HTA) y en otras enfermedades cardiovasculares se determina mediante los niveles plasmáticos de ET-1, la expresión de ET-1 en los tejidos, los niveles tisulares de ET-1 o la respuesta a antagonistas de receptores de ET-1. Los niveles plasmáticos de ET-1, que se encuentran elevados en pacientes con HTA esencial o insuficiencia renal, no reflejan el incremento en la producción local de ET-1 (Tostes *et al.*, 2008).

1.3. Receptores de ET-1

La ET-1 ejerce sus acciones a través de la activación de dos tipos de receptores, el receptor de endotelina A (ET_A) y B (ET_B). Ambos tipos de receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G y dan lugar a respuestas fisiológicas diferentes (Arai *et al.*, 1990; Pierce *et al.*, 2002).

Los receptores ET_A están expresados fundamentalmente en las VSMC, donde median vasoconstricción y estimulan el crecimiento y proliferación de las VSMC. También, se expresan en cardiomiocitos, fibroblastos, hepatocitos, adipositos, osteoblastos y neuronas, donde median respuestas mitogénicas y pro-inflamatorias. La afinidad de las endotelinas por los receptores ET_A es ET-1=ET-2<ET-3 (Arai *et al.*, 1990; Bouallegue *et al.*, 2007).

Se conoce la existencia de dos subtipos de receptores ET_B, con diferente localización y función. Los receptores ET_{B1} están expresados principalmente en las células endoteliales, donde originan la liberación de NO y prostaciclina (PGI₂), dando lugar a respuestas vasodilatadoras y antiapoptóticas. Los receptores ET_{B2} se localizan en las VSMC, donde median respuestas vasoconstrictoras, así como en el estómago, útero, cerebro, corteza adrenal y riñón, donde participan en respuestas mitogénicas y pro-

inflamatorias. La afinidad de los receptores ET_B por las endotelinas es $ET-1=ET-2=ET-3$ (Sakurai *et al.*, 1993; Rosendorff, 1996)

El número de receptores de ET-1 es regulado por distintos factores, así la angiotensina y los esteres de forbol disminuyen su expresión, mientras que la ciclosporina y la isquemia la aumentan (Agapitov *et al.*, 2002). Por otro lado, en determinadas situaciones patológicas como aterosclerosis, hipertensión o resistencia a la insulina, la distribución de los receptores ET_B se puede ver alterada, disminuyendo a nivel endotelial y aumentando a nivel de la capa media vascular (Iglarz y Clozel 2007).

Un aspecto característico de la ET-1 es que la unión a sus receptores es muy estable, lo que explicaría la profunda vasoconstricción que origina (Tostes *et al.*, 2008).

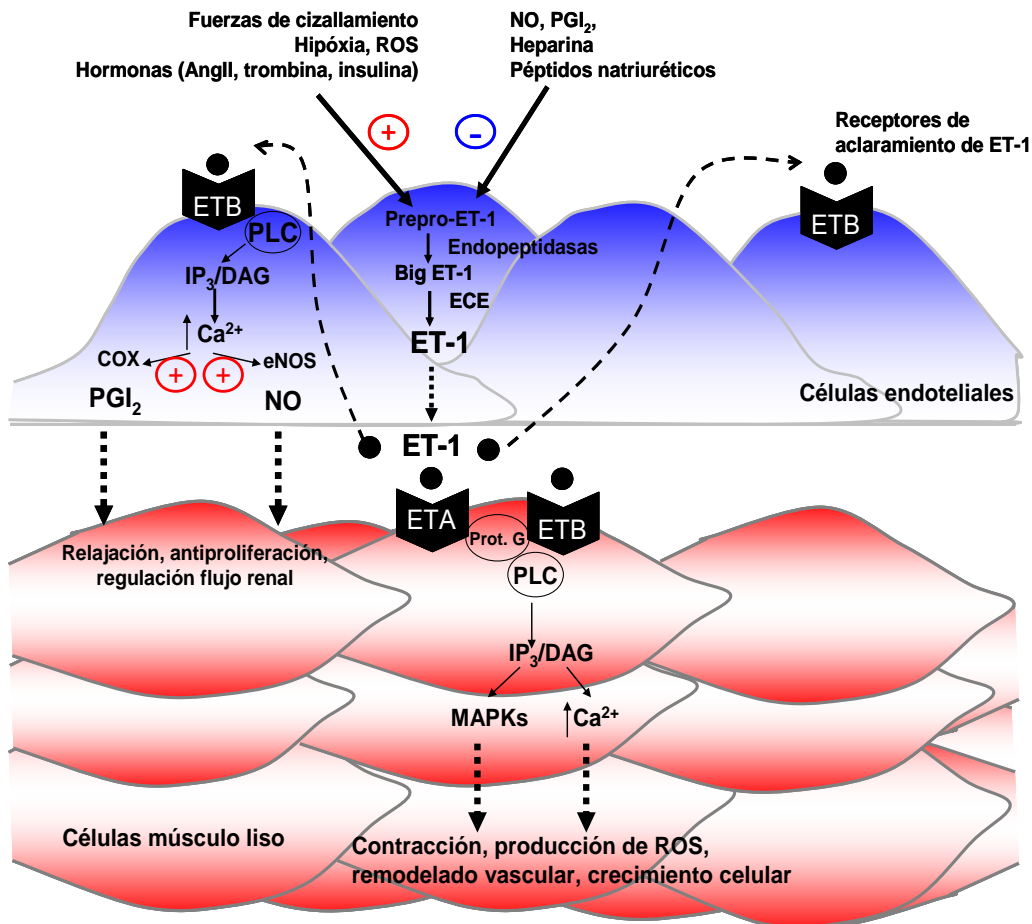


Figura 2. Síntesis, regulación y acciones vasculares de ET-1. La liberación de la ET-1 es regulada a nivel transcripcional y/o a nivel de la actividad de la enzima convertidora de endotelina (ECE) por la acción de diversos agentes. Una vez liberada, la ET-1 ejerce sus acciones a través de dos tipos de receptores: ET_A y ET_B. Los receptores ET_A se localizan en las VSMC donde median vasoconstricción, proliferación y remodelado vascular, debido a un aumento en los niveles de Ca²⁺ intracelular por activación de la fosfolipasa C (PLC) y liberación de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). Los receptores ET_B se localizan en las células endoteliales donde median respuestas vasodilatadores y antiproliferativas, debido a un aumento en la liberación de NO y prostaglandinas (PGs), y son los responsables del aclaramiento de ET-1, mecanismo por el que se degrada e inactiva la ET-1; así como en las VSMC (ET_{B2}), donde median vasoconstricción, proliferación y remodelado vascular.

⊕ Activación. ⊖ Inhibición.

1.4. Vías de señalización de ET-1

Se ha observado que ET-1 induce la activación de algunas vías de señalización implicadas a corto plazo en la regulación del tono vascular y a largo plazo en la regulación de la hipertrofia, el crecimiento celular, la migración y la proliferación de algunos tipos de células como cardiomiocitos (Yue *et al.*, 2000; Sugden, 2003), células mesangiales del riñón (Araki *et al.*, 1997) y más recientemente, células del sistema vascular (Daou *et al.*, 2004).

La ET-1 activa al menos tres vías de señalización en las VSMC, que serían:

- a) Vía de la fosfolipasa C (PLC, *Phospholipase C*).- La unión de ET-1 a sus receptores ET_A da lugar a la activación de la PLC- β que hidroliza los fosfolípidos de la membrana plasmática dando lugar a diacilglicerol (DAG, *Diacylglycerol*) e inositol 1',4',5'-trifosfato (IP₃, *Inositol-1',4',5'-trisphosphate*) (Rhee, 2001; Fukami, 2002). El IP₃ estimula la salida de calcio de los almacenes intracelulares, aumentando la concentración de calcio intracelular y favoreciendo la contracción celular. El DAG junto con el aumento del Ca²⁺ intracelular, activa a la PKC, una serina-treonina kinasa.

Se ha observado que la ET-1 activa a la PKC en cardiomiocitos (Chiloeches *et al.*, 1999) y en otros tipos celulares (Robin *et al.*, 2002; Husain *et al.*, 1998), pero la activación directa de PKC por ET-1 en VSMC no ha sido estudiada en detalle todavía. No obstante, se ha observado que la PKC está implicada en la vía de señalización de ET-1 en VSMC (McNair *et al.*, 2004; Rosen *et al.*, 1999), tanto en la proliferación celular como en la contracción de las VSMC inducida por ET-1 (Zheng *et al.*, 1998; Gorlach *et al.*, 1998). Igualmente, la PKC está implicada en la activación de las kinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2, *Extracellular signal regulated kinases 1 and 2*, también conocida como p42/p44 MAPKs) inducida por ET-1 en células miométriales y del músculo liso vascular de rata, a través de proteínas kinasas dependientes de Ca²⁺/calmodulina y proteínas tirosina kinasas receptor independientes, tales como Src, PyK₂ (*Proline-rich tyrosine kinase 2*) y p130Cas (Robin *et al.*, 2002; Li *et*

al., 1996). Por tanto, ET-1 induce la activación de PKC dando lugar a una vía de señalización que parece ser importante en los efectos vasculares de ET-1.

- b) Vía de las proteínas kinasas activadas por mitógeno (MAPKs, *Mitogen-activated protein kinase*).- La ET-1, cuando se une a sus receptores, también induce la activación de la vía de las MAPKs. El primer componente de esta vía es Ras, una pequeña proteína G. Una vez que Ras es activada, se une a Raf, también conocida como MAPKKK (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) (Moodie *et al.*, 1993). Raf fosforila en residuos de serina/treonina a MEK o MAPKK (*Mitogen-activated protein kinase kinase*), la cual a su vez fosforila a MAPKs (Haystead *et al.*, 1992). La activación de las MAPKs en respuesta a ET-1, da lugar a una serie de fosforilaciones tanto de proteínas reguladoras citosólicas como de factores de transcripción nucleares, que conduce a la activación de genes implicados en el crecimiento y diferenciación celular (Kyriakis *et al.*, 1996; Widmann *et al.*, 1999).

Las MAPKs son serina/treonina proteínas kinasa activadas en respuesta a diferentes estímulos externos como factores de crecimiento, hormonas y estrés oxidativo (Seger *et al.*, 1995; Blanc *et al.*, 2003). De las principales MAPKs, ERK1/2, p38^{mapk} y proteína kinasa activada por estrés/c-Jun N-terminal kinasa (SAPK/JNK, *Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinases*) son las más estudiadas (Kyriakis *et al.*, 1996; Widmann *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 2001). ERK1/2 es fosforilada por MEK1/2 y está implicada en el crecimiento celular, mientras que p38^{mapk} y SAPK/JNK son fosforiladas por MEK3/6 y MEK4/7, respectivamente, y ambas están implicadas en la inflamación y en la supervivencia y diferenciación celular (Seger *et al.*, 1995; Kyriakis *et al.*, 2001). La activación de la vía de las MAPKs inducida por ET-1 en VSMC parece estar mediada a través de una serie de vías de señalización intermedias que incluyen serina/treonina/tirosina kinasas dependientes e independientes de Ca²⁺. Se ha descrito que ET-1 activa la vía de señalización de ERK1/2 en diferentes tipos

de células tales como cardiomiocitos (Yue *et al.*, 2000), fibroblastos (Cheng *et al.*, 2003), células mesangiales glomerulares (Sorokin *et al.*, 2002) y VSMC (Daou *et al.*, 2004). Algunos estudios han sugerido que la activación de MAPKs en respuesta a ET-1 es la responsable de la proliferación celular en VSMC (Daou *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2003). También se ha demostrado que ERK5, un nuevo miembro de la familia de las MAPKs que está implicado en la diferenciación y el ciclo celular, es activado por ET-1 y angiotensina II (Ang II) en VSMC (Touyz *et al.*, 2004). Igualmente, ha sido descrita la implicación de la vía de las MAPKs en la contracción de las VSMC en respuesta a ET-1 y Ang II (Ansari *et al.*, 2004; Ishihata *et al.*, 2002). Los eventos esenciales que median la activación de Ras/Raf/MEK/MAPKs inducida por ET-1 no son bien conocidos, sin embargo, algunas evidencias sugieren la implicación de la PKC en esta activación en algunos tipos de células como cardiomiocitos (Chiloeches *et al.*, 1999) y células miométriales de rata (Robin *et al.*, 2002). Pyk2, una tirosina kinasa citoplasmática rica en prolina y regulada por calcio, es activada por ET-1 en VSMC actuando como regulador previo de la activación de las MAPKs inducida por ET-1 en VSMC (Daou *et al.*, 2004). La activación de Pyk2 por ET-1 induce a la unión de Pyk2 a SH2 (*Src-homology 2*) lo que da lugar a la activación de c-Src en algunos tipos de células como células mesangiales (Sorokin *et al.*, 2001; Dikic *et al.*, 1996) y cardiomiocitos (Kodama *et al.*, 2002). Algunos estudios han sugerido que la proteína kinasa calcio/calmodulina dependiente II (CaMK-II, *Calcium calmodulin dependent proteína kinase II*) actúa como regulador previo de la vía de señalización de MAPKs en VSMC mediante la activación de Pyk2 (Ginnan *et al.*, 2002).

- c) Vía de la fosfatidilinositol-3 kinasa (PI3-K, *Phosphatidylinositol-3 kinase*).- PI3-K, son una familia de proteína y lípido kinasas, que han sido sugeridas como importantes efectores de las acciones de ET-1. La PI3-K cataliza la fosforilación en posición 3' a partir de ATP de distintos fosfolípidos de la

membrana plasmática dando lugar a fosfatidilinositol-3-P, fosfatidilinositol-3,4-P₂ y fosfatidilinositol-3,4,5-P₃. Estos fosfatidilinositoles actúan como segundos mensajeros activando a algunas proteínas kinasas, como proteína kinasa dependiente de fosfatidilinositol-3,4,5-P₃ (PDK, *Phosphatidylinositol-3,4,5-P₃ dependent protein kinase*), proteína kinasa B (PKB, *Protein kinase B*)/Akt y proteína S6 kinasa ribosomal (p70^{s6k}, *70 KDa ribosomal proteína S6 kinase*) (Rameh *et al.*, 1999). La activación de PI3-K por ET-1 en VSMC no ha sido documentada, sin embargo la implicación de PI3-K como mediador en algunas respuestas inducidas por ET-1 si ha sido descrita. Así por ejemplo, recientemente se ha demostrado su implicación en el flujo de Ca²⁺ en arterias carótida y en la contracción de la arteria basilar inducida por ET-1, mediante el uso de inhibidores específicos de la PI3-K, como son wortmannin y LY294002 (Kawanabe *et al.*, 2003; Kawanabe *et al.*, 2004).

1.5. Efectos de ET-1

La ET-1 es la isoforma predominante expresada en la vasculatura y el más potente vasoconstrictor conocido actualmente (Inoue *et al.*, 1989). ET-1 también tiene propiedades inotrópicas, quimiotácticas y mitogénicas. Además induce un aumento del estrés oxidativo, influye en la homeostasis del agua y la sal a través de sus efectos en el sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA), la vasopresina y el péptido natriurético auricular, y estimula el sistema nervioso simpático (Agapitov *et al.*, 2002).

Los efectos biológicos inducidos por la ET-1 incluyen:

a) Efectos vasculares.-

La ET-1 juega un papel esencial en la homeostasis vascular. Los efectos vasculares de ET-1 son:

- Efectos en la regulación del tono vasomotor.- La ET-1 ejerce un efecto dual en las arterias, así a bajas concentraciones (0.4 - 4 pM) induce vasodilatación que está mediada por la unión a sus receptores ET_B

endoteliales (ET_{B1}), mientras que a altas concentraciones (4 - 40 pM), induce vasoconstricción que está mediada por la unión a sus receptores ET_A de las VSMC. Este efecto dual de ET-1 depende del balance de los efectos mediados por receptores ET_A/ET_B , la producción de ET-1, la integridad del endotelio, la densidad del subtipo de receptores en los tejidos y de su afinidad a los receptores (Brunner *et al.*, 2006). La alteración de alguno de estos factores puede contribuir al desarrollo de patologías como hipertensión o aterosclerosis. Así, por ejemplo, en la disfunción endotelial donde existe una menor actividad del NO, la respuesta vasodilatadora a través de los receptores ET_B está atenuada, mientras que la respuesta vasoconstrictora a través de los receptores ET_A está aumentada (Agapitov *et al.*, 2002).

Por otro lado, ET-1, además de mediar de forma directa repuestas vasoconstrictoras incrementando la presión arterial, también induce una vasoconstricción indirecta debido a la generación de tromboxano A_2 (TXA_2) derivado del endotelio (Taddei *et al.*, 1993). Además la ET-1 potencia la acción de otros agentes vasoconstrictores como Ang II, fenilefrina y serotonina (Schiffirin y Touyz, 1998; Schiffirin, 2005).

- Efectos mitogénicos.- ET-1 posee un potente efecto mitogénico sobre las VSMC (Komuro *et al.*, 1988). Este efecto mitogénico es el responsable de la participación de la ET-1 en los procesos de hipertrofia vascular y remodelado vascular. Los efectos mitogénicos de ET-1 pueden ser mediados en parte por el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) inducido por ET-1 (Wedgwood *et al.*, 2001).
- Efectos pro-inflamatorios.- La ET-1 está implicada en procesos inflamatorios a nivel de la pared vascular, estimulando la activación de macrófagos, la adhesión de neutrófilos a células endoteliales de arterias coronarias (Cunningham *et al.*, 1997; Zouki *et al.*, 1999) y la liberación de

mediadores proinflamatorios y quimiotácticos como el factor de necrosis tumoral (TNF, *tumoral necrosis factor*)- α e interleuquinas (IL-1, IL-6 e IL-8), todos ellos importantes en el progreso de la aterosclerosis. (Ruetten *et al.*, 1997; Hofman *et al.*, 1988; Browatzki *et al.*, 2000). Por otro lado, la citoquinas proinflamatorias como el factor de transcripción nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$, *nuclear factor $\kappa\beta$*), TNF- α e IL-6 estimulan la producción de ET-1 (Viridis *et al.*, 2003).

En la pared vascular, ET-1 produce una respuesta inflamatoria por aumento del estrés oxidativo, lo cual conduce a remodelado vascular y disfunción endotelial. Este último efecto está presente en modelos de hipertensión que presentan un componente mediado por ET-1, como son ratas sometidas a nefrectomía unilateral y administración de acetato de deoxicorticosterona (DOCA, *deoxycorticosterone acetate*) más dieta rica en sal (DOCA-sal), ratas Dahl sal sensibles, infusión de Ang II y ratas diabéticas (Schiffrin, 2005).

b) Efectos cardiacos.-

In vitro, ET-1 posee efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos a través de la activación de los receptores ET_A, los más abundantes en el corazón (Ishikawa *et al.*, 1988). En animales, dependiendo de la especie animal y de las condiciones de experimentación que consideremos, la ET-1 va a inducir un aumento o una disminución de la contractilidad cardiaca. Así, a bajas dosis ET-1 posee un efecto inotrópico positivo, mientras que altas dosis posee un efecto inotrópico negativo. El efecto inotrópico positivo parece estar asociado con la activación de PLC, PKC, intercambiador Na⁺/H⁺ e incremento de los niveles plasmáticos de Ca²⁺, mientras que el efecto inotrópico negativo de la ET-1 parece estar asociado a la activación de proteína kinasa G (PKG) (Tostes *et al.*, 2008). En humanos, la administración sistémica de ET-1 disminuye el gasto cardiaco debido a un aumento de la poscarga y una

disminución de la frecuencia cardíaca mediada por baroreceptores. (Wagner *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1996; Sharif *et al.*, 1998).

ET-1 también induce proliferación e hipertrofia cardíaca debido a sus propiedades mitogénicas (Griendling *et al.*, 1989). El rango de concentración de ET-1 para producir efectos hipertróficos *in vitro* es de 1-10nM. Los mecanismos por los que la ET-1 induce hipertrofia cardíaca no son bien conocidos. Algunas evidencias indican que la ET-1 induce hipertrofia cardíaca mediante la activación de PLC, PKC y ERK1/2. PKC induce la activación de ERK1/2 produciendo la fosforilación y activación de factores de transcripción como c-Fos y c-Jun, que dan lugar a la expresión de genes hipertróficos (Sugden, 2003).

Un incremento en los niveles plasmáticos de ET-1 y de su precursor, la big-ET-1, han sido descritos en la enfermedad cardíaca, dando una relevancia fisiopatológica a estos factores, lo que hace que se utilicen como marcadores de la mortalidad en la enfermedad cardíaca (Pacher *et al.*, 1996).

c) Efectos renales.-

ET-1 es el vasoconstrictor más potente en el riñón, más que Ang II y noradrenalina (NA). El riñón no sólo posee capacidad para sintetizar ET-1, sino que posee una gran cantidad de receptores ET, siendo la médula renal el lugar del organismo donde existe mayor número de receptores ET. Los receptores predominantes en el tejido renal son los receptores de ET_B que son los responsables del efecto natriurético de ET-1 (inhibición de la reabsorción de Na⁺ y agua) (Kohan, 2006; Vassileva *et al.*, 2003). ET-1 presenta una gran variedad de efectos biológicos en el riñón, tales como contracción de la vasculatura renal y de las células mesangiales, disminución del flujo plasmático renal y la filtración glomerular, aumento de la producción de matriz extracelular e inhibición de la reabsorción de Na⁺ y agua a nivel del conducto colector (Edwards *et al.*, 1990; Firth *et al.*, 1988; King *et al.*, 1989). Todos estos efectos son mediados por la acción autocrina/paracrina de la ET-1 a nivel renal.

Como consecuencia de sus efectos hemodinámicos en el riñón, ET-1 contribuye al desarrollo de proteinuria en la insuficiencia renal crónica (Dhaun *et al.*, 2006).

d) Efectos pulmonares.-

Los pulmones son el principal órgano de producción de ET-1 circulante del organismo debido a que en los pulmones existe una mayor expresión de ET-1 que en el resto de órganos (Matsumoto *et al.*, 1989; Giaid *et al.*, 1993a). Además, los pulmones son el principal órgano donde se produce el aclaramiento de ET-1 circulante a través de los receptores ET_B (Dupuis *et al.*, 1996). Esto hace que los pulmones sean uno de los principales órganos diana de ET-1.

Administrada por vía intravenosa, ET-1 produce una respuesta bifásica en la circulación pulmonar. Inicialmente produce una vasodilatación debido a la liberación de NO y la activación de canales de potasio, seguida de una vasoconstricción sostenida. La vasodilatación inicial es mediada por su unión a receptores de ET_B, mientras que la vasoconstricción sostenida es mediada por su unión a receptores ET_A y ET_B (Eddahibi *et al.*, 1993).

En condiciones fisiológicas, ET-1 regula el tono bronquial y la proliferación de células pulmonares. En cambio, cuando los niveles de ET-1 son elevados se induce hipertensión arterial pulmonar, que se caracteriza por un aumento progresivo de las resistencias vasculares pulmonares que conduce a un fallo del ventrículo derecho y muerte (Rubin, 1997; Galie *et al.*, 1998). La hipertensión arterial pulmonar es la única patología donde se ha aprobado el uso de antagonistas de receptores de ET-1, siendo el bosentan (antagonista no selectivo) el primer antagonista administrado por vía oral aprobado para su uso en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (Channick *et al.*, 2001; Rubin *et al.*, 2002).

e) Efectos endocrinos.-

ET-1 estimula la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en células endoteliales (Kawaguchi *et al.*, 1991), la actividad del sistema renina-angiotensina

(SRA) en lecho mesentérico de rata (Rakugi *et al.*, 1990) y la liberación de aldosterona (Cozza *et al.*, 1989). Por otro lado, Ang II aumenta los niveles de ET-1 y la actividad de ECE *in vivo*. Esto sugiere que puede existir un feed-back positivo entre la Ang II y la ET-1 en determinadas situaciones patológicas, como en el fallo cardíaco. (Agapitov *et al.*, 2002).

En condiciones fisiológicas la insulina favorece la producción de NO y ET-1. En cambio, en pacientes con resistencia a la insulina, la producción de NO se ve disminuida mientras que la producción de ET-1 inducida por insulina se ve aumentada (Wolpert *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 2002). Además, estudios en animales (Juan *et al.*, 2004) y en humanos (Cardillo *et al.*, 2002) han demostrado la participación de ET-1 en el desarrollo de hipertensión en estados de resistencia a la insulina.

La producción de ET-1 también puede estar aumentada por leptina. Este sería el mecanismo que explicaría el aumento de los niveles de ET-1 en obesidad, así como, la relación hipertensión-obesidad y la evolución del síndrome metabólico hacia diabetes tipo 2 (Quehenberger *et al.*, 2002).

En la aterogénesis existe también una importante interacción entre las LDL y la ET-1, así la ET-1 favorece la oxidación de las lipoproteínas (Morawietz *et al.*, 2002) y su consumo en las células endoteliales vía receptor ET_B (Morawietz *et al.*, 2001), mientras que las LDL oxidadas favorecen la producción de ET-1 (Niemann *et al.*, 2005). ET-1 también está elevada en la diabetes tipo 2 y elevados niveles de LDL colesterol (Barton *et al.*, 2003; Morise *et al.*, 1995).

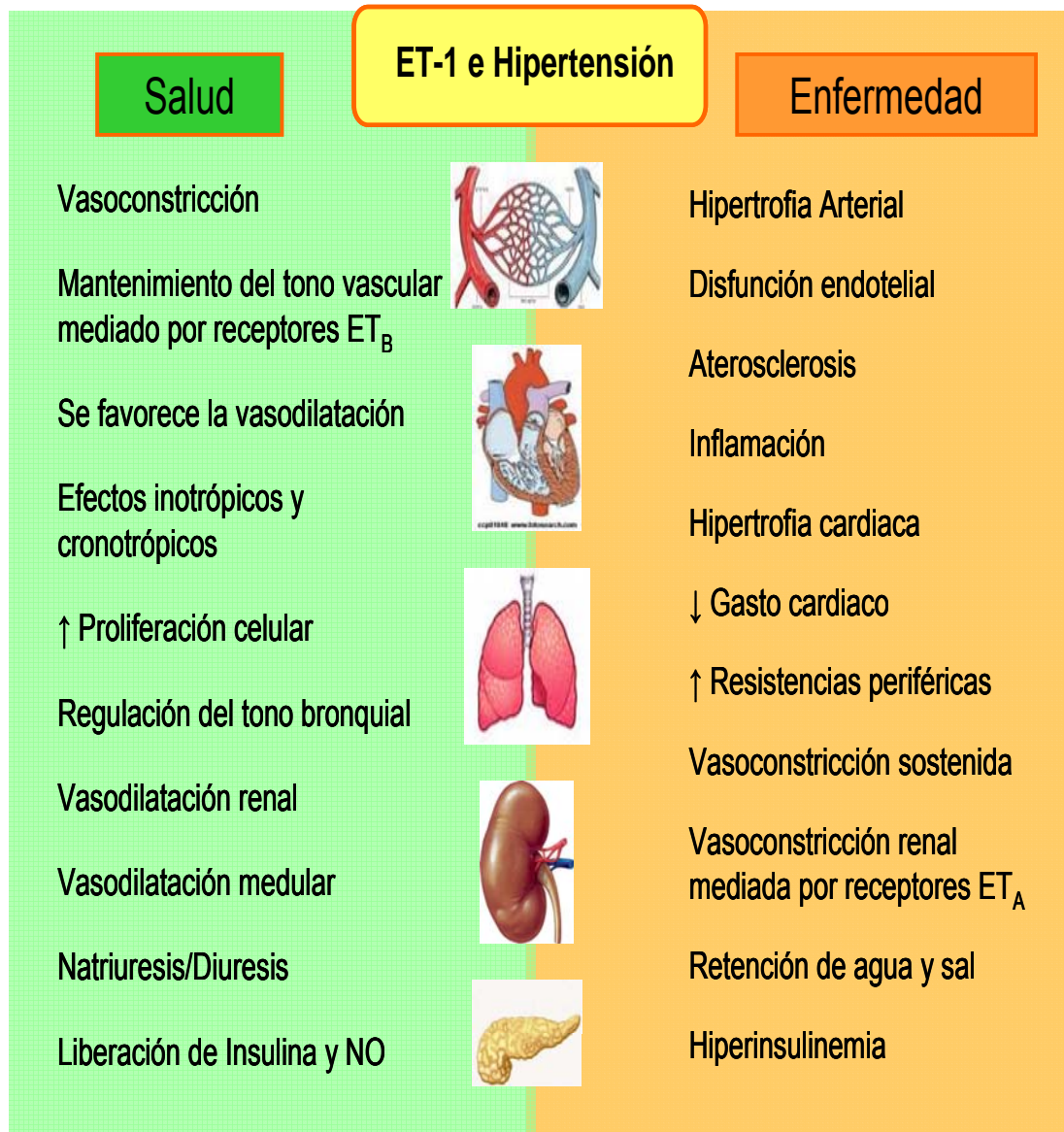


Figura 3. Efectos de ET-1. La ET-1 ejerce acciones a través de los receptores de ET_{A/B} en distintos sistemas del organismo tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

2. Disfunción endotelial, estrés oxidativo y ET-1.

2.1. Disfunción endotelial: Definición y concepto.

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

La disfunción endotelial puede definirse como el desequilibrio entre la síntesis, liberación o efecto de los factores endoteliales vasodilatadores y el de las sustancias vasoconstrictoras que pueden sintetizarse en las células de este tejido. Este desequilibrio se manifiesta con una reducción de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, o con una mayor respuesta vasoconstrictora. Hay, no obstante, que tener en cuenta que cuando existe un deterioro endotelial pueden además afectarse otras funciones de este tejido, y puede facilitarse la interacción de las plaquetas y los leucocitos con la pared vascular, así como el crecimiento y la migración de las VSMC (Endemann y Schiffrin, 2004). Por tanto, en una definición más amplia de disfunción endotelial, se incluiría no sólo una capacidad vasodilatadora disminuida sino también un estado proinflamatorio y protrombótico asociado a la misma.

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

2.2. Disfunción endotelial y estrés oxidativo.

Las células endoteliales vasculares sanas metabolizan el oxígeno y generan ROS potencialmente nocivas. En condiciones normales, la tasa de formación de agentes oxidantes está equilibrada con la tasa de su eliminación (Touyz, 2004; Ogita y Liao, 2004). Sin embargo, en la disfunción endotelial existe un desequilibrio entre agentes prooxidantes y agentes antioxidantes, lo que da origen al estrés oxidativo. Por tanto, el estrés oxidativo será el resultado patogénico de la sobreproducción de agentes oxidantes, con lo que se supera la capacidad antioxidante celular. Muchas condiciones patológicas incrementan las ROS en la pared de los vasos, incluyendo la hipercolesterolemia, la diabetes y la hipertensión, patologías asociadas a la disfunción endotelial (Figura 4).

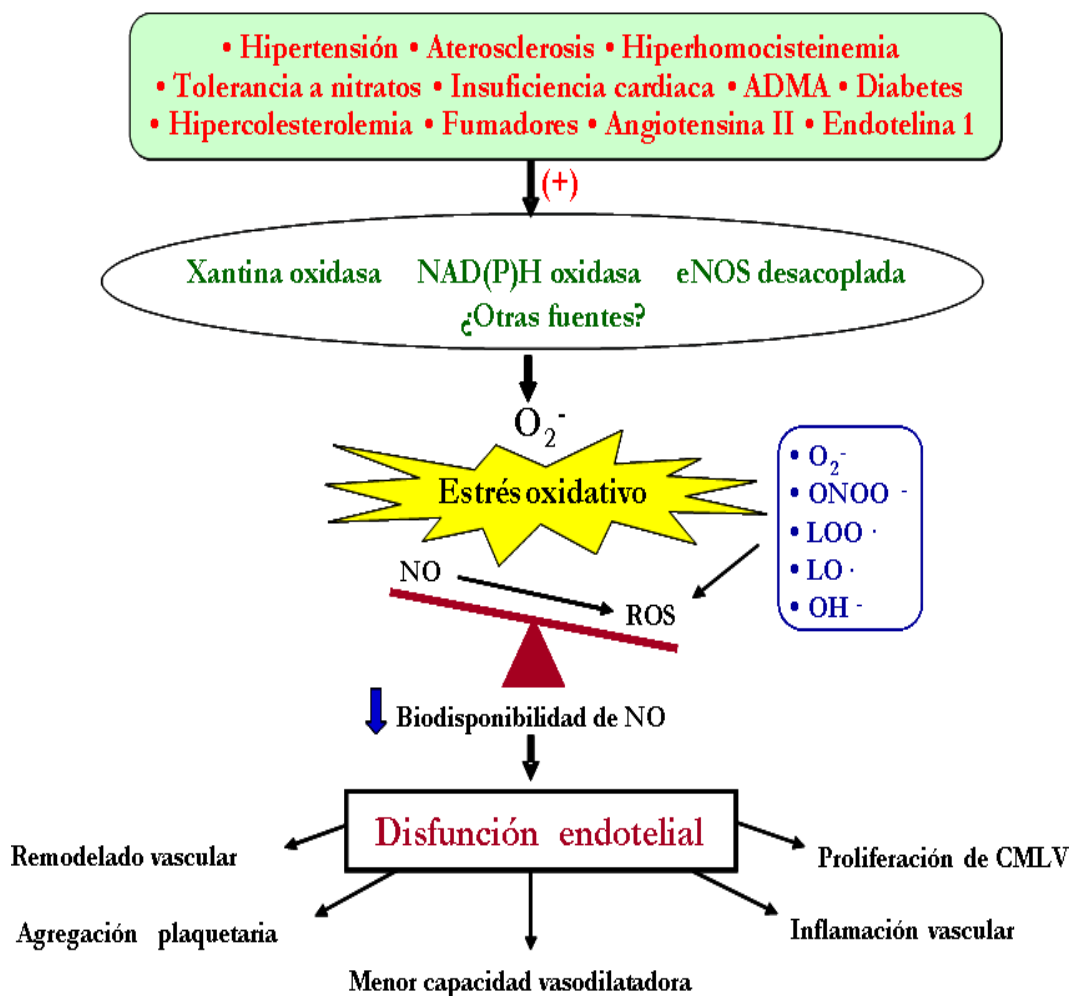


Figura 4. Mecanismos causantes de la disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares. Distintos agentes, como enfermedades cardiovasculares (hipertensión, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis), factores de riesgo (hipercolesterolemia, tabaco, tolerancia a nitratos, diabetes, dimetil arginina asimétrica (ADMA), hiperhomocisteinemia) y agentes vasoconstrictores (angiotensina II, endotelina 1), pueden activar diferentes sistemas enzimáticos, como la NAD(P)H oxidasa vascular, la xantina oxidasa, o la eNOS desacoplada, que producen un potente agente oxidante y precursor de otros oxidantes, el anión superóxido (O_2^-), generando así un estrés oxidativo (altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre ellas O_2^- , peroxinitrito (ONOO \cdot), radicales lipídicos (LOO \cdot y LO \cdot) o radical hidroxilo (OH \cdot) principalmente), que disminuye la biodisponibilidad del agente vasodilatador óxido nítrico (NO) al aumentar su degradación por las ROS. Esto produce la denominada disfunción endotelial, donde se observa un estado vascular proinflamatorio, proagregante plaquetario y con alteración en el tono vascular, debido a que se produce un remodelado vascular, un aumento de la agregación plaquetaria, inflamación vascular, la proliferación de VSMC y una menor capacidad vasodilatadora. La disfunción endotelial también mantiene, agrava y probablemente influye en el desarrollo de esas patologías cardiovasculares. ↓:Disminución. (+):Activación.

Las ROS incluyen radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicales hidroxilo ($\cdot OH$) y radicales lipídicos (LO^{\cdot} y LOO^{\cdot}). Todos ellos poseen electrones desapareados, por lo que se clasifican como radicales libres. Sin embargo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) y el ácido hipocloroso (HCl) no son radicales libres, pero tienen propiedades oxidantes y contribuyen también al estrés oxidativo especialmente en presencia de cationes metálicos (Figura 5).

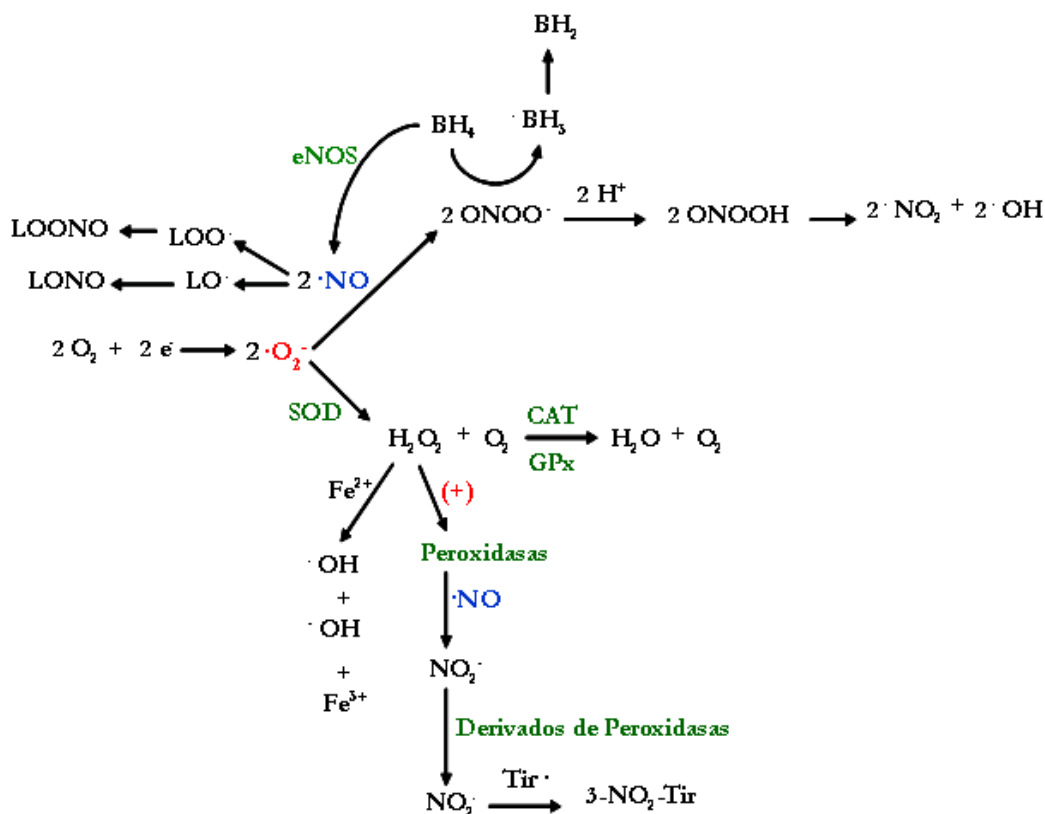


Figura 5. Esquema de la producción de ROS y sus interacciones con el NO. El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se genera mediante la reducción del O_2 por un electrón. La superóxido dismutasa (SOD) lo descompone rápidamente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Éste puede ser reducido a su vez y generar radicales hidroxilo ($\cdot OH$). El H_2O_2 puede activar a las peroxidasas para generar especies altamente reactivas que pueden oxidar el NO y formar nitritos (NO_2^{\cdot}), que a su vez pueden reaccionar con productos de las peroxidasas y generar radicales nitritos (NO_2^{\cdot}) que al unirse a restos de tirosina (Tir^{\cdot}), producen nitrotirosina ($3-NO_2-Tir$). La catalasa (Cat) o la glutatión peroxidasa (GPx) descomponen el H_2O_2 en H_2O y O_2 . El $O_2^{\cdot-}$ también puede reaccionar, sobre todo en condiciones de alto estrés oxidativo, con el NO y formar peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), un potente agente oxidante y nitrosante. El $ONOO^{\cdot}$ puede reducirse a ácido peroxinitrico, que generará NO_2^{\cdot} y $\cdot OH$. El NO puede también reaccionar con radicales lipídicos (LO^{\cdot} , LOO^{\cdot}) para formar compuestos derivados nitrosados. Mediante estos procesos, disminuye la biodisponibilidad de NO al reducirse su cantidad para ejercer sus efectos beneficiosos sobre la vasculatura, y además se crean numerosos agentes oxidantes que aumentan el estrés oxidativo. Activación: (+).

Las ROS se han asociado a diversos modelos de hipertensión experimental. Estos modelos están frecuentemente inducidos por la estimulación del sistema renina-angiotensina: perfusión crónica de Ang II, sobreexpresión de genes de renina y angiotensinógeno, coartación de la arteria renal y ratas espontáneamente hipertensas (SHR, *spontaneously hypertensive rats*). En estos modelos, las ROS y los marcadores de la oxidación (nitración de residuos de tirosina en proteínas, 8-isoprostaglandina F_{2α}, malonildialdehído (MDA, *malonyldialdehyde*) y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, *thiobarbituric acid reactive substance*)), están aumentados en vasos, corazón y riñones (Guo *et al.*, 2003; Chabrashvili *et al.*, 2003; Lassegue y Clempus, 2003).

No obstante, también existen modelos de hipertensión con bajos niveles de renina y angiotensina que se obtienen, por ejemplo, mediante la perfusión de ET-1 o por nefrectomía unilateral y administración de DOCA más dieta rica en sal (DOCA-sal), en los que igualmente se ve elevada la producción de O₂⁻ vascular y los marcadores de estrés oxidativo (Li *et al.*, 2003a, b; Sedeek *et al.*, 2003, Zheng *et al.*, 2003). Por tanto, vemos que en muchos modelos experimentales, la hipertensión está asociada a una elevada producción de ROS (Figura 6).

Sin embargo, las ROS no sólo participan en la disfunción endotelial hipertensiva, sino que colaboran en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión. Así, el O₂⁻ puede inducir vasoconstricción (Grover *et al.*, 2003; González-Pacheco *et al.*, 2002), hipertrofia vascular (Wedgwood y Black, 2003; Lassegue y Clempus, 2003) y miocárdica (Delbosc *et al.*, 2002; de Andrade *et al.*, 2002), disminución de la función renal (Sedeek, *et al.*, 2003; Welch y Wilcox, 2001) e incremento de la actividad simpática del SNC (Zanzinger, 2002). Por el contrario, el H₂O₂ ejerce efectos protectores al incrementar la actividad óxido nítrico sintasa (NOS, *nitric oxide synthase*) o al actuar como factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF, *endotelium derivated hyperpolarizante factor*).

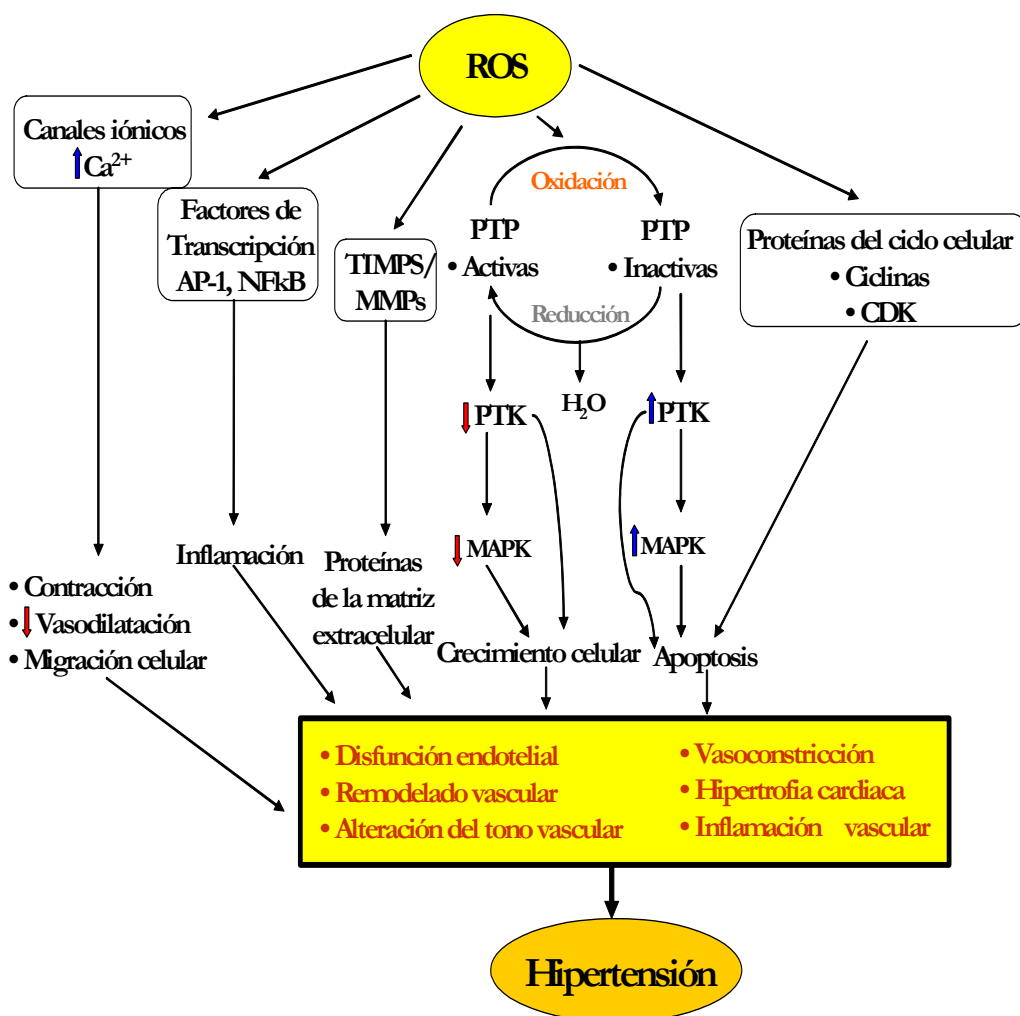


Figura 6. Mecanismos de señalización redox dependientes en las VSMC y sus efectos fisiológicos mediados por especies reactivas de oxígeno (ROS), tendientes a producir y mantener la hipertensión. Los ROS intracelulares modifican la actividad de proteín tirosín kinasas (PTK), como Src, Ras, JAK2, PI3K y EGFR, así como proteín kinasas activadas por mitógeno (MAPK), particularmente ERK1/2, p38mapk y SAPK/JNK, probablemente debido a la oxidación/reducción de proteín tirosín fosfatasa (PTP) debido a estas ROS. También influyen en la expresión genética y proteica activando factores de transcripción como el NFκB y el activador de proteína-1 (AP-1). Los ROS estimulan además canales iónicos, como los de Ca^{2+} y K^+ , causando cambios en la concentración catiónica intracelular. Todos estos procesos se traducen en numerosas respuestas celulares que parecen contribuir y prolongar el daño vascular hipertensivo. MMPs: Metaloproteasas de matriz; TIMP: Inhibidor tisular de metaloproteasas de matriz; ↑:Aumento. ↓:Disminución. CDK: Kinasa dependiente de ciclina.

La gran cantidad de ROS puede deberse a un aumento de su producción o una menor eliminación de éstas. Aunque hay múltiples fuentes celulares de generación de ROS, como la cadena respiratoria en las mitocondrias, enzimas que intervienen en la reducción del oxígeno, como la ciclooxigenasa (COX), lipooxigenasa (LOX), el citocromo p450 y otras hemoproteínas (Cai y Harrison, 2000), las fuentes más importantes de generación de ROS en el endotelio son la nicotinamín adenín dinucleótido fosfato (NAD(P)H) oxidasa, xantina oxidasa (XO) y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*) desacoplada.

2.2.a. Papel de la NAD(P)H oxidasa en el estrés oxidativo vascular.

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

Estructura, función y localización.

En un principio se determinó la estructura y la función de la NAD(P)H oxidasa en neutrófilos (Patriarca *et al.*, 1971). Esta enzima es un complejo multi-enzimático formado por un dominio con actividad reductasa compuesto por una flavoproteína y un citocromo b558 formado por las subunidades gp22^{phox} y gp91^{phox}. Otras importantes subunidades citoplasmáticas incluyen p47^{phox}, p40^{phox}, p67^{phox} y la proteína Rac. Cuando las células fagocíticas son activadas, las subunidades citosólicas se translocan hacia el citocromo b558 de membrana, dando lugar a la forma activa de la enzima (Lapouge *et al.*, 2000; Koga *et al.*, 1999; Babior, 1995). La activación del sistema NAD(P)H oxidasa requiere la fosforilación de la subunidad p47^{phox}, que permite su translocación y unión al resto de subunidades iniciándose la cascada de activación. Cuando el complejo está

activo, transfiere electrones del NAD(P)H citosólico al oxígeno del espacio extracelular generando O_2^- , fundamentalmente extracelular (Cross y Segal, 2004; Nisimoto *et al.*, 1999).

La NAD(P)H oxidasa vascular tiene algunas características moleculares similares a la que se halla en neutrófilos. Ambas se inhiben por difenileneiodonio (DPI, *diphenylene iodinium*), un producto empleado para inhibir la producción de O_2^- vía NAD(P)H oxidasas. Se diferencian, sin embargo, en sus características funcionales. Así, la oxidasa vascular produce O_2^- en menor cantidad, debido a que presenta una menor actividad que la oxidasa de neutrófilos. Además, posee una actividad constitutiva, debido a la existencia de complejos activos que permiten la formación de O_2^- en condiciones basales, así como posee una localización subcelular, lo que permite la producción de O_2^- tanto intracelular como extracelularmente. El O_2^- generado por la oxidasa vascular actúa como segundo mensajero de la señalización celular y no como bactericida. Por último, la oxidasa de fagocitos sólo utiliza como sustrato el nicotinamín adenín dinucleótido fosfato (NADPH), mientras que la oxidasa vascular puede utilizar como sustratos el NADPH o el nicotinamín adenín dinucleótido (NADH) (Cai *et al.*, 2003; Lassègue y Clempus, 2003; Ray y Shah, 2005).

Muchos componentes de las NADPH oxidasas de neutrófilos están presentes en las NAD(P)H oxidasas de las células endoteliales y el músculo liso vascular (Touyz *et al.*, 2002; Wassmann *et al.*, 2002; Griendling *et al.*, 2000). En los últimos años se ha descubierto una familia de proteínas homólogas a la subunidad gp91^{phox} de las NADPH oxidasas de neutrófilos presente en los tejidos vasculares, denominadas Nox (*NADPH oxidases homologues*) (Bedard y Krause, 2007). Las principales subunidades catalíticas en el territorio vascular son Nox-1, Nox-2 (equivalente a la subunidad gp91^{phox} de neutrófilos) y Nox-4, y sus subunidades reguladoras son p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} y rac (Bengtson *et al.*, 2003; Lassègue y Clempus, 2003; Touyz *et al.*, 2002). Las subunidades Nox y p22^{phox} están localizadas en la membrana, mientras que el resto de componentes se encuentran en el citosol. Las células endoteliales contienen Nox-1 (el primer homólogo de Nox-2), Nox-2 y Nox-4, la isoforma mas abundante (Ago *et al.*,

2004; Higashi *et al.*, 2003; Lassègue y Clempus, 2003). Nox-4 también es la isoforma más abundante en VSMC (Griendling, 2004; Lassègue *et al.*, 2001), expresándose conjuntamente con Nox-1 en los vasos de conductancia (aorta y grandes arterias) (Lassègue *et al.*, 2001), o con Nox-2 en los vasos de resistencia (arteriolas) (Griendling, 2004; Touyz *et al.*, 2002). Los fibroblastos de la capa adventicia expresan Nox-2 y Nox-4 (Chamseddine y Miller, 2003; Rey *et al.*, 2002).

Los aniones superóxido generados por la NADPH oxidasa fueron estudiados inicialmente por sus funciones inmunológicas como mediadores de la inflamación, reclutadores de células e inductores de la apoptosis. Sin embargo, la confirmación de la expresión de algunas subunidades de la NADPH oxidasa en el sistema cardiovascular (Shu *et al.*, 1999) y la implicación del O_2^- generado por la NAD(P)H oxidasa vascular como segundo mensajero de la señalización celular en algunas patologías cardiovasculares, han aumentado la importancia de este sistema enzimático como potencial diana para la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Actividad mediada por ET-1.

La actividad de la NAD(P)H vascular es regulada por citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y factores físicos tradicionalmente implicados en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular (Bedard y Krause, 2007; Griendling *et al.*, 2000). De todos ellos, el mejor caracterizado es la Ang II, que es un importante activador de la NAD(P)H oxidasa vascular. La activación de la NAD(P)H oxidasa por Ang II y las vías de señalización implicadas, han sido descritas por diversos autores (Touyz *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2003; Laplante *et al.*, 2005). Además de la Ang II, otros péptidos, estrechamente relacionados con el sistema renina-angiotensina, como son aldosterona y ET-1, también actúan activando a la NAD(P)H oxidasa (Callera *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2003; Cruzado *et al.*, 2005; Laplante *et al.*, 2005). Recientes estudios han demostrado que la ET-1, a través de su unión a los receptores ET_A y ET_B , puede activar a la NAD(P)H oxidasa tanto *in vitro* como *in vivo* (Duerschmidt *et al.*, 2000; Fei *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2003b; Amiri *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2005) y que los radicales libres generados por esta

fuente juegan un papel importante en la hipertensión mineralocorticoide y en la vasoconstricción inducida por ET-1 (Li *et al.*, 2003; Wedgwood *et al.*, 2001).

No obstante, los mecanismos implicados en la producción de O_2^- inducida por ET-1 no están bien caracterizados. A diferencia de la Ang II, la ET-1 no induce un incremento agudo en la producción de ROS (Laplante *et al.*, 2005) y en sus efectos a largo plazo están implicadas la NAD(P)H oxidasa (Wedgwood *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003; Elmarakby *et al.*, 2005), el desacoplamiento de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Loomis *et al.*, 2005) y la cadena respiratoria mitocondrial (Callera *et al.*, 2006; Touyz *et al.*, 2004) como fuentes generadoras de ROS.

Efectos in vitro de la actividad de la enzima.

Se ha descrito que diversos estímulos tales como Ang II, ET-1, trombina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *platelet derived growth factor*) y el TNF- α incrementan la actividad de NAD(P)H oxidasa y la producción de ROS en las VSMC (Griendling *et al.*, 2000a). La actividad de la NAD(P)H oxidasa también está aumentada en el tejido vascular de distintos modelos experimentales de hipertensión como en ratas SHR y DOCA-sal (Sánchez *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2007). Asimismo, el H_2O_2 derivado de la NAD(P)H oxidasa está implicado en la hipertrofia de las VSMC causada por Ang II (Griendling *et al.*, 2000; Servant *et al.*, 1996). Tanto la Ang II como la ET-1 estimulan, a través de la activación de NAD(P)H oxidasa, las respuestas inflamatorias, produciendo un aumento en la expresión de MCP-1 (*monocyte chemoattractic protein 1*) (Tummala *et al.*, 1999), de VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) (Chen *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2003c) e interleukina-6 (IL-6) (Schieffer *et al.*, 2000; Böhm *et al.*, 2007; Browatzki *et al.*, 2000). Las ROS derivadas de NAD(P)H oxidasa parecen modular también la angiogénesis, a través de la activación de los receptores del VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Ushio-Fukai *et al.*, 2002). Igualmente, las ROS producidas por NAD(P)H oxidasa activan las metaloproteasas de la matriz (MMPs) y aumentan su expresión (Galis y Khatri, 2002). En células endoteliales, uno de los efectos debidos a la activación de NAD(P)H oxidasa es la producción de NO, de tal manera que la Ang II puede

estimular simultáneamente la producción de O_2^- y NO, favoreciendo así la formación de ONOO⁻ (Thorup *et al.*, 1999; Pueyo *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 1996).

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

Aparte de estos resultados en estudios *in vitro*, la NAD(P)H oxidasa parece estar implicada en la generación de las ROS observada en muchas enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, un exceso en la producción de O_2^- por NAD(P)H oxidasa está implicado en la disminución de NO asociada a la disfunción endotelial en modelos experimentales de hipertensión y en la hipertensión esencial (Endeman *et al.*, 2004; Viridis *et al.*, 2004).

En ratas a las que se indujo hipertensión arterial por administración de ET-1, se observó un aumento en la actividad de la NAD(P)H vascular (Elmarakby *et al.*, 2005). En estos animales, la administración de superóxido dismutasa (SOD) o del inhibidor específico de la NAD(P)H oxidasa, apocinina, revirtió el incremento en el estrés oxidativo inducido por ET-1 (Elmarakby *et al.*, 2005). En un modelo experimental con ratones transgénicos que sobreexpresan el gen para ET-1, se observa un remodelado vascular y disfunción endotelial como consecuencia del aumento de ROS vía NAD(P)H oxidasa inducido por ET-1 (Amiri *et al.*, 2004). En modelos experimentales en animales, la producción de O_2^- aumenta con el envejecimiento, y este efecto parece estar asociado a la NAD(P)H oxidasa (Hamilton *et al.*, 2001). También se ha demostrado un papel similar de la NAD(P)H oxidasa en humanos. Por ejemplo, en venas safenas humanas de pacientes diabéticos e hipercolesterolémicos, el aumento en la producción de O_2^- es debido a un aumento en la actividad de NAD(P)H oxidasa (Cai y Harrison, 2000). Por tanto, se observa a través de todos estos datos el papel clave que NAD(P)H oxidasa parece ejercer en la hipertensión.

2.2.b. Papel de la xantina oxidasa.

Otra fuente importante de ROS es la enzima xantina oxidasa (XO), presente en la superficie luminal de las células endoteliales de diversos órganos. Existen dos isoformas,

convertibles la una en la otra en función del estado redox y de la presencia de cofactores, con dos actividades enzimáticas: xantina deshidrogenasa y xantina oxidasa. La primera reduce nicotinamín adenosín dinucleótido oxidado (NAD^+), mientras que la segunda reduce el oxígeno molecular produciendo O_2^- y H_2O_2 (Berry y Hare, 2004). Al igual que la NAD(P)H oxidasa vascular, la XO puede utilizar como sustratos tanto el NADH como el NADPH para generar ROS. Algunos estudios indican que los inhibidores de XO, oxipurinol o alopurinol, mejoran la disfunción endotelial (Mervaala *et al.*, 2001; Butler *et al.*, 2000; Cardillo *et al.*, 1997). También, en SHR, el oxipurinol es capaz de reducir los valores de presión arterial, indicando un papel de la XO en el mantenimiento de las presiones arteriales elevadas (Nakazono *et al.*, 1991).

2.2.c. Papel del desacoplamiento de la eNOS.

Bajo ciertas circunstancias, como aumento del estrés oxidativo, hipertensión, diabetes o aterosclerosis, la eNOS no puede ejercer correctamente su función y se produce lo que se denomina “desacoplamiento de eNOS”, transfiriendo los electrones que debían ir al nitrógeno guanidínico de la L-arginina para formar NO, al oxígeno, y produciendo O_2^- y H_2O_2 , con lo que se disminuye así la producción de NO (Forstermann, 2006) y se aumenta la de ROS (Figura 7).

El desacoplamiento de la eNOS representa otro posible mecanismo implicado en la disfunción endotelial y puede deberse a una deficiencia en L-arginina o en 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH_4) (al oxidarse a BH_2), o bien, puede ser debido a la presencia de sus inhibidores endógenos. De esta forma, el desacoplamiento de la eNOS es también un mecanismo crítico en la disfunción endotelial experimental y clínica (Vásquez-Vivar *et al.*, 2003). Este desacoplamiento se ha observado *in vivo* en distintas situaciones patológicas. Así, en aorta de ratas espontáneamente hipertensas con tendencia a infarto cerebral (SP-SHR, *stroke-prone spontaneously hypertensive rats*), la producción de O_2^- es mayor respecto a ratas normotensas y aumenta con la edad. Este efecto se revierte al inhibir la eNOS con N^{ω} -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) o después de eliminar el endotelio (Hamilton *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado que la tolerancia a los nitratos está asociada con un

aumento de la producción vascular de O_2^- por desacoplamiento de la eNOS (Munzel *et al.*, 2000). Diversos estudios han demostrado que la generación inicial de ROS vía NAD(P)H oxidasa conduce a la oxidación del cofactor de BH_4 y el consiguiente desacoplamiento de la eNOS, lo que da lugar a una amplificación de la generación de ROS y a un aumento de la presión arterial (Landmesser *et al.*, 2003; Loomis *et al.*, 2005).

Monómeros de eNOS, enzima desacoplada

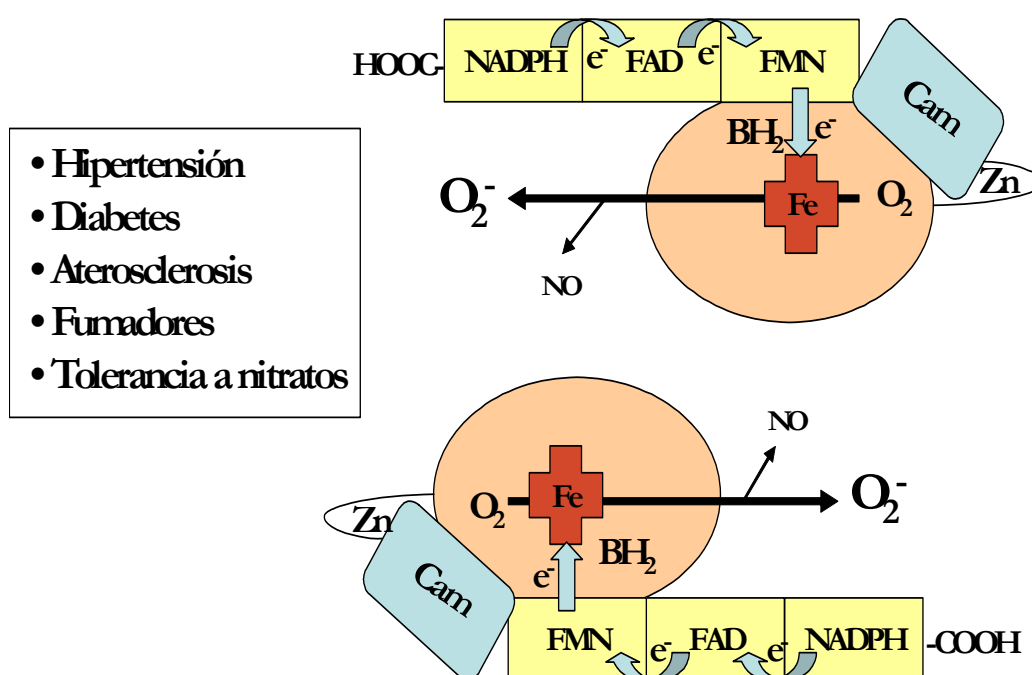


Figura 7. Desacoplamiento de la eNOS. La enzima en forma de monómero o en condiciones de baja biodisponibilidad de L-arginina o de tetrahydrobiopterina (BH_4) (por aumento de su oxidación a dihydrobiopterina (BH_2)) que pueden ser debidas a diversos factores como hipertensión, diabetes, aterosclerosis, adicción al tabaco o tolerancia a los nitratos, se encuentra en un estado que se denomina "desacoplada", en el que en lugar de producir NO , produce mayoritariamente O_2^- .

2.2.d. Papel de las enzimas antioxidantes.

Nuestro organismo posee mecanismos de defensa antioxidantes, cuya alteración también contribuye al estrés oxidativo (Redon *et al.*, 2003). La SOD convierte el O_2^- en H_2O_2 , que es más tarde degradado a agua por la catalasa (Cat) o la glutatión peroxidasa (GP_x). La perfusión de Ang II disminuye la expresión de SOD extracelular en riñón (Chabrashvili *et al.*, 2003). Se ha podido comprobar cómo la actividad de CuZn-SOD y Mn-SOD es más baja en vasos y riñón de animales sometidos a nefrectomía parcial (Vaziri *et al.*, 2003), en ratas Dahl sensibles a sal, estenosis arterial renal y DOCA-sal (Awe *et al.*, 2003). Además, la actividad Mn-SOD disminuye en el riñón por la perfusión de Ang II debido a la nitración de tirosina (Guo *et al.*, 2003). De forma semejante, la Cat y la GP_x disminuyen tras la estenosis renal. La catalasa aórtica también se encuentra disminuida en ratones genéticamente hipertensos (Uddin *et al.*, 2003). Por tanto, en estos modelos animales, la menor actividad de estas enzimas antioxidantes endógenas contribuye a la elevación de ROS, al no poderlas eliminar eficazmente.

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

2.3. Disfunción endotelial y ET-1.

NO y ET-1 son mediadores derivados del endotelio que juegan un papel importante en la homeostasis vascular. El NO es generado y liberado por las células endoteliales tanto en condiciones basales como frente a estímulos, como las fuerzas de cizallamiento o “*shear stress*” y el flujo sanguíneo (Cooke *et al.*, 1991). En el sistema cardiovascular el NO no sólo origina vasodilatación sino que también inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, la proliferación de las VSMC, la adhesión de monocitos, la expresión de diferentes moléculas de adhesión y la producción de ET-1 (Radomski *et al.*, 1987a,b; Taddei *et al.*, 2000). La ET-1 posee capacidad para producir una vasoconstricción sostenida concentración dependiente

y endotelio independiente en anillos vasculares de varias especies (Hickey *et al.*, 1985; O'Brien *et al.*, 1987). ET-1 interacciona con varios sistemas biológicos como el sistema L-arginina/NO, el SRAA y el sistema nervioso simpático. Además, el sistema de ETs juega un papel importante en diversas acciones biológicas como regulación del tono vascular, balance sodio-agua, desarrollo de las células de la cresta neural y en la neurotransmisión (Kedzierski y Yanagisawa, 2001). Recientes estudios han sugerido que el desbalance entre NO/ET-1 puede contribuir a cambios en la función vascular observados en estados patológicos. De hecho, se ha observado que algunas vasculopatías que están asociadas a una menor biodisponibilidad de NO muestran un incremento en la síntesis de ET-1, lo cual sugiere una estrecha relación entre ambos mediadores derivados del endotelio (Alonso y Radomski, 2003).

La ET-1 puede reducir la biodisponibilidad del NO por disminución de la producción de NO mediante inhibición de la eNOS a través de la caveolina-1. La caveolina-1 es la principal proteína de la caveola y actúa como un regulador negativo de la actividad de la eNOS al unirse a ella (Minshall *et al.*, 2003). En condiciones patológicas, ET-1 aumenta la expresión de caveolina-1, que inhibe la actividad de la eNOS (Kamoun *et al.*, 2006; Karaa *et al.*, 2005). O bien, por aumento de la degradación de NO mediante su interacción con ROS. *In vivo*, la sobreexpresión de ET-1 induce un aumento en la producción de ROS en el árbol vascular (Amiri *et al.*, 2004), que pueden interactuar con el NO, o bien, con BH₄ e inducir el desacoplamiento de la eNOS (apartado 2.2.c.). En ambos casos se produce una disminución en los niveles de NO, lo cual conduce a la aparición de disfunción endotelial. El papel de la ET-1 endógena para inducir disfunción endotelial por aumento en la producción de ROS es confirmado en el modelo DOCA-sal, donde se observa disfunción endotelial, disminución de los niveles de BH₄, aumento de la producción de ROS y aumento de los niveles plasmáticos de ET-1 (Zheng *et al.*, 2003; Iglarz *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2007). En este modelo animal de hipertensión, los niveles de BH₄ son restaurados por inhibición de la NAD(P)H oxidasa, principal fuente generadora de ROS a nivel vascular, o por inhibición de los receptores de ET-1 (Zheng *et al.*, 2003).

La ET-1 juega un papel importante en los modelos experimentales de hipertensión sal-sensibles, tales como ratas hipertensas DOCA-sal, ratas hipertensas Dahl sal sensibles, infusión de Ang II, ratas Goldblatt 2 riñones-1clip, infusión de aldosterona y SP-SHR con o sin sal (Tostes y Muscara, 2005; Schiffrin, 2005; Moreau y Schiffrin, 2003; Jiménez *et al.*, 2007). En estos modelos se ha observado un aumento en los niveles plasmáticos de ET-1 y de ROS, lo cual está asociado a la disfunción endotelial que se observa en ellos. Diversos autores han demostrado que la ET-1, a través de la activación de sus receptores (ET_A/ET_B), produce un aumento en la producción vascular de ROS por activación de la NAD(P)H oxidasa (Li *et al.*, 2003d; Callera *et al.*, 2003). Este incremento de ROS contribuye a la reducción de la biodisponibilidad del NO, dando lugar a disfunción endotelial (Iglarz *et al.*, 2003). Por tanto, las ROS juegan un papel esencial en la disfunción endotelial observada en los modelos de hipertensión inducidos por la elevación de los niveles de ET-1 (Sedeek *et al.*, 2003).

Diversos estudios han sugerido la implicación de la ET-1 en la patogénesis inicial de las enfermedades cardiovasculares. Así ET-1 es un predictor temprano de la disfunción endotelial presente en las enfermedades cardiovasculares, como aterosclerosis, diabetes, hipertensión pulmonar y enfermedades autoinmunes. La implicación de la ET-1 en la disfunción endotelial observada en aterosclerosis ha sido demostrada en ratones deficientes en apoE, que es un modelo animal de hiperlipidemias y aterosclerosis ampliamente usado. En este modelo animal tanto la disfunción endotelial como el desarrollo de la placa de ateroma puede ser prevenido por el bloqueo específico o no específico de los receptores de ET-1 (Barton *et al.*, 1998; Best *et al.*, 1999). En la diabetes, el aumento de los niveles de insulina y de los productos de glicosilación avanzada induce una activación del sistema de ETs y el desarrollo y mantenimiento de la disfunción endotelial. En pacientes con hipertensión pulmonar se observa un aumento en la expresión y los niveles plasmáticos de ET-1, que induce disfunción endotelial (Stewart *et al.*, 1991; Giaid *et al.*, 1993b). La disfunción endotelial inducida por un aumento en los niveles de ET-1 también ha sido descrita en enfermedades autoinmunes como escleroderma, lupus y enfermedad del tejido conectivo mixta (Hashimoto *et al.*, 1982; Lima *et al.*, 1991; Filep *et al.*, 1995).

A pesar de las evidencias clínicas y preclínicas existentes, los mecanismos por los que la ET-1 induce disfunción endotelial están siendo investigados actualmente.

2.4. Valor pronóstico de la disfunción endotelial.

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

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

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

Bugiardini *et al.* (2004) han demostrado recientemente que el dolor torácico en mujeres con arterias coronarias angiográficamente normales no es totalmente benigno. Mujeres con angina de-novo, evidencia de defecto de perfusión cardíaca reversible,

angiografía coronaria normal y disfunción endotelial de base, tenían elevado riesgo cardiovascular y mayor incidencia de enfermedad arterial coronaria.

La disfunción endotelial también se ha visto que puede ser un factor predictivo del riesgo de desarrollar hipertensión en mujeres postmenopáusicas. Rossi *et al.* (2004) demostraron que mujeres sanas postmenopáusicas y normotensas con disfunción endotelial tenían una mayor probabilidad de desarrollar hipertensión que las que no padecían disfunción endotelial.

2.5. Tratamiento de la disfunción endotelial.

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

En la hipertensión, la reducción de la presión arterial *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 α - y β -bloqueantes adrenérgicos no tienen efecto directo sobre la disfunción endotelial (Nadar *et al.*, 2004), aunque el tratamiento con carvedilol, fármaco perteneciente a la tercera generación de β -bloqueantes, inhibe el estrés oxidativo (Yasunari *et al.*, 2004). Los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), los antagonistas del receptor de Ang II (ARA-II) y los bloqueantes de canales de calcio, mejoran la disfunción endotelial en pacientes hipertensos (Nadar *et al.*, 2004; Schiffrin, 2004). Schiffrin *et al.* (2002a) mostraron que en pacientes con hipertensión esencial, el cambio del β -bloqueante atenolol por el antagonista del receptor de Ang II irbersartán corregía la disfunción endotelial. También demostraron que el tratamiento con el antagonista de canales de calcio amlodipino, mejoraba la función endotelial en pacientes hipertensos mientras que el β -bloqueante atenolol, que ejercía el mismo control sobre la presión arterial, no (Schiffrin *et al.*, 2002b). Los ARA-II y los IECA son específicamente

beneficiosos. Los mecanismos por los que el bloqueo del sistema renina-angiotensina pueden mejorar la disfunción endotelial incluyen la reducción del estrés oxidativo y la inflamación (Schiffrin y Touyz, 2003). En el caso de los antagonistas de receptores de ET-1, diversos autores han descrito que el tratamiento con un antagonista selectivo de receptores ET_A, o bien, un antagonista no selectivo (ET_{A/B}), no revierte el aumento en la presión arterial pero sí previene el daño vascular, la disfunción endotelial, la hipertrofia vascular y cardiaca, la progresión del daño renal y mejora la supervivencia en los modelos experimentales de hipertensión sal sensibles (Schiffrin, 2005; Moreau y Schiffrin, 2003). Esto nos indica que la ET-1 probablemente posee acciones cardiovasculares y renales directas independientes de sus efectos hemodinámicos. Los efectos pro-inflamatorios y sobre el crecimiento celular parecen ser los responsables de las acciones cardiovasculares y renales directas de ET-1 (Schiffrin, 2005; Moreau y Schiffrin, 2003; Callera *et al.*, 2004).

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

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

oxidativo. El tratamiento a largo plazo con las vitaminas antioxidantes C y E también mejora la disfunción endotelial *in vivo* (Kinlay *et al.*, 2004).

3. Flavonoides.

3.1 Generalidades.

Dentro de los compuestos polifenólicos, los flavonoides representan la clase más importante y numerosa (Rice-Evans *et al.*, 1998). Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas y ejercen diversas funciones en ellas, como antifúngicos, bactericidas, quelantes de metales, protectores de radiación ultravioleta, colorantes y controladores de las auxinas reguladoras del crecimiento y la diferenciación en los vegetales. Todos ellos presentan como elemento estructural común un esqueleto de difenilpirano ($C_6-C_3-C_6$), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo (C) de pirano (Martínez-Flórez *et al.*, 2002) (Figura 8). Sobre este esqueleto pueden darse miles de sustituciones, lo que origina las diferentes clases de flavonoides: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles (catequinas y proantocianidinas), antocianidinas, chalconas, auronas e isoflavonas (Figura 9).

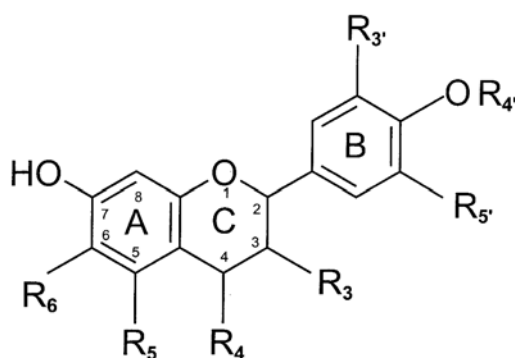
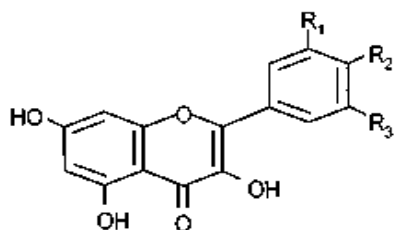


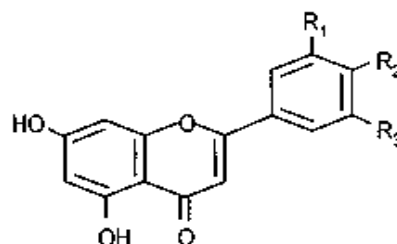
Figura 8. Estructura general de los flavonoides y numeración de sus sustituyentes.

Flavonoles



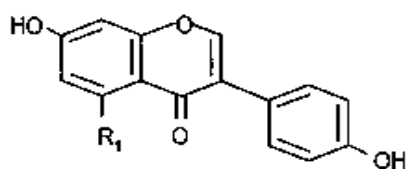
$R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$: Quercetina
 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{H}$: Isorhamnetina
 $R_2 = \text{OH}; R_1 = R_3 = \text{H}$: Kaempferol

Flavonas



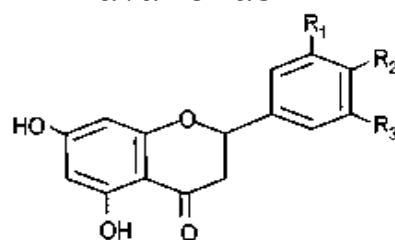
$R_1 = \text{H}; R_2 = \text{H}$: Apigenina
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Luteolina

Isoflavonas



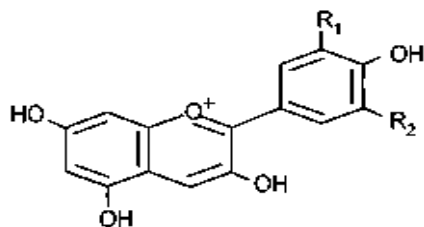
$R_1 = \text{H}$: Daidzeina
 $R_1 = \text{OH}$: Genisteina

Flavanonas



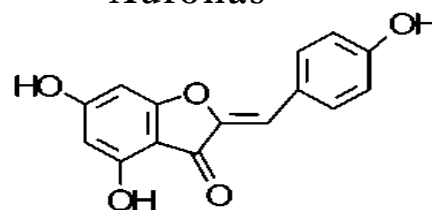
$R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$: Naringerina
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Eriodictiol
 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OCH}_3$: Hesperedina

Antocianidinas



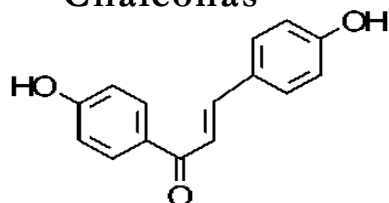
$R_1 = R_2 = \text{H}$: Pelargonidina
 $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$: Cianidina
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Delfinidina

Auronas



Hispidol

Chalconas



Isoliquiritigenina

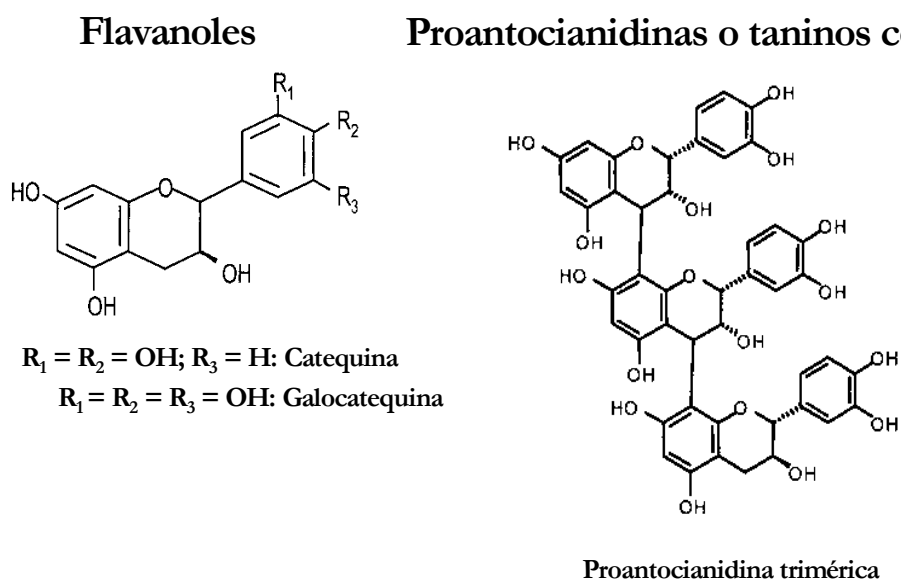


Figura 9. Principales grupos de flavonoides y sus representantes más significativos.

Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, encontrándose en cantidades variables en frutas, verduras, semillas, especias y bebidas derivadas de vegetales, como el te, las infusiones, el mosto, los zumos y el vino, por lo que entran a formar parte de nuestra dieta (Macheix *et al.*, 1990). Kuhnau *et al.* (1976) estimaron una ingesta diaria media del total de polifenoles de alrededor de 1 g. Recientemente, se ha calculado que el consumo diario medio en humanos de flavonoles más flavonas en unos 20-25 mg (Manach *et al.*, 2004). No obstante, hay grandes variaciones dependiendo de los hábitos nutricionales y las zonas geográficas, por ejemplo, desde 5 a 125 mg de flavonoles por día en Italia, a una media de 82 mg de antocianidinas en Finlandia, alcanzando incluso los 200 mg, y variando el consumo de flavonoles más flavonas en Alemania de 4 a 100 mg al día, con un consumo medio estimado en 23 mg (Sampson *et al.*, 2002; Heinonen 2001; Pietta *et al.*, 1996; Hertog *et al.*, 1993a). El vino tinto, por ejemplo, contiene 1,8 g/l de polifenoles, entre los que los flavonoides forman el grupo mayoritario, con concentraciones entre 1,36-1,5 g/l (Waterhouse, 2002).

El interés en los flavonoides presentes en la dieta ha aumentado en los últimos años debido a la publicación de numerosos estudios epidemiológicos que han mostrado una correlación inversa entre el consumo diario de flavonoles y flavonas, y una menor incidencia y mortalidad de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Geleijnse *et al.*, 2002; Arai *et al.*, 2000; Hertog *et al.*, 1996; Hertog *et al.*, 1993b). El meta-análisis de siete estudios de cohortes prospectivos determinó que estar entre los individuos del tercio superior en la ingesta diaria de flavonoles se asociaba a un menor riesgo de mortalidad debida a enfermedad cardíaca coronaria, comparados con el tercio inferior después de ajustar el resto de factores de riesgo y de otros componentes dietéticos (Huxley y Neil 2003).

Esto ha llevado también en los últimos años a un gran interés sobre los efectos de los flavonoides en el endotelio vascular, como demuestran el gran número de estudios experimentales e incluso algunos clínicos (Duarte *et al.*, 2001a,b; Appel *et al.*, 1997), ya que parece ser una de las claves de sus efectos cardioprotectores. La dificultad estriba en que al ser los flavonoides un grupo tan numeroso y heterogéneo, sus efectos pueden diferir entre ellos tanto cuantitativa como cualitativamente. La mayoría de los datos disponibles se basan en alimentos ricos en flavonoides, como el coco, o en bebidas que los contienen en altas proporciones, como el vino, los zumos y el té; o en extractos de vino o zumos de frutas; o en algunos compuestos aislados como kaempferol, delphinidina y quercetina; lo cual hace muy difícil extrapolar resultados al comparar unos con otros. El flavonol quercetina representa el 60-75% del total de flavonoles más flavonas de la dieta (Hertog *et al.*, 1993a), siendo las principales fuentes de flavonoles, y sus concentraciones medias: las cebollas (350-1200 mg/kg), la col rizada (300-600 mg/kg), el puerro (30-225 mg/kg), los tomates cherrys (15-200 mg/kg), el brócoli (40-100 mg/kg), los arándanos (30-160 mg/kg), las manzanas (20-40 mg/kg), las habas (10-50 mg/kg), las uvas tintas (15-40 mg/kg), la infusión de té negro (30-45 mg/l), la infusión de té verde (20-35 mg/l) y el vino tinto (2-30 mg/l) (Manach *et al.*, 2004). Un amplio rango de acciones biológicas de los flavonoides, incluyendo sus propiedades antioxidantes, antiagregantes plaquetarias y vasodilatadoras (Rice-Evans *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 1993a,b) (Figura 10), concuerdan con los efectos protectores de quercetina en los modelos estudiados de enfermedades cardiovasculares

(Sánchez *et al.*, 2006; Galisteo *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2001a,b), por lo que puede representar uno de los principales promotores de los saludables efectos cardiovasculares de los flavonoides.

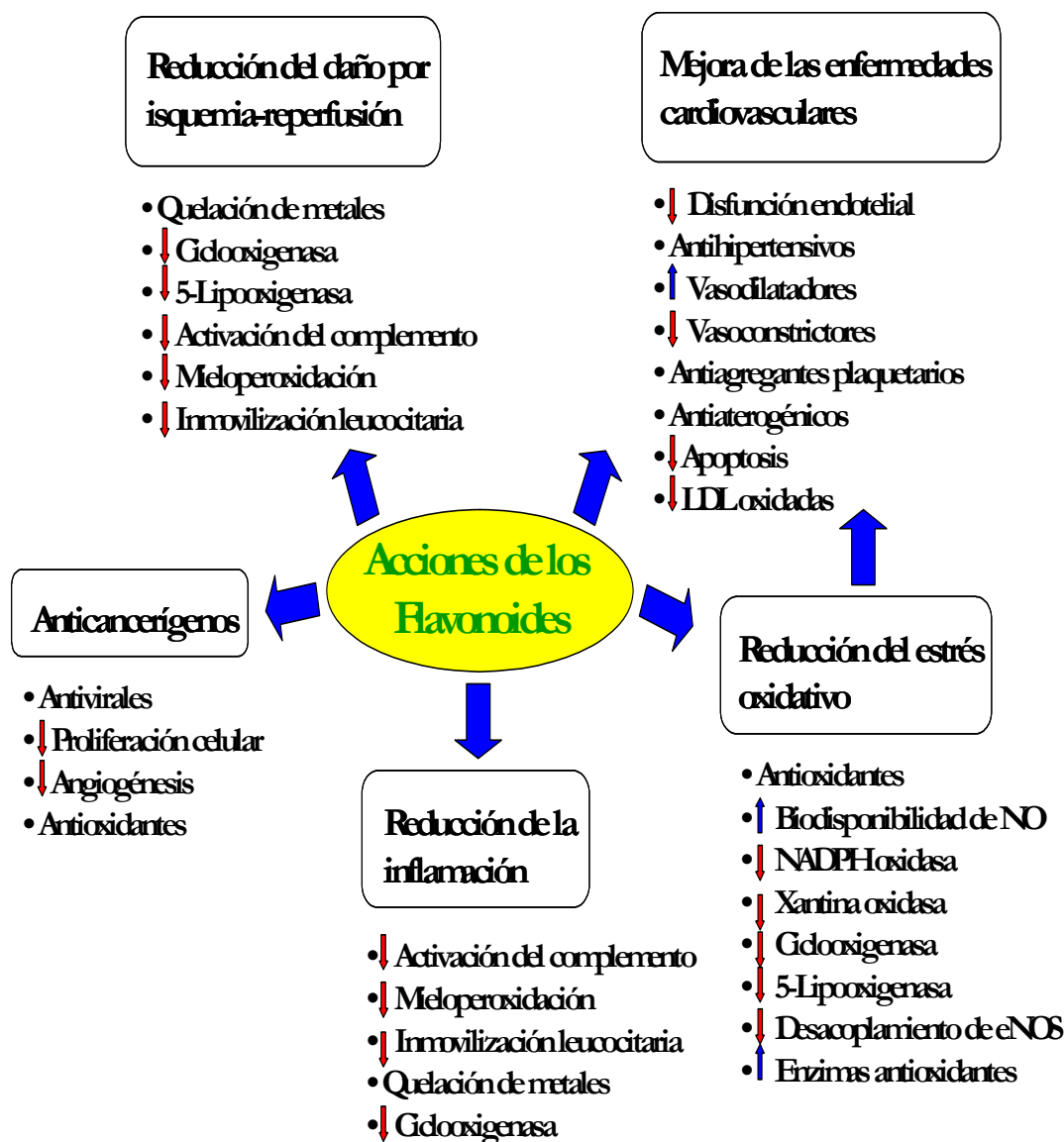


Figura 10. Esquema de las actividades biológicas de los flavonoides y sus principales efectos saludables.

↓: Disminución, inhibición. ↑: Aumento, estimulación.

3.2. Biodisponibilidad y metabolismo de quercetina.

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

Los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción que se dan en el organismo han sido ampliamente estudiados para algunos de los flavonoides (Scalbert y Williamson, 2000; Manach *et al.*, 2004; Williamson y Manach, 2005), pero debido a sus diversos efectos y propiedades, es difícil extrapolar resultados o asumir un mismo mecanismo o proceso para todos, por eso nos centraremos en la quercetina, el principal flavonol presente en la dieta y objeto de esta Tesis, del que se sabe bastante sobre su farmacocinética.

En los alimentos, todos los flavonoides, excepto los flavanoles, se encuentran como glicósidos (unidos a diferentes azúcares), lo que influye en su absorción (aunque no en la proporción de sus metabolitos circulantes). Recientes estudios en animales y humanos han demostrado que quercetina y otros flavonoides relacionados se absorben mayoritariamente en el intestino delgado (10-50%), fundamentalmente como agliconas o como glicósidos (Hollman *et al.*, 1999; Day *et al.*, 2003). Los glicósidos de quercetina se absorben en el intestino delgado, y más eficazmente incluso que la aglicona sola, debido a la existencia de un transportador de glucosa dependiente de sodio en la membrana de los enterocitos, el SGLT1 (*Sodium-Glucose Cotransporter type 1*) (Gee *et al.*, 1998; 2000), en los cuales serían hidrolizados por β -glucosidasas. No obstante, la función de este transportador ha sido modificada recientemente (Kottra y Daniel, 2007). Durante muchos años se discutió la presencia en plasma de glicósidos de quercetina, pero actualmente está aceptado que estos compuestos no se encuentran en el plasma a dosis nutricionales, y que prácticamente tampoco está presente como aglicona, sino en sus formas conjugadas (Graefe *et al.*, 2001; Sesink *et al.*, 2001).

El primer paso del metabolismo de flavonoides tanto en ratas como en humanos ocurre en el intestino delgado, donde muchos de los flavonoides absorbidos sufren metilación y conjugación con ácido glucurónico, principalmente en posición 3' (Spencer *et al.*, 1999;

Williamson *et al.*, 2005). El 20-40% de quercetina absorbida es metilada en la posición 3', formándose isorramnetina (Day *et al.*, 2001). La catecol-O-metil transferasa (COMT) es la enzima que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la s-adenosil-l-metionina a polifenoles con una parte catecólica, y aunque está presente en numerosos tejidos, es sobre todo activa en el hígado y los riñones. Tras la ingestión de alimentos ricos en quercetina, como las cebollas, se encontraron en plasma otros metabolitos de quercetina como son quercetina-3-O-glucurónido, 3'-O-metilquercetina-3-O-glucurónido y quercetina-3'-O-sulfato mayoritariamente (Day *et al.*, 2001). Las sulfotransferasas catalizan la transferencia de un grupo sulfato de la 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato a un grupo hidroxilo en diversos substratos, como los flavonoides, lo que ocurre en el hígado (Piskula *et al.*, 1998). Las UDP-glucuronosiltransferasas, enzimas unidas a membrana en el retículo endoplásmico de numerosos tejidos, son las encargadas de catalizar la transferencia de un grupo glucurónico desde el ácido UDP-glucurónico a la mayoría de los constituyentes de la dieta, como los flavonoides. Además de las transformaciones que se dan durante estos procesos, la microflora intestinal también puede producir ácidos fenólicos y aromáticos a partir de los flavonoides. Así, la degradación de quercetina produce principalmente ácido 3,4-dihidroxifenil acético, ácido 3-metoxi-4-hidroxifenil acético, ácido 3 hidroxifenil acético y quercetina 3'-O-sulfato (Aura *et al.*, 2002; Day *et al.*, 2001).

Todas estas transformaciones hacen que estos metabolitos presenten propiedades fisicoquímicas (tamaño, polaridad y forma iónica) y actividades biológicas (propiedades antioxidantes, efecto vasodilatador y actividad enzimática) diferentes a las de quercetina, siendo responsables de muchos de los efectos biológicos de quercetina. Así, isorramnetina, principal metabolito metilado de quercetina a nivel plasmático, presenta propiedades antioxidantes actuando como captador de ROS al igual que quercetina (Ozgoval *et al.*, 2003), propiedades vasodilatadoras actuando como vasodilatador directo tanto en vasos de conductancia como en vasos de resistencia por un mecanismo endotelio independiente y con una potencia mayor que quercetina (Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2002), y propiedades como inhibidor enzimático de diferentes enzimas generadoras de ROS como XO, COX y NAD(P)H oxidasa (Ferrandiz *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1993; Lodi *et al.*, 2006). En este

último caso, isorramnetina puede actuar como inhibidor directo de la enzima, presentando una potencia mayor que la de apocinina, o bien inhibiendo la sobreexpresión de alguna de las subunidades de la NAD(P)H oxidasa inducida por Ang II (Steffen *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2007). Todas estas propiedades hacen que la isorramnetina, al igual que quercetina, prevenga la disfunción endotelial y el aumento del estrés oxidativo (Sánchez *et al.*, 2007).

Un característica de la biodisponibilidad de quercetina, que la diferencia de la mayoría de los flavonoides, es que la eliminación de sus metabolitos es muy lenta, con unas vidas medias de entre 11-28 horas (Graefe *et al.*, 2001), lo que facilita su acumulación en plasma y tejidos tras dosis repetidas o un consumo frecuente de productos vegetales, que alarga la duración de sus efectos (Hollman *et al.*, 1999).

3.3. Efectos vasculares *in vitro* de quercetina.

Los efectos vasculares de varios flavonoides se han estudiado ampliamente en ensayos *in vitro*. Sin embargo, hay que tener mucho cuidado a la hora de extrapolar el resultado de estos estudios para explicar los efectos *in vivo*, puesto que la biodisponibilidad de los flavonoides no se conoce con exactitud. Como se comentó anteriormente, una vez ingerida y absorbida a nivel intestinal fundamentalmente, la quercetina se metaboliza intensamente, primero en los enterocitos y después en el hígado (Crespy *et al.*, 2002; Day *et al.*, 2001), por lo que se cree que muchos de sus efectos *in vivo* podrían deberse a sus metabolitos conjugados. Pero los estudios sobre los efectos de estos metabolitos son muy escasos y, hasta el momento, no se sabe qué efectos *in vitro* del flavonoide “madre” pueden corresponderse también con los de sus metabolitos.

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

Tanto quercetina como otros flavonoides relacionados ejercen un efecto vasodilatador directo, no mediado por endotelio, en arterias aisladas (Duarte *et al.*, 1993a, b; Fitzpatrick *et al.* 1993). Este efecto vasodilatador se da en arterias contraídas con diferentes agentes

vasoconstrictores, como NA, ET-1, TXA₂, ésteres de forbol (activadores de PKC), y KCl. Los mecanismos moleculares involucrados podrían estar relacionados con diferentes acciones sobre proteínas-quinasas como la kinasa de cadenas ligeras de miosina (MLCK) y PKC. Es interesante resaltar que quercetina y sus metabolitos no conjugados son más potentes en arteria coronaria (Ibarra *et al.*, 2002) y en arterias de resistencia que en vasos de conductancia, como la aorta (Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2002). Sin embargo, recientemente se ha publicado que los metabolitos plasmáticos de quercetina (formas glucurónico y sulfato) carecen de actividad vasodilatadora directa (Lodi *et al.*, 2009).

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

3.3.b. Efectos sobre el óxido nítrico.

Se ha descrito un efecto vasodilatador dependiente de endotelio para numerosos flavonoides, como delfinidina y crisina (Duarte *et al.*, 2001b; Andriambelason *et al.*, 1999), pero para otros, como quercetina, este efecto podría estar enmascarado por una vasodilatación directa, independiente de endotelio (Andriambelason *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 1993b). La vasodilatación dependiente de endotelio inducida por una mezcla de polifenoles del vino y por delfinidina es inhibida por inhibidores de NOS, indicando que

está mediada por la vía del NO-GMPc. Este efecto parece estar relacionado con una mayor producción de NO más que con una protección del NO. Estos flavonoides aumentan los niveles citosólicos de Ca^{2+} (Andriambelison *et al.*, 1999, 1998), lo que activa la eNOS. Este aumento de Ca^{2+} en células endoteliales se inhibió con una mezcla de Cat y SOD, lo que indica que está relacionado con la generación de O_2^- inducida por los polifenoles (Duarte *et al.*, 2004). Por el contrario, crisina provoca la activación de la eNOS por una vía independiente de calcio y relacionada con la fosforilación a través de la PKB (Villar *et al.*, 2005).

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

Sin embargo, los flavonoides, paradójicamente, también pueden captar NO (Van Acker *et al.*, 1995), o auto oxidarse en medios acuosos, produciendo O_2^- , lo que lleva también a la inactivación de NO (López-López *et al.*, 2004). Pero la velocidad de captación de NO por los flavonoides, entre ellos quercetina, es muy baja, menor incluso que la de hemoglobina, que es un captador fisiológico de NO. Esta capacidad pro-oxidante no se ha encontrado en los metabolitos conjugados de quercetina, que si mantienen su eficacia antioxidante (Lodi *et al.*, 2009).

El NO produce la vasodilatación arterial activando la guanilato ciclasa (GC) en las VSMC, aumentando así su contenido en GMPc (Warner *et al.*, 1994). Este GMPc es metabolizado por las fosfodiesterasas (PDEs, *phosphodiesterases*), por lo que las acciones del NO y la vasodilatación dependiente de endotelio están muy influenciadas por la actividad de las estas enzimas. Así, la inhibición de PDEs, puede prevenir la disfunción endotelial en determinadas circunstancias (Vlachopoulos *et al.*, 2003). Muchos flavonoides se ha demostrado que inhiben numerosas isoformas de PDEs (Picq *et al.*, 1989), por lo que la

inhibición de PDEs podría ser otro mecanismo por el cual los flavonoides prevendrían la disfunción endotelial.

Los flavonoides también pueden regular la actividad del NO influyendo sobre el ARNm de eNOS o sobre la expresión proteica de la enzima, como demuestra el hecho de que la incubación a largo plazo de células endoteliales con polifenoles del vino, resveratrol o con antocianidina, aumentó la expresión de eNOS aunque la mayoría de los flavonoides no tuvo efecto (Wallerath *et al.*, 2003; Nicholson *et al.*, 2008).

3.3.c. Efectos antioxidantes.

Los efectos beneficiosos de los flavonoides suelen atribuirse generalmente a su gran capacidad antioxidante. Quercetina y otros flavonoides son potentes captadores de ROS, como el O_2^- , OH \cdot y H_2O_2 , a concentraciones micromolares (Ozgova *et al.*, 2003). También se ha demostrado que los metabolitos glucurónidos de quercetina tienen propiedades antioxidantes (Moon *et al.*, 2001). Pero aparte de estas propiedades como captadores de ROS, los flavonoides son capaces de inhibir numerosas enzimas generadoras de ROS, lo que puede ser aún más importante. Entre estas se incluyen la XO (Chang *et al.*, 1993), la COX (Ferrandiz *et al.*, 1991) y la NAD(P)H oxidasa de membrana en neutrófilos (Tauber *et al.*, 1984) y en VSMC (Sánchez *et al.*, 2007; Lodi *et al.*, 2006). También pueden estimular otras con capacidad antioxidante, como Cat y SOD (Sudhees *et al.*, 1999). Al disminuir las concentraciones celulares de O_2^- a través de estos mecanismos, los flavonoides protegen el NO y aumentan su actividad biológica. Además, son potentes inhibidores de la oxidación de las LDL, un proceso clave en la patogénesis de la aterosclerosis. Las propiedades hidrofílicas de los flavonoides facilitan su localización en la fase acuosa y protegen a los lípidos, la vitamina E y las LDL del ataque inicial de radicales hidrofílicos. Además, los flavonoides previenen la citotoxicidad de las LDL oxidadas.

Sin embargo, los flavonoides también pueden ser pro-oxidantes, como ya se comentó en el apartado 3.2.b. Quercetina puede auto-oxidarse en soluciones acuosas y generar radicales libres (López-López *et al.*, 2004), además de disminuir los niveles de tioles intracelulares, como el glutatión. Pero este efecto pro-oxidante puede ser paradójicamente

beneficioso, ya que podría jugar un papel positivo en la disfunción endotelial, porque la generación de O_2^- en las células endoteliales puede estimular la señal del Ca^{2+} y aumentar así la actividad eNOS y la liberación de EDHF (Duarte *et al.*, 2004).

3.3.d. Efectos sobre el factor hiperpolarizante derivado de endotelio.

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

3.3.e. Efectos sobre ET-1.

Bajas concentraciones de polifenoles de vino tinto son suficientes para inhibir poderosamente la liberación de ET-1 y la transcripción de pre-pro-endotelina-1 en células endoteliales aórticas bovinas. Pero ninguno de los compuestos aislados (como quercetina o resveratrol) tuvo esa capacidad a esas concentraciones (Corder *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha visto que resveratrol y quercetina son capaces, a concentraciones de 0,1-50 μ M, de inhibir la liberación de ET-1 en células endoteliales umbilicales humanas cultivadas (Zhao *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 2008). Aunque no hay datos disponibles de los efectos *in vivo* de flavonoides aislados sobre la producción de ET-1, nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que la administración crónica de los polifenoles del vino tinto disminuye los niveles plasmáticos de ET-1 en ratas con hipertensión DOCA-sal (Jiménez *et al.*, 2007). Bronzel *et al.* (2007), también ha demostrado recientemente que la administración

crónica de antocianidinas disminuye los niveles plasmáticos de ET-1 en pacientes con síndrome metabólico.

3.3.f. Efectos sobre la apoptosis y la proliferación de células endoteliales.

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

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

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

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

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

3.4.a. Sobre la función endotelial en la hipertensión.

La elevación de la presión sanguínea es un factor importante y común en las principales enfermedades cardiovasculares, como enfermedad coronaria, infarto cerebral, enfermedad

arterial periférica, enfermedad renal e insuficiencia cardiaca (Kannel, 2000). Es bien conocido el efecto antihipertensivo de la dieta rica en frutas y vegetales en pacientes hipertensos (Appel *et al.*, 1997), y se ha atribuido principalmente a los antioxidantes presentes en estos alimentos, entre los que abunda, como hemos visto, quercetina.

Así, el tratamiento crónico con quercetina (5 o 10 mg/Kg/día) disminuyó la presión arterial en todos los modelos de hipertensión ensayados, incluyendo SHR, ratas deficientes en NO (tratadas crónicamente con L-NAME), ratas hipertensas DOCA-sal, ratas hipertensas Dahl sensibles a la sal, y ratas hipertensas Goldblatt dos riñones un clip (Sánchez *et al.*, 2006; García-Saura *et al.*, 2005; Galisteo *et al.*, 2004; Aoi *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2001b). Es interesante señalar que estos importantes efectos antihipertensivos son independientes del nivel de estrés oxidativo, el daño renal, el NO y el estado del sistema renina-angiotensina. También produjo una protección en los órganos diana de la hipertensión en estos animales, reduciendo los índices cardíacos y renales, la proteinuria y el remodelado vascular asociado a la hipertensión. Estos efectos preventivos sobre cambios estructurales podrían deberse a la reducción de la presión sanguínea y la consiguiente disminución del efecto trófico de las fuerzas hemodinámicas, pero también podrían deberse al efecto antiproliferativo directo de quercetina ya antes mencionado (apartado 3.3.f.).

Estos modelos experimentales de hipertensión y la hipertensión esencial humana se asocian a una disminuida vasodilatación dependiente de endotelio. En SHR, DOCA-sal y ratas Goldblatt, el tratamiento crónico con quercetina mejoró la función vasodilatadora endotelial, analizada mediante la respuesta relajante a la acetilcolina. También se encontraron altos niveles de metabolitos de NO (nitritos y nitratos) en la orina de estos animales tratados con quercetina. Todos estos modelos se asocian con un elevado estrés oxidativo, tanto plasmático como vascular y hepático, medido a través de los niveles de MDA plasmáticos y tisulares o isoprostano en orina. Quercetina también redujo estos parámetros (García-Saura *et al.*, 2005; Galisteo *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2001a). Así, el conjunto de estos datos apunta hacia la menor inactivación de NO por O_2^- , explicada anteriormente (apartados 3.3.b. y 3.3.c.).

Además, pueden darse cambios aparentes en la vasodilatación dependiente de endotelio como consecuencia de la reducción en la liberación de prostanoïdes vasoconstrictores derivados de endotelio (Auch-Schweld *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 2003). El tratamiento crónico con quercetina no modificó la vasoconstricción dependiente de endotelio en SHR (Duarte *et al.*, 2001b), pero sí en ratas deficientes en NO y en ratas Goldblatt (García-Saura *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2002). Pero es interesante señalar que la producción aórtica del vasoconstrictor derivado de endotelio TXA₂ estaba aumentada en los tres modelos respecto a sus controles normotensos, y quercetina redujo estos niveles aórticos de TXA₂ en las ratas deficientes en NO y en las ratas Goldblatt, pero no, como la vasoconstricción, en las SHR (García-Saura *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2002).

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

Recientemente se ha publicado que el consumo de una dieta suplementada con quercetina (1,5 g/Kg de dieta) en SHR de 5 semanas de edad durante un periodo de 5 a 11 semanas, no reduce la presión arterial ni las complicaciones orgánicas asociadas, entre ellas la disfunción endotelial. Por el contrario, la administración mediante sonda gastroesofágica de 10 mg/kg de quercetina durante 4 días consiguió disminuir la presión arterial. Estos datos indican que el modo de administración es un determinante crítico de los beneficios cardiovasculares de quercetina, posiblemente relacionados con los niveles plasmáticos alcanzados de quercetina y/o sus metabolitos (Carlstrom *et al.*, 2007).

Algunos estudios han analizado los efectos de alimentos ricos en flavonoides, como el coco y los zumos de frutas sobre la hipertensión esencial humana. En un estudio con 12 pacientes hipertensos a los que se les administró alternativamente durante 5 semanas un zumo rico en flavonoides, y otro pobre en ellos, se vio que el primero redujo

significativamente la presión sanguínea en estos sujetos (Reshef *et al.*, 2005). En otro estudio se demostró que el chocolate negro, rico en flavonoides, redujo significativamente la presión sanguínea y la resistencia a la insulina, y mejoró la vasodilatación dependiente de endotelio (determinada a través de la vasodilatación inducida por flujo), comparado con el chocolate blanco, pobre en flavonoides. Esto sugiere que los alimentos ricos en flavonoides ejercen un efecto beneficioso sobre la presión arterial y la función endotelial en pacientes hipertensos.

Edwards *et al.* (2007) han analizado los efectos sobre la presión arterial del consumo de quercetina (730 mg/día) durante cuatro semanas en individuos prehipertensos y con hipertensión en estadio 1. Encontraron que la quercetina reduce la presión arterial media de forma significativa (aproximadamente 5 mmHg) sólo en individuos hipertensos. Estos cambios en la presión sanguínea no parecen estar relacionados con modificaciones en marcadores sistémicos de estrés oxidativo, desconociendo su mecanismo de acción.

3.4.b. Sobre la oxidación de LDL y aterosclerosis.

Uno de los mecanismos ya mencionado (apartado 3.3.c.) responsable de la disfunción endotelial es el aumento de la oxidación de las LDL. Los flavonoides, gracias a su acción antioxidante, reducen la sensibilidad de los lípidos a la oxidación. En hámster, los polifenoles del vino y el mosto de uva redujeron las concentraciones plasmáticas de lípidos (Vinson *et al.*, 2001), lo que concuerda con estudios en humanos. El consumo de vino tinto durante 2 semanas produjo una reducción del 20% en la tendencia del plasma sanguíneo a sufrir peroxidación en sujetos sanos (Fuhrman *et al.*, 1995). La ingestión a corto plazo de mosto de uva mostró una reducción en la susceptibilidad de las LDL a oxidarse en pacientes con enfermedad coronaria (Stein *et al.*, 1999). Sin embargo, en otros estudios en humanos, la oxidación de las LDL no se vio modificada por el consumo de flavonoides (de Rijke *et al.*, 1996), por lo que el efecto de los flavonoides sobre la oxidación de las LDL podría variar dependiendo de su estructura, la fuente y la dosis. Además de esto, numerosos flavonoides han demostrado prevenir el desarrollo de las lesiones

ateroscleróticas en ratones deficientes en Apo E, sin afectar a los niveles LDL-colesterol o HDL-colesterol (Hayek *et al.*, 1997).

3.4.c. Sobre las enfermedades coronarias.

La patofisiología de la enfermedad isquémica cardíaca y los síndromes coronarios agudos implica múltiples alteraciones tanto en la reactividad como en la estructura vascular y en las interacciones entre la pared del vaso y los elementos sanguíneos circulantes (Libby 2001). Los efectos antiaterogénicos y antihipertensivos descritos de los flavonoides (apartados 3.4.a. y 3.4.b.) podrían prevenir el desarrollo de enfermedades coronarias, y sus propiedades antiagregantes plaquetarias (Gryglewski *et al.*, 1987), reductoras de la expresión de MMP-2 y MMP-9 (Huang *et al.*, 1999) y sus efectos vasodilatadores coronarios (Ibarra *et al.*, 2002) podrían ser mecanismos protectores contra los accidentes coronarios agudos.

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

3.4.d. Sobre el infarto cerebral.

La causa principal de infarto cerebral es la interrupción del flujo sanguíneo cerebral que se da durante una obstrucción venosa o arterial (por un émbolo, como un fragmento de placa de ateroma, o por una trombosis local), o durante un paro cardíaco. Los flavonoides podrían usarse tanto tratamientos preventivos como agudos de estos sucesos (Simonyi *et al.*, 2005), ya que, como se ha dicho, previenen la disfunción endotelial (apartado 3.3.b.) responsable de la aterosclerosis y la trombosis, y disminuyen la presión arterial (apartado 3.4.a.) y el colesterol sanguíneo (apartado 3.4.b.). Quercetina ha demostrado ser capaz de eliminar los aniones O_2^- liberados durante la reperfusión (el retorno del flujo sanguíneo) tras la isquemia cerebral en un modelo de oclusión de cuatro vasos en ratas (Dajas *et al.*, 2003). Consecuentemente, también disminuyó significativamente el volumen infartado tras

la ligadura de la arteria cerebral media en un modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media en ratas. También se han investigado los efectos protectores de los polifenoles del vino en un modelo de isquemia cerebral localizada en ratas. Así, una semana de tratamiento oral con un extracto de polifenoles de vino tinto antes de la inducción de la isquemia, mostró que aunque estos no modificaron el metabolismo energético ni el estrés oxidativo, sí redujeron la excitotoxicidad inhibiendo la liberación masiva de glutamato y aspartato. También aumentaron el flujo sanguíneo residual tanto durante la oclusión como durante la rápida reperfusión. Además, pueden inducir un remodelado vascular, con un aumento del diámetro interno de los vasos cerebrales. Y reducir el tamaño de la zona cerebral infartada, lo que se relaciona con la inhibición de la excitotoxicidad inducida por la isquemia y con el aumento del flujo sanguíneo cerebral (Curin *et al.*, 2005; Curin *et al.*, 2004). Todos estos datos sostienen la idea de los efectos protectores de los polifenoles en general frente al infarto cerebral.

Justificación y objetivos.

Justificación y objetivos del trabajo.

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

La ET-1 es un potente péptido vasoconstrictor derivado del endotelio que juega un importante papel en la fisiopatología cardiovascular, de tal modo que la alteración de sus niveles está asociada a muchas formas de enfermedad cardiovascular. Se ha observado un aumento en los niveles de ET-1 en diversos modelos experimentales de hipertensión, tales como ratas DOCA-sal o infusión de Ang II, así como en aterosclerosis o diabetes, donde está asociado a la disfunción endotelial que se observa en estos modelos (Bousette y Giaid, 2003; Cernacek *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2003a; Schiffrin, 2005). Diversos autores han demostrado que la ET-1, a través de la activación de sus receptores (ET_A/ET_B), incrementa la producción vascular de ROS dando lugar a disfunción endotelial (Wedgwood *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003d; Loomis *et al.*, 2005).

Los mecanismos implicados en la producción de O_2^- inducida por Ang II están bien caracterizados. Así, la producción de O_2^- inducida por Ang II se puede dividir en dos fases, una fase aguda en la que están implicados la PKC, la tirosina kinasa c-Src, la transactivación de receptores de factores de crecimiento y la translocación hacia la membrana de la subunidad p47^{phox} (Li y Shah, 2003; Touyz *et al.*, 2003), y una fase mantenida que implica

un aumento en la regulación de las subunidades de la NAD(P)H oxidasa (Laplante *et al.*, 2006), mediada por activación de la PKC (Mollnau *et al.*, 2002; Lassegue *et al.*, 2001). En cambio, los mecanismos implicados en la producción de O_2^- inducida por ET-1 no están bien caracterizados. La ET-1 no induce un incremento agudo en la producción de ROS (Laplante *et al.*, 2005) y en sus efectos a largo plazo están implicadas la NAD(P)H oxidasa (Wedgwood *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003d; Elmarakby *et al.*, 2005), el desacoplamiento de la eNOS (Loomis *et al.*, 2005) y la cadena respiratoria mitocondrial (Callera *et al.*, 2006; Touyz *et al.*, 2004) como fuentes generadoras de ROS. Como se comentó anteriormente (apartado 2.2.a.), la principal fuente generadora de ROS en las células vasculares es la NAD(P)H oxidasa. Los mecanismos que unen a la ET-1 con esta enzima y la cascada de señalización involucrada en la modulación de la NAD(P)H oxidasa en el músculo liso vascular no están totalmente aclarados.

Uno de los principales sistemas efectores implicados en la vía de señalización celular de ET-1 es la relación entre la proteína G acoplada a los receptores ET_A/ET_B y la tirosina kinasa no dependiente de receptor, c-Src. Actualmente se han identificado al menos catorce quinasas relacionadas con Src (Martín, 2001), de las cuales la 60KDa c-Src es la isoforma que está expresada de manera más abundante en VSMC (Oda *et al.*, 1999). Esta isoforma está implicada en procesos de contracción, reorganización citoesquelética, proliferación y crecimiento celular. Además, c-Src es un regulador crítico de la generación de O_2^- a través del sistema NAD(P)H oxidasa inducida por Ang II, que contribuye a la amplificación del estrés oxidativo (Touyz *et al.*, 2003; Seshiah *et al.*, 2002). Estudios previos han demostrado que c-Src es un efector de la vía de señalización de ET-1 en células no vasculares (Kodoma *et al.*, 2002; Kodoma *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2005; Milan *et al.*, 2006; Kovacic *et al.*, 1998). En cambio, existe una gran controversia en cuanto a su participación en la vía de señalización de ET-1 en VSMC. De hecho, ET-1 aumenta la actividad de c-Src, lo que estimula la proliferación de VSMC de aorta de rata (Schieffer *et al.*, 1997). Sin embargo, ET-1 no produce un incremento rápido de la fosforilación de c-Src en VSMC de arterias mesentéricas de ratón (Yogi *et al.*, 2007). Actualmente parece estar claramente establecido

que c-Src es un importante mediador de los efectos de Ang II a nivel vascular, sin embargo no existen evidencias directas del papel de c-Src en la producción de O_2^- inducida por ET-1. Además, los posibles mecanismos implicados en la regulación de la NAD(P)H oxidasa por c-Src tras la activación por ET-1 también son desconocidos.

Otro evento de señalización clave provocado por la activación de receptores de ET-1 es la cascada de las MAPKs (Foschi *et al.*, 1997; Fei *et al.*, 2000; Daou *et al.*, 2004; Touyz *et al.*, 2004; Yogi *et al.*, 2007). Las MAPKs son una familia de serina/treonina kinasas que se han asociado clásicamente en VSMC con procesos de contracción, migración, diferenciación, adherencia, depósito de colágeno, crecimiento y supervivencia celular (Pearson *et al.*, 2001). De las principales MAPKs, ERK1/2, p38^{mapk} y SAPK/JNK son las mejor caracterizadas (Pearson *et al.*, 2001). La activación de MAPKs en VSMC parece ser dependiente de la activación de c-Src (Touyz *et al.*, 2001). No obstante, no existen evidencias del papel de c-Src como regulador previo de la activación de MAPKs inducida por ET-1.

Los flavonoides abarcan un amplio grupo dentro de los compuestos polifenólicos, encontrándose distribuidos extensamente en las plantas y presentándose en cantidades variables en las verduras y la fruta que ingerimos como parte de nuestra dieta (Rice-Evans y Packer, 1998). El consumo diario medio estimado del ser humano de flavonoides es de 20-25 mg (flavonoles más flavonas), del que quercetina representa alrededor de un 60-75% (Hertog *et al.*, 1993a). Los efectos protectores cardiovasculares de la quercetina se han relacionado con una gama muy amplia de acciones biológicas, entre las que se incluyen la antioxidante, antiagregante plaquetaria y vasodilatadora (Rice-Evans y Packer, 1998; Duarte *et al.*, 1993a). Además, varios estudios han encontrado que el tratamiento crónico con quercetina reduce la presión arterial en modelos animales de hipertensión, tales como la rata SHR (Duarte *et al.*, 2001b), la rata deficiente en NO (tratada crónicamente con L-NAME) (Duarte *et al.*, 2002), la rata con hipertensión DOCA-sal (Galisteo *et al.*, 2004), la rata hipertensa Dahl sensible a la sal (Aoi *et al.*, 2004) y la rata hipertensa Goldblatt 2R-1C (García-Saura *et al.*, 2005). Estos efectos antihipertensivos estaban asociados a una

reducción en los marcadores plasmáticos y urinarios de estrés oxidativo, a una reducción de hipertrofia tanto cardíaca como renal y a la mejora de la función endotelial. Además, recientemente se ha demostrado que quercetina previene la disfunción endotelial, la producción de O_2^- y el aumento de expresión de la subunidad p47^{phox} inducida por Ang II en aorta de rata (Sánchez *et al.*, 2007). En el hombre, el consumo de frutas y verduras mejora la función microvascular de individuos hipertensos de manera dosis dependiente. Así, se ha establecido que por cada aumento de una porción en el consumo de frutas y verduras, se mejora en aproximadamente un 6,2 % el flujo sanguíneo en el antebrazo inducido por la acetilcolina (McCall *et al.*, 2009).

Dado al papel clave de ET-1 y del estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular, así como, los efectos protectores cardiovasculares de quercetina, los objetivos que se establecieron para la realización de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

El **primer objetivo** de este estudio será investigar los efectos de quercetina y de su principal metabolito plasmático, isorramnetina, en forma de genina, sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1 *in vitro*, y su relación con la producción vascular de O_2^- .

El **segundo objetivo** de esta Tesis Doctoral es analizar los mecanismos implicados en el aumento en la producción vascular O_2^- y la expresión de la subunidad p47^{phox} del sistema NADPH oxidasa inducido por ET-1 *in vitro*.

El **tercer objetivo** de esta Tesis Doctoral es analizar los efectos de quercetina y de isorramnetina sobre la vía de señalización inducida por ET-1 para aumentar la producción vascular O_2^- , centrándonos en la posible participación de PKC, c-Src y MAPKs.

Justification and aims.

Justification and aims.

Endothelial dysfunction, characterized by impaired endothelium-dependent vasodilation and a prothrombotic and proinflammatory state of endothelial cells, is an early and independent predictor of poor prognosis in most forms of cardiovascular disease (Endemann and Schiffrin, 2004b), including essential hypertension (Panza *et al.*, 1993a). The most characteristic pathophysiological feature of endothelial dysfunction is a diminished bioactivity of endothelium-derived NO due to reduced endothelial NO synthase (eNOS) activity and/or increased metabolism through its interaction with superoxide anion (O_2^-) produced in the vascular wall by free-radical-generating enzymes, such as nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (Cai and Harrison, 2000).

Endothelin-1 (ET-1) is a potent endothelial-derived vasoconstrictor peptide playing a crucial role in cardiovascular physiology and its alterations have been associated with most forms of cardiovascular disease. Experimental models of hypertension such as deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt or angiotensin II-infused rats, atherosclerosis and diabetes display high levels of circulating ET-1 and are associated with endothelial dysfunction (Bousette and Giaid, 2003; Cernacek *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2003a; Schiffrin, 2005). A significant body of evidence indicates that ET-1, through ETA/ETB receptor activation, increases reactive oxygen species (ROS) production in the vasculature, leading in endothelial dysfunction (Wedgwood *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003d; Loomis *et al.*, 2005).

The mechanisms involved in angiotensin II-induced vascular O_2^- production are well characterized. ROS production by angiotensin II can be separated into an acute phase involving protein kinase C (PKC), c-Src, growth factor receptors transactivation and translocation of cytosolic p47phox to the membrane (Li and Shah, 2003; Touyz *et al.*, 2003), and a sustained phase involving up-regulation of NADPH oxidase subunits

(Laplante *et al.*, 2006) which also involves PKC activation (Mollnau *et al.*, 2002; Lassegue *et al.*, 2001). In contrast, the underlying mechanisms implicated in ET-1-induced O_2^- production are controversial. ET-1 does not produce acute increases in ROS (Laplante *et al.*, 2005) and NADPH oxidase (Wedgwood *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003d; Elmarakby *et al.*, 2005), uncoupled eNOS (Loomis *et al.*, 2005) and the mitochondria (Callera *et al.*, 2006; Touyz *et al.*, 2004) have been reported as the sources of ROS in its long-term effects. As mentioned above (paragraph 2.2.a.), the major source of intracellular ROS in vascular cells is NADPH oxidase. Mechanisms linking ET-1 to the enzyme and upstream signalling molecules modulating NADPH oxidase in VSMC have not been fully elucidated.

One of the main important effectors of cell signalling by ET-1 seems to be cross-talk between G protein-coupled ETA/ETB receptors and the nonreceptor tyrosine kinase c-Src. To date, at least 14 Src-related kinases have been identified (Martin, 2001), of which the 60 kDa c-Src is the most abundantly expressed isoform in VSMC (Oda *et al.*, 1999), and seems to be involved in contraction, proliferation, growth and cytoskeletal reorganization. In addition, c-Src, as a critical proximal regulator of NADPH oxidase-driven O_2^- generation, once activated by angiotensin II contributes to the amplification of oxidative stress (Touyz *et al.*, 2003; Seshiah *et al.*, 2002). Previous studies demonstrated that c-Src is an effector of cell signaling by ET-1 in nonvascular cells (Kodama *et al.*, 2002; 2003; Mishra *et al.*, 2005; Milan *et al.*, 2006; Kovacic *et al.*, 1998) but the role of this tyrosine kinase in VSMC is still controversial. In fact, ET-1 activates the tyrosine kinase activity of c-Src increasing proliferation of rat aortic smooth muscle cells (Schieffer *et al.*, 1997). However, ET-1 did not rapidly increased c-Src phosphorylation in VSMC from mice mesenteric arteries (Yogi *et al.*, 2007). Although it is now clearly established that c-Src is an important mediator of angiotensin II effect, evidence for a direct role of c-Src in ET-1 induced NADPH oxidase-driven O_2^- production is still lacking. Moreover, mechanisms underlying c-Src regulation of NADPH oxidase after long-term ET-1 remain obscure.

Another key signalling event evoked by ET-1 receptor activation consists of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) cascade (Foschi *et al.*, 1997; Fei *et al.*, 2000; Daou *et al.*, 2004; Touyz *et al.*, 2004; Yogi *et al.*, 2007). MAPKs are a family of serine/threonine kinases which are classically associated with VSMC contraction, migration, differentiation, adhesion, collagen deposition, cell growth and survival (Pearson *et al.*, 2001). Of the major MAPKs, extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), p38 MAPK, and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinases (SAPK/JNK) are the best characterized (Pearson *et al.*, 2001). The activation of MAPKs has been reported to be primarily dependent on the c-Src in VSMC (Touyz *et al.*, 2001; Ishida *et al.*, 1998), however, there is not evidence of role c-Src like an upstream regulator of MAPKs activation induced by ET-1.

Flavonoids comprise a large group of polyphenolic compounds widely distributed in plants and present in variable amounts in dietary vegetables and fruit (Rice-Evans y Packer, 1998). The estimated average human daily intake of flavonoids is 22–23 mg (flavonols plus flavones), of which quercetin represents about 60–75% (Hertog *et al.*, 1993a). The protective effects of quercetin in cardiovascular diseases were associated with a very wide range of biological actions of flavonoids, including antioxidant, antiaggregant and vasodilator effects (Rice-Evans y Packer, 1998; Duarte *et al.*, 1993a). Moreover, several studies have found that chronic quercetin lowered blood pressure in hypertensive animal models such as the spontaneously hypertensive rat (SHR) (Duarte *et al.*, 2001b), nitric oxide (NO) deficient rats (chronically treated with L-NAME) (Duarte *et al.*, 2002), deoxycorticosterone-salt hypertensive rats (Galisteo *et al.*, 2004), Dahl salt-sensitive hypertensive rats (Aoi *et al.*, 2004) and two-kidney, oneclip Goldblatt hypertensive rats (García-Saura *et al.*, 2005). These effects were associated with a reduction in plasma and urine markers of oxidative status, cardiac hypertrophy, renal damage and improved endothelial function. Furthermore, we recently found that quercetin prevents endothelial dysfunction, O₂⁻ production, and overexpression of p47phox induced by angiotensin II in rat aorta (Sánchez *et al.*, 2007). In humans, increased fruit and vegetable consumption

improves microvascular function of subjects with hypertension in a dose-dependent manner. Like this, it is known for each 1-portion increase in reported fruit and vegetable consumption, there was a 6.2% improvement in forearm blood flow responses to intra-arterial administration of acetylcholine (McCall *et al.*, 2009).

Given the key role of ET-1 and oxidative stress in cardiovascular disease, as well as the protective effects of the dietary flavonoid quercetin in cardiovascular diseases, the aims established to carry out this Doctoral Thesis were:

The **first aim** of this study was to investigate the protective effects of the dietary flavonoid quercetin and its methylated plasma metabolite, isorhamnetin, on ET-1-induced endothelial dysfunction and also the involvement that ET-1 mediates vascular O_2^- production.

The **second aim** of this Doctoral Thesis was to analyze the mechanisms involved in increase vascular O_2^- production and up-regulation of p47^{phox} subunit induced by ET-1 *in vitro*.

The **third aim** was to evaluate the effects of quercetin and isorhamnetin in the signaling pathway induced by ET-1 to increase vascular O_2^- production and up-regulation of p47^{phox} subunit, focusing on possible involvement of PKC, c-Src and MAPKs.

Material y métodos.

Material y métodos.

1.1. Animales de experimentación.

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

Para la realización de los experimentos, las ratas fueron sacrificadas mediante la administración de una dosis letal de pentobarbital sódico (120 mg/Kg intraperitoneal). Tras el sacrificio de los animales, la aorta torácica descendiente fue cuidadosamente extraída desde el cayado aórtico hasta el diafragma y depositada en una placa Petri que contenía solución de Krebs (con una composición en mM de: NaCl 118, KCl 4,75, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1,2, CaCl₂ 2, KH₂PO₄ 1,2 y glucosa 11). Seguidamente se eliminaron los restos de tejido conjuntivo y adiposo adheridos a la aorta y ésta se dividió en segmentos de unos 3 mm de longitud. Estos anillos fueron incubados en solución de Krebs durante 2 horas en un incubador de células en ausencia o presencia de ET-1 (10 nM) y en presencia de vehículo, dimetil sulfóxido (DMSO, 0,1%), quercetina (1 µM o 10 µM), isorramnetina (1 µM o 10 µM), el inhibidor de PKC, celeritrina (1 µM), el inhibidor selectivo de c-Src, PP2 (10 µM), su análogo inactivo, PP3 (10 µM), el inhibidor de ERK1/2, PD98059 (10 µM), el inhibidor de p38^{mapk}, SB203580 (10 µM) o el inhibidor de SAPK/JNK, SP600125 (25 µM) .

En experimentos previos se comprobó que ET-1 induce disfunción endotelial a partir de las 2 horas de incubación. Las concentraciones utilizadas de quercetina e isorramnetina se encuentran dentro del rango de concentraciones plasmáticas encontradas en humanos después de la ingestión de una dosis única de quercetina administrada como compuesto puro, extracto vegetal o en alimentos y bebidas. Todos los inhibidores fueron pre-incubados durante 30 minutos antes de la adición de ET-1 a los anillos. Una vez finalizada la incubación, los anillos aórticos fueron inmediatamente usados para la medida de la producción de O₂⁻ o para las pruebas de reactividad vascular, o congelados en nitrógeno

líquido y almacenados a -80 °C para la expresión proteica por western blots o génica por PCR, o incluidos en OCT “optimal cutting temperature” (Tissue-Teck® OCT compound, Sakura) y después congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C para posteriormente llevar a cabo el análisis de la producción in situ de O₂⁻.

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

1.2. Pruebas de reactividad vascular.

Tras el periodo de incubación descrito anteriormente, los anillos aórticos se montaron en un sistema convencional de baño de órganos. Para ello se introdujeron en el lumen de dichos anillos dos alambres rígidos de acero inoxidable con forma de L, de 0,2 mm de diámetro, uno de los cuales se fijó a la pared del baño y el otro, que podía desplazarse paralelo al anterior hacia arriba y abajo, se conectó a un transductor isométrico de fuerza-desplazamiento (Letigraph 2000, Cibertec S.A., Madrid). Los baños de órganos contenían 5 ml de la solución de Krebs, mantenida a 37 °C y constantemente burbujeada con O₂ al 95% y CO₂ al 5% (gas carbógeno) para mantener un pH comprendido entre 7,3 y 7,4. Los anillos fueron sometidos a una tensión de 2 g y se dejaron estabilizar durante 60-90 minutos antes de la adición de los fármacos. Durante el periodo de estabilización la solución de Krebs fue cambiada cada 30 minutos y los anillos fueron retensionados según las necesidades para mantener la tensión final estable de 2 g.

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

Protocolos experimentales.

1.2.1. Para estudiar el posible efecto como promotora de disfunción endotelial de ET-1, se evaluó la capacidad vasodilatadora dependiente de endotelio inducida por acetilcolina. Para ello, después del periodo de estabilización, las arterias fueron estimuladas con

fenilefrina (1 μM o 0,1 μM para los anillos incubados con vehículo o ET-1, respectivamente, para obtener el mismo nivel de precontracción). Una vez conseguida una contracción estable y mantenida (aproximadamente 5 minutos) se realizó una curva concentración-respuesta de relajación mediante la adición acumulativa al baño de acetilcolina (1 nM – 100 μM).

1.2.2. Para estudiar los posibles efectos de los radicales libres, principalmente anión superóxido generado por NAD(P)H oxidasa, en la disfunción endotelial inducida por ET-1, los anillos aórticos fueron incubados con superóxido dismutasa (SOD, 100 U/ml) o con el inhibidor de NAD(P)H oxidasa, apocinina (100 μM) 30 minutos antes de la adición al baño de fenilefrina para inducir la precontracción, y posteriormente se llevó a cabo la curva concentración-respuesta de relajación a acetilcolina como en 4.2.1.

1.2.3. Para evaluar la participación del NO endotelial en la disfunción endotelial inducida por ET-1, algunos anillos aórticos fueron incubados con el inhibidor de la eNOS, N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μM), o con el sustrato sintético de BH₄ (cofactor de la eNOS), sepiapterin (100 μM) 30 minutos antes de la adición al baño de fenilefrina para inducir la precontracción, y posteriormente se llevó a cabo la curva concentración-respuesta de relajación a acetilcolina como en 4.2.1.

1.2.4. Para estudiar la respuesta contráctil a fenilefrina se realizaron curvas concentración-respuesta de contracción a fenilefrina en anillos aórticos incubados durante 30 minutos con el inhibidor de la eNOS, L-NAME (100 μM), o con el inhibidor de NAD(P)H oxidasa, apocinina (100 μM), o con el donador de BH₄ (cofactor de la eNOS), sepiapterin (100 μM). Posteriormente la fenilefrina se fue adicionando de forma acumulativa (1 nM – 10 μM). En estos experimentos las respuestas contráctiles a fenilefrina se expresaron como gramos de contracción de la respuesta inducida por fenilefrina entre miligramos de tejido seco de los anillos aórticos.

1.2.5. Para evaluar el posible papel de quercetina, isorramnetina o de la inhibición de la PKC en una mejora de la disfunción endotelial inducida por ET-1, incubamos durante 2 horas, en las condiciones ya descritas, los anillos aórticos con el endotelio intacto más ET-1 (10 nM), o ET-1 (10 nM) más quercetina (1 μ M o 10 μ M), o ET-1 (10 nM) más isorramnetina (1 μ M o 10 μ M) o ET-1 (10 nM) más celeritrina (1 μ M), para posteriormente montarlos en baños de órganos como se ha descrito y llevar a cabo la correspondiente curva concentración-respuesta de contracción a fenilefrina (1 nM – 10 μ M) y curva concentración-respuesta de relajación a acetilcolina (1 nM – 100 μ M).

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

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

Anillos aórticos (de 2 - 3 mm), previamente incubados como se menciona anteriormente (apartado 1.1.), fueron incluidos en OCT, congelados a -80 °C y después cortados en secciones de 10 μ m de espesor en un criostato (Microm international Modelo HM500 OM). Las secciones fueron incubadas en cámara húmeda durante 30 minutos en solución tamponada de HEPES con una composición en mM de: NaCl 130, KCl 5, $MgCl_2$ 1,2, glucosa 10 y HEPES 10, (pH 7,3 ajustado con NaOH) a 37 °C. Después las secciones fueron de nuevo incubadas 30 minutos en oscuridad en solución tamponada de HEPES conteniendo DHE (10 μ M). Luego las preparaciones fueron coincubadas con el marcador nuclear dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (0,3 μ M) durante 5 minutos a 37 °C aún en oscuridad, posteriormente fueron lavadas con 1 ml de solución tamponada de HEPES dos veces y selladas con cubreobjetos.

Algunas secciones de los anillos aórticos incubados en vehículo (condiciones control), fueron incubados durante 30 minutos con el captador de O_2^- intracelular, Tiron (10 μ M), antes de la incubación con DHE.

Cuatro secciones de cada preparación fueron examinadas en un microscopio de fluorescencia (Leica DM IRB, Wetzlar, Alemania) usando un objetivo de 40x con los siguientes pares de filtros de excitación/emisión: BP 340-380 nm/LP 425 nm de longitud de onda para visualizar la fluorescencia azul del DAPI, BP 450-490 nm/LP 515 nm para visualizar la autofluorescencia verde de la elastina y BP 545/30 nm/ BP 610/75 nm para visualizar la fluorescencia roja del etidio. Las secciones fueron fotografiadas con una cámara digital a color Leica DC300F, y las imágenes se grabaron para posterior análisis. Las condiciones de microscopio y cámara fueron mantenidas constantes para todas las preparaciones.

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

1.4. Medida de la producción vascular de O_2^- .

La producción de O_2^- en anillos aórticos intactos se cuantificó mediante quimioluminiscencia con lucigenina, como se describió previamente por Ohara y cols (1993). Para ello, anillos aórticos (de 2 - 3 mm) fueron incubados durante 2 horas a 37 °C en una solución salina fisiológica (pH 7,4) de la siguiente composición (en mM): NaCl 119, HEPES 20, KCl 4,6, MgSO₄ 1, Na₂HPO₄ 0,15, KH₂PO₄ 0,4, NaHCO₃ 1, CaCl₂ 1,2 y glucosa 5,5. Las incubaciones fueron realizadas en presencia de ET-1 (10 nM) o vehículo. Algunos anillos fueron co-incubados durante 2 horas con quercetina (1 μM o 10 μM) o su principal metabolito metilado, isoramnetina (1 μM o 10 μM). En otro grupo de experimentos, para evaluar la especificidad del ensayo, los anillos fueron co-incubados durante los últimos 30 minutos de la incubación con ET-1 o vehículo con SOD (100U/ml) o con el inhibidor de flavín proteínas, DPI (10 μM).

Los anillos fueron posteriormente colocados para la medida en tubos que contenían solución salina fisiológica, tal y como se incubaron, y la lucigenina fue inyectada automáticamente a una concentración final de 5 μM. La producción aórtica de O_2^- fue

estimulada mediante la adición de NADPH (100 μM). Los cambios en la liberación de O_2^- se determinaron midiendo la quimioluminiscencia de la lucigenina mediante un luminómetro (Lumat LB 9507, Berthold, Alemania) durante 200 segundos en intervalos de 5 segundos. Luego los anillos fueron desecados y se determinó su peso seco. La producción de O_2^- se expresó como porcentaje de unidades relativas de luminiscencia (RLU)/minuto/mg de tejido seco respecto a las condiciones control.

Para caracterizar la participación de la eNOS “desacoplada” en la producción vascular de O_2^- inducida por ET-1, se cuantificó, mediante quimioluminiscencia con lucigenina, la producción de O_2^- en anillos aórticos intactos estimulada mediante la adición del ionóforo de calcio, A23187 (10 μM). Para ello, anillos aórticos con el endotelio intacto fueron incubados durante 2 horas a 37 °C en solución salina fisiológica (pH 7,4). Las incubaciones se realizaron en presencia de vehículo, ET-1 (10 nM), ET-1 más L-NAME (100 μM), ET-1 más apocinina (300 μM), ET-1 más sepiapterin (100 μM), ET-1 más quercetina (10 μM), o ET-1 más isoramnetina (10 μM). Además, el endotelio de algunos anillos aórticos fue eliminado mecánicamente y posteriormente fueron incubados durante 2 horas con ET-1 (10 nM). Posteriormente, los anillos fueron colocados para la medida en tubos que contenían solución salina fisiológica y la lucigenina fue inyectada automáticamente a una concentración final de 5 μM . En este caso, la producción aórtica de O_2^- fue estimulada mediante la adición del ionóforo de calcio, A23187 (10 μM). Los cambios en la liberación de O_2^- se determinaron midiendo la luminiscencia de la lucigenina mediante un luminómetro.

Para analizar la participación de la PKC en la producción vascular de O_2^- inducida por ET-1, algunos anillos aórticos fueron preincubados durante 30 minutos con el inhibidor de la PKC, celeritrina (1 μM) antes de la incubación con ET-1 (10 nM) durante 2 horas. Además, para analizar el efecto de los flavonoides en la producción vascular de O_2^- mediada por activación de PKC, algunos anillos aórticos fueron incubados con el éster de forbol, 12-miristato 13-acetato forbol (PMA, *phorbol 12-myristate 13-acetate*) (1 μM), durante 30 minutos

en presencia o ausencia de quercetina (10 μ M), isorramnetina (10 μ M) o celeritrina (1 μ M), antes de la inyección de lucigenina. La producción de O_2^- fue medida en presencia de NADPH (100 μ M).

1.5. Expresión vascular mediante RT-PCR y Western Blot.

1.5.1. Para analizar la expresión génica de p47^{phox}, p22^{phox} y c-Src mediante el análisis por transcriptasa inversa-reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR, *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*), el RNA total fue extraído mediante homogenización de los anillos aórticos y posteriormente convertido en DNA complementario (cDNA, *complementary DNA*) por métodos estándar. La reacción de la polimerasa en cadena fue realizada con un termociclador (Techne, Cambridge, U.K.). La desnaturalización inicial fue realizada a 95 °C durante 3 minutos, seguida por 25-32 ciclos de amplificación. Cada ciclo de amplificación consta de una fase de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, una fase de unión del cebador a la cadena de cDNA a 60 °C para el cebador de p47^{phox} o 55 °C para el cebador de p22^{phox} o 58 °C para el cebador de c-Src durante 45 segundos, y una fase amplificación del gen a 72 °C durante 1 minuto. Al finalizar los ciclos de amplificación, la temperatura es mantenida a 72 °C durante 10 minutos para permitir la hibridación de los productos amplificados. Finalmente, los productos amplificados por la RT-PCR fueron separados a través de un gel de agarosa al 1,5%, y las bandas fueron visualizadas con bromuro de etidio y cuantificadas mediante análisis densitométrico de las imágenes escaneadas usando el software Scion Image-Release Beta 4.02 (<http://www.scioncorp.com>).

La secuencia de los cebadores para p47^{phox}, p22^{phox} y c-Src fueron seleccionadas de acuerdo con las secuencias publicadas en Gen-Bank y son las siguientes: p47^{phox} (191 pares de bases) sense, 5'-CCCAGCGACAGATTAGAAGC-3' y antisense, 5'-TGGATTGTCCTTTGAGTCAGG-3'; p22^{phox} (220 pares de bases) sense, 5'-GCCGGTGTGGACAGAAGTACC-3' y antisense, 5'-CTTGGGTTTAGGCTCAATGG-3'; c-Src (163 pares de bases) sense, 5'-CATCCCAGCCAACTATGTCC-3' y antisense, 5'-

CAGGGTAGTTGGTGCCTTCC-3'. GADPH fue utilizado como control interno para la coamplificación. Las señales fueron expresadas en relación a la densidad de banda para GADPH de cada muestra.

1.5.2. Para analizar la expresión proteica de p47^{phox} y p22^{phox} mediante el análisis por western blot, los anillos aórticos de los diferentes grupos, conservados a -80 °C, fueron homogeneizados en frío mediante un potter de cristal. Para la determinación de la subunidad p22^{phox} de la enzima NAD(P)H oxidasa, la composición del tampón de homogeneización utilizado (pH 7.5) fue: HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, MgCl₂ 2,5 mM, β-glicerolfosfato 40 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 1 mM, aprotinina 20 µg/ml y leupeptina 20 µg/ml. Para la determinación de la subunidad p47^{phox} de la enzima NAD(P)H oxidasa, la composición del tampón de homogeneización (pH 8) fue: HEPES 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, aprotinina 40 µg/ml, leupeptina 4 µg/ml, N-α-para-tosil-L-lisina clorometilamina 4 µg/ml, NaF 5 mM, Na₂MoO₄ 10 mM, Na₃VO₄ 1 mM, PMSF 0,5 mM, ácido okadaico 10 nM e igepal al 1%. La expresión proteica de p47^{phox} y p22^{phox} fue medida en el sobrenadante de sus homogenados aórticos tras 30 minutos de centrifugación a 13000 r.p.m. a 4 °C.

Los western blots se llevaron a cabo con 30 µg de proteína para p22^{phox} y 50 µg de proteína para p47^{phox}. La cantidad de proteína por muestra se determinó mediante la técnica de Bradford (1976). Las proteínas fueron entonces suspendidas en tampón de carga y desnaturalizadas mediante calor durante 5 minutos a 95 °C.

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de dodecilsulfato sódico (SDS, *Sodium Dodecyl Sulfate*)-poliacrilamida, al 15% para p22^{phox} y 12% para 47^{phox}, y se realizó en un sistema minigel (Bio-Raid Laboratorios, Hercules, California, EE.UU.). Después, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y se incubaron con tampón de bloqueo (tampón Tris salino tamponado al 0.1% de Tween 20 (TBS-T) con leche desnatada en polvo al 5%) durante 2 horas. Luego las membranas fueron lavadas durante 15 minutos con TBS-T, cambiando la solución cada 5 minutos. Posteriormente,

fueron incubadas con anticuerpos primarios policlonales de cabra anti-p22^{phox} (dilución 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE.UU.), o de conejo anti-p47^{phox} (dilución 1:1000, Upstate Cell Signaling) toda una noche a 4 °C. Las membranas se lavaron de nuevo durante 15 minutos con TBS-T cambiando cada 5 minutos la solución, y se incubaron con anticuerpo secundario caprino anti-cabra conjugado con peroxidasa (1:2000, Santa Cruz Biotechnology) para determinar p22^{phox}, y con anticuerpo secundario caprino anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:2000, Sigma-Aldrich) para p47^{phox}, diluidos todos ellos en TBS-T al 5% de leche en polvo desnatada. Todas estas incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras lavar de nuevo las membranas de la forma arriba descrita, la unión del anticuerpo a la proteína se detectó mediante su incubación durante un minuto con un sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) y una película auto radiográfica para ver la quimioluminiscencia. Las películas se escanearon y se realizó en estas imágenes un análisis densitométrico usando el software Scion Image-Release Beta 4.02. (<http://www.scioncorp.com>). Las membranas fueron recicladas para determinar la expresión de la α -actina de cada muestra. Se calculó la relación entre la intensidad de banda para p22^{phox} o p47^{phox} y su correspondiente α -actina de cada muestra. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de dicha relación de cada grupo con respecto al grupo control.

1.5.3. Para evaluar la participación de la tirosina kinasa Src en la vía de señalización implicada en el aumento de la producción vascular de O₂⁻ inducida por ET-1, determinamos la expresión proteica de fosfo-cortactin, fosfo-Src y Src. Cortactin es el sustrato de Src y es fosforilado cuando Src es activa, por lo que su grado de fosforilación nos puede indicar la actividad de Src. Igualmente, Src requiere estar fosforilada para ser activa, por lo que su grado de fosforilación en relación con la cantidad de Src total nos puede indicar la activación de Src. Para analizar la expresión proteica de fosfo-cortactin, fosfo-Src y Src mediante el análisis por western blot, los anillos aórticos de los diferentes grupos, conservados a -80 °C, fueron homogeneizados en frío mediante un potter de cristal. La composición del tampón de homogeneización utilizado (pH 7.4) fue: Tris-HCl 100 mM,

NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 20 mM, NaF 1 mM, Na_3VO_4 2 mM, SDS 0,1%, deoxicolato sódico 0,5%, Triton X-100 1%, glicerol 10%, PMSF 1 mM, aprotinina 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y pepstatina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La expresión proteica de fosfo-cortactin, fosfo-Src y Src fue medida en el sobrenadante de sus homogenados aórticos tras 30 minutos de centrifugación a 13000 r.p.m. a 4 °C.

Los western blots se llevaron a cabo con 30 μg de proteína. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Se siguieron los mismos pasos según el método descrito anteriormente (apartado 4.5.2.). Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-fosfo-Src (Tyr416) (dilución 1:1000, Cell Signaling Technology), o anti-fosfo-cortactin (pY466) (dilución 1:1000, Biosource), o con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-Src (dilución 1:1000, Biosource), toda una noche a 4 °C. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo secundario caprino anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:2000, Sigma-Aldrich) para determinar fosfo-cortactin o fosfo-Src, y con anticuerpo secundario caprino anti-ratón conjugado con peroxidasa (1:2000, Sigma-Aldrich) para Src. La detección y la medida de las bandas se realizó de manera similar a la descrita en el apartado anterior (apartado 4.5.2.). Las membranas fueron recicladas para determinar la expresión de la α -actina de cada muestra. Se calculó la relación entre la intensidad de banda para fosfo-cortactin y su correspondiente α -actina de cada muestra y la relación entre la intensidad de banda para fosfo-Src y su correspondiente Src de cada muestra. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de dicha relación de cada grupo con respecto al grupo control.

1.5.4. Para evaluar la participación de las principales MAPKs en la vía de señalización implicada en el aumento de la producción vascular de O_2^- inducida por ET-1, determinamos la expresión proteica de fosfo-ERK1/2 y ERK1/2; así como, la expresión proteica de la subunidad p47^{phox} en anillos aórticos incubados con ET-1 (10nM) en presencia o ausencia del inhibidor de ERK1/2, PD98059 (10 μM) pre-incubado 30 minutos antes de la adición de ET-1. Para analizar la expresión proteica de fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 mediante el análisis por western blot, los anillos aórticos de los diferentes grupos, conservados a -80 °C,

fueron homogeneizados en frío mediante un potter de cristal. La composición del tampón de homogeneización utilizado (pH 7.5) fue: HEPES 20 mM, EGTA 10 mM, β -glicerol fosfato 40 mM, $MgCl_2$ 2,5 mM, DTT 1 mM, aprotinina 40 μ g/ml, leupeptina 4 μ g/ml, iodometamida 1 mM, Na_3VO_4 2 mM, PMSF 0,5 mM e igeal al 1%. La expresión proteica de fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 fue medida en el sobrenadante de sus homogenados aórticos tras 30 minutos de centrifugación a 13000 r.p.m. a 4 °C.

Los western blots se llevaron a cabo con 25 μ g de proteína. La electroforesis se realizó en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Se siguieron los mismos pasos según el método descrito anteriormente (apartado 4.5.2.). Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario policlonal de conejo ERK1/2 (dilución 1:1000, Cell Signaling Technology), o con el anticuerpo primario monoclonal de ratón fosfo-ERK1/2 (dilución 1:1000, Sigma-Aldrich), toda una noche a 4 °C. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo secundario caprino anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:2000, Sigma-Aldrich) para determinar ERK1/2, y con anticuerpo secundario caprino anti-ratón conjugado con peroxidasa (1:2000, Sigma-Aldrich) para determinar fosfo-ERK1/2. De nuevo, la detección y la medida de las bandas se realizó de manera similar a la descrita en el apartado anterior (apartado 4.5.2.). Las membranas fueron recicladas para determinar la expresión de la α -actina de cada muestra. Se calculó la relación entre la intensidad de banda para p47^{phox} y su correspondiente α -actina de cada muestra y la relación entre la intensidad de banda para fosfo-ERK1/2 y su correspondiente ERK1/2 de cada muestra. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de dicha relación de cada grupo con respecto al grupo control.

1.6. Determinación de la actividad PKC vascular.

Para determinar la actividad PKC vascular, los anillos aórticos fueron incubados durante 30 minutos con vehículo, ET-1 (10 nM) o PMA (1 μ M) en presencia o ausencia de quercetina (10 μ M), isorramnetina (10 μ M) o celeritrina (1 μ M). Después, los anillos fueron homogenizados en frío mediante un potter de cristal y posteriormente sonicados tres veces durante 10 segundos y centrifugados a 2000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C. La actividad PKC fue medida en el sobrenadante de los homogenados aórticos mediante un ensayo colorimétrico por un kit de ELISA suministrado por Calbiochem®. Para la medida de la actividad PKC se utilizaron 6 μ g de proteína de cada muestra, que fueron mezclados e incubados a 25 °C durante 5 minutos con el tampón de reacción dado por el kit y cuya composición es (en mM): Tris-HCl 25, pH 7.0, MgCl₂ 0,3, ATP 0,2, CaCl₂ 2, y fosfatidilserina 50 μ g/ml. Para realizar el control negativo, el CaCl₂ no fue adicionado al tampón de reacción, y la fosfatidilserina fue reemplazada por EGTA 20 mM. A continuación, las muestras fueron transferidas a una placa de 96 pocillos, cada uno de los cuales poseía el pseudosustrato de la reacción, dada por el kit y se incuban a 25 °C durante 20 minutos. La PKC presente en las muestras catalizará la fosforilación del sustrato en restos de serina. Posteriormente se para la reacción, se lava la placa con tampón de lavado y se adiciona un anticuerpo marcado con biotina que, al unirse al sustrato fosforilado por la PKC presente en las muestras, quedará fijado a la placa. Luego se lava la placa con tampón de lavado y se adiciona un anticuerpo secundario unido a peroxidasa, específico para el anticuerpo primario, que se incuba a 25 °C durante 1 hora. Finalmente, se lava la placa, se adiciona un tampón que contiene orto-fenilenediamina más peróxido de hidrógeno y se deja incubar a 25 °C durante 10 minutos. La lectura de la placa se realiza a una longitud de onda de 492 nm.

Los resultados son expresados como porcentaje de la densidad óptica obtenida respecto a los valores obtenidos para los anillos control.

1.7. Reactivos.

Todos los productos y reactivos fueron obtenidos de Sigma-aldrich chemie, Steinheim, Alemania, excepto DAPI, PP3 y los inhibidores de MAPKs (PD98059, SB 203580 y SP600125) de Calbiochem, Darmstadt, Alemania; PP2 de Biomol International, Madrid, España; isorramnetina de Extrasynthese, Genay, Francia; el anticuerpo primario policlonal de cabra anti-p22^{phox} de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE.UU.; el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-p47^{phox} de Upstate Cell Signaling, Nueva York, EE.UU.; el anticuerpo primario policlonal de conejo fosfoespecífico para cortactin (pY466) y el anticuerpo primario monoclonal de ratón para Src de BioSource Europa, Nivelles, Bélgica; el anticuerpo primario policlonal de conejo fosfoespecífico para fosfo-Src (Tyr416) y el anticuerpo primario policlonal de conejo ERK1/2 de Cell Signaling Technology, Danvers, EE.UU.

Quercetina, isorramnetina, PMA, celeritrina, PP2, PP3 y los inhibidores de MAPKs fueron inicialmente disueltos en DMSO y todos los demás fármacos y posteriores diluciones en agua destilada.

1.8. Análisis estadístico.

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

Las curvas concentración-respuesta fueron ajustadas a la ecuación: $E = E_{\max} / (1 + 10^{-k * ([\text{fármaco}] - \text{pD}_2))}$, donde E_{\max} es el efecto máximo, *k* es un factor que representa la pendiente de la curva y pD_2 es la concentración del fármaco que exhibe el 50% del E_{\max} expresado como logaritmo molar negativo.

Resultados.

Resultados.

1. Efecto de quercetina e isoramnetina sobre la disfunción endotelial inducida por endotelina-1 *in vitro*.

1.1. Disfunción endotelial.

La incubación de los anillos aórticos en solución de Krebs durante 2 horas en ausencia de ET-1 no produce cambios significativos en la respuesta vasodilatadora a Ach ni en la respuesta contráctil a Phe. En cambio, la incubación de los anillos aórticos con ET-1 durante 2 horas induce el desarrollo de disfunción endotelial, como indica la reducción en la respuesta vasodilatadora a Ach (Fig. 11 A) y el incremento en la respuesta contráctil a Phe (Fig. 11 B) (Tabla 1).

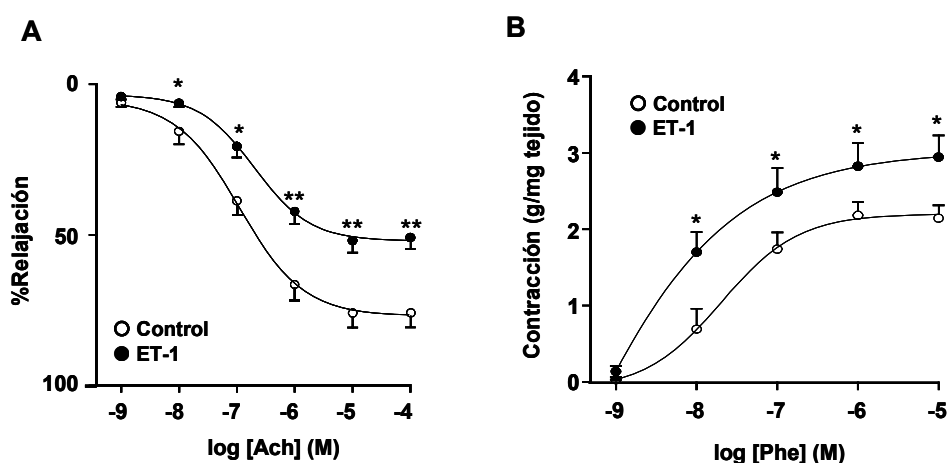


Figura 11. Efectos de endotelina-1 (ET-1) sobre la función vascular. Anillos aórticos con endotelio de ratas Wistar fueron incubados durante 2 horas en presencia o ausencia de ET-1 (10 nM). (A) Curva concentración-respuesta relajante a acetilcolina (ACh) en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina (Phe). (B) Curva concentración-respuesta contráctil a Phe. Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm el error estándar de la media (SEM), $n=8$. * $P < 0,05$ vs anillos control, ** $P < 0,01$ vs anillos control.

Tabla 1. Respuestas contráctiles a fenilefrina y valores de $-\log DE_{50}$ y E_{max} para relajaciones inducidas por acetilcolina (ACh) en anillos aórticos incubados con ET-1 (10 nM) durante 2 horas calculados a partir de los datos de la Figura 1.

Muestra	n	Contracción a Phe (mg)	Relajación a Ach	
			E _{max} . (%)	-log DE ₅₀
Control	8	1963,2 ± 85,5	80,9 ± 3,0	7,61±0,09
ET-1	8	2123,9 ± 148,4	45,4 ± 4,3 *	7,33±0,12

Los valores son las medias ± error estándar medio. * $p < 0,05$ vs. anillos aórticos control.

La co-incubación de los anillos con los flavonoides quercetina e isoramnetina (1 μ M y 10 μ M) durante 2 horas previene la disfunción endotelial inducida por ET-1, como se demuestra al aumentar la respuesta vasodilatadora a Ach (Fig. 12 A y B, respectivamente) y al disminuir la respuesta contráctil a Phe (Fig. 12 C) (Tabla 2).

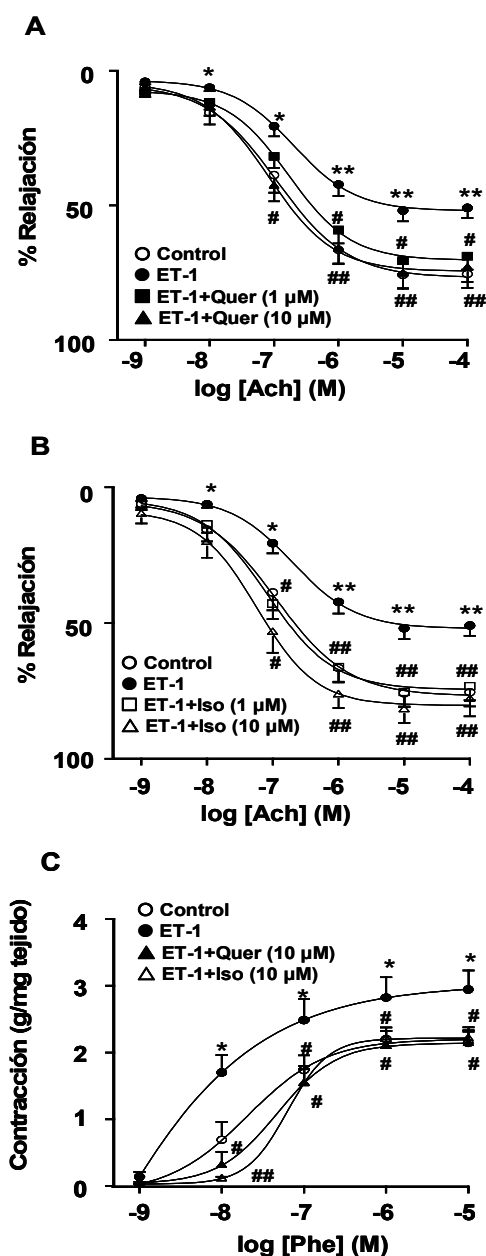


Figura 12. Efectos de quercetina (*Quer*) e isorramnetina (*Iso*) sobre la disfunción endotelial inducida por endotelina-1 (ET-1). Anillos aórticos con endotelio de ratas Wistar fueron incubados durante 2 horas con vehículo DMSO al 0,1% o quercetina (1 μM o 10 μM) o isorramnetina (1 μM o 10 μM) en presencia o en ausencia de ET-1 (10 nM). (A y B) Curva de relajación concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina (Phe). (C) Curva de contracción concentración-respuesta a Phe. Los resultados se expresaron como la media aritmética ± SEM, n=5-9. * P<0,05 vs anillos control, ** P<0,01 vs anillos control, # P<0,05 vs ET-1 sola y ## P<0,01 vs ET-1 sola.

Tabla 2. Respuestas contráctiles a fenilefrina y valores de $-\log DE_{50}$ y E_{max} para relajaciones inducidas por acetilcolina en anillos aórticos incubados con quercetina (1 μ M o 10 μ M) o isorramnetina (1 μ M o 10 μ M) en presencia o en ausencia de ET-1 (10 nM) durante 2 horas calculados a partir de los datos de la Figura 2.

Muestra	n	Contracción a Phe (mg)	Relajación a Ach	
			E _{max} . (%)	$-\log DE_{50}$
Control	7	2774,5 ± 332,2	77,1 ± 4,7	7,01±0,09
ET-1	7	2859,6 ± 387,8	44,3 ± 8,9 *	6,72±0,12
ET-1+Quer 1 μ M	7	2355,3 ± 168,7	68,9 ± 5,0 #	7,03±0,10
ET-1+Quer 10 μ M	7	2223,3 ± 230,7	73,1 ± 8,9 #	7,04±0,12
ET-1+Iso 1 μ M	7	2362,1 ± 170,8	62,7 ± 4,2 #	7,14±0,08
ET-1+Iso 10 μ M	7	2295,2 ± 254,9	80,5 ± 7,8 #	7,09±0,11

Los valores son las medias \pm error estándar medio. * $p < 0,01$ vs. anillos aórticos control, # $p < 0,01$ vs. anillos aórticos incubados con ET-1.

La reducción en la respuesta vasodilatadora a Ach inducida por ET-1 es mejorada por SOD (Fig. 13 A) y totalmente restaurada por apocinina, un inhibidor de la NADPH oxidasa (Fig. 13 B). Apocinina también reduce el incremento en la respuesta contráctil a Phe inducido por ET-1 (Fig. 13 C). En cambio, sepiapterin, sustrato sintético de la tetrahidrobiopterina (BH₄), disminuye la respuesta contráctil a Phe (Fig. 13 C), pero no mejora de forma significativa la respuesta vasodilatadora a Ach inducida por ET-1 (Fig. 13 B). En presencia de L-NAME, inhibidor de la eNOS, la respuesta vasodilatadora a Ach es suprimida tanto en condiciones control (datos no mostrados) como en presencia de ET-1 (Fig. 13 B), mientras que la respuesta contráctil a Phe se vio aumentada (Fig. 13 C).

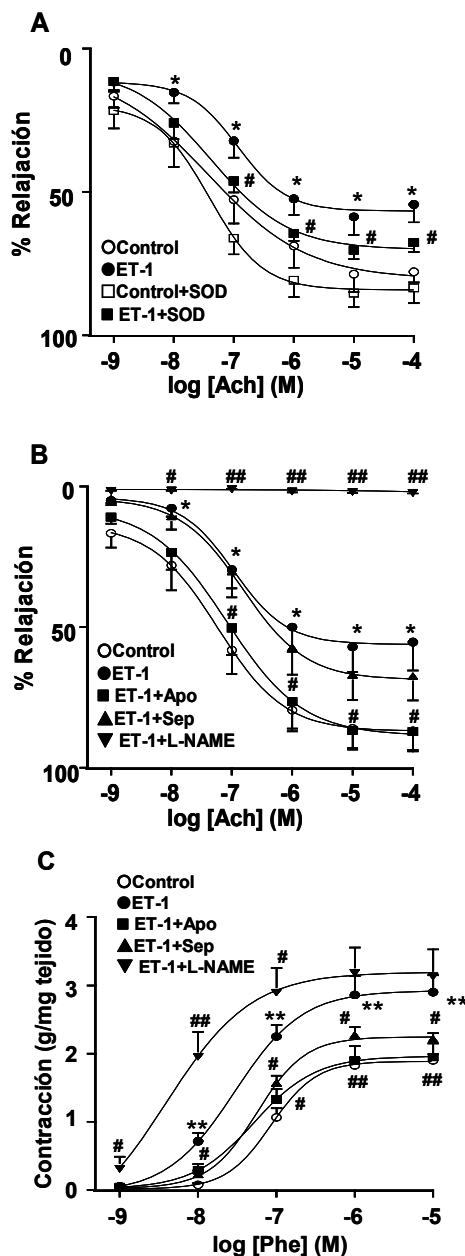


Figura 13. Participación de los radicales superóxido (O_2^-) en la disfunción endotelial inducida por endotelina-1 (ET-1). Anillos aórticos con endotelio de ratas Wistar fueron incubados durante 2 horas en presencia o en ausencia de ET-1 (10 nM). Antes de la adición de fenilefrina (Phe), algunos anillos se incubaron con superóxido dismutasa (SOD, 100 U/ml), apocinina (Apo, 100 μ M), N^{ω} -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M) o sepiapterin (Sep, 100 μ M) durante 30 minutos en el baño de órganos. (A y B) Curva concentración-respuesta relajante a acetilcolina (Ach) en anillos aórticos precontraídos con Phe. (C) Curva concentración-respuesta contráctil a Phe. Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm SEM, $n=5-9$. * $P < 0,05$ vs anillos control, ** $P < 0,01$ vs anillos control, # $P < 0,05$ vs ET-1 sola y ## $P < 0,01$ vs ET-1 sola.

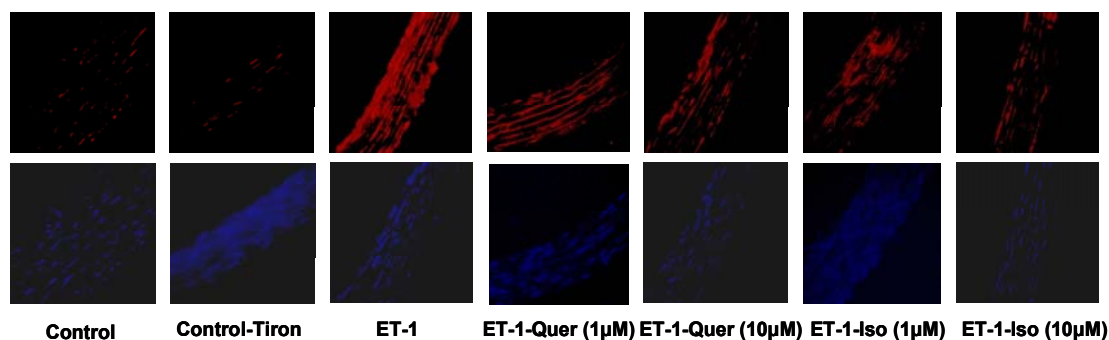
Por otro lado, determinamos si el estiramiento de los anillos aórticos en el baño de órganos puede modificar los efectos de la ET-1 en la disfunción endotelial, para ello, en otro grupo de experimentos, los anillos fueron montados en los baños de órganos donde posteriormente fueron incubados en presencia o ausencia de ET-1 durante 2 horas. Pasado el tiempo de incubación, la ET-1 fue eliminada del medio. Bajo estas condiciones experimentales más fisiológicas, se estudio la respuesta vasodilatadora a Ach en anillos pre-contráidos con Phe, observándose como la ET-1 disminuye la respuesta vasodilatadora a Ach con respecto al grupo control (efecto máximo en %: $45,1 \pm 3,7$, $n=9$; $61,6 \pm 3,9$, $n=9$, respectivamente, $P < 0,05$).

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

Para caracterizar la producción y localización de O_2^- en la pared vascular inducida por ET-1, se midió la fluorescencia roja a etidio en cortes histológicos de anillos aórticos incubados con DHE, el cual se convierte en etidio al ser oxidado por los radicales O_2^- . La fluorescencia roja a etidio es suprimida por la incubación de los cortes histológicos con Tiron, un “*scavenger*” intracelular de radicales O_2^- . Se observa que la producción de O_2^- tiene lugar en toda la pared vascular (adventicia, media y células endoteliales) (Fig. 14 A). La fluorescencia a etidio es cuantificada y los resultados normalizados con la fluorescencia azul del marcador nuclear DAPI (Fig. 14 B).

La incubación de los anillos con ET-1 10nM durante 2 horas origina un aumento en la producción de radicales O_2^- que se localiza en toda la pared vascular. Tanto quercetina como isorramnetina a $1\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$ previenen el incremento en la fluorescencia roja a etidio inducido por ET-1 (Fig. 14 A y B).

A



B

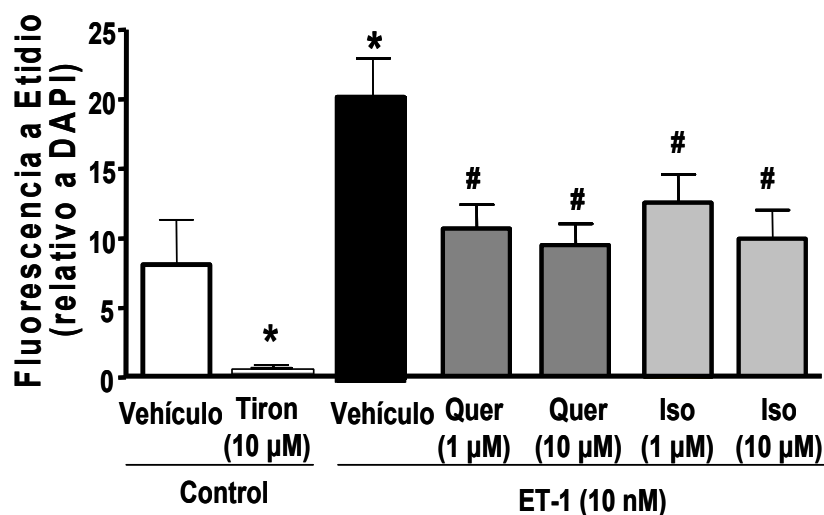


Figura 14. Efectos de quercetina (Quer) e isorramnetina (Iso) sobre la producción vascular de radicales superóxido (O_2) inducida por endotelina-1 (ET-1), medida mediante fluorescencia con dihidroetidio (DHE). (A) Las imágenes de arriba muestran los cortes histológicos de los anillos aórticos incubados con DHE, que emite fluorescencia roja cuando es oxidado a etidio por O_2 . Las imágenes de abajo muestran los mismos cortes histológicos de los anillos aórticos incubados con el marcador nuclear dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que emite fluorescencia azul al unirse a restos de adenina (B) Valores de la fluorescencia roja a etidio normalizados respecto a la fluorescencia azul del DAPI. El vehículo fue DMSO al 0,1%. Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm SEM, $n=5$. * $P < 0,05$ vs anillos control y # $P < 0,05$ vs ET-1 sola.

1.3. Efectos en la producción vascular de O_2^- .

La incubación con ET-1 (10 nM) durante 2 horas induce un incremento en la producción vascular de O_2^- , medido mediante quimioluminiscencia con lucigenina, en anillos aórticos estimulados con NADPH (100 μ M). Este incremento en la producción de O_2^- inducido por ET-1 es parcialmente suprimido por la adición de SOD (100U/ml) y totalmente suprimido por la adición del inhibidor de flavín proteínas, difeniléniodonio (DPI *diphenyleneiodonium*, 10 μ M), lo cual nos indica la implicación de radicales O_2^- producidos por flavín proteínas, tales como la NAD(P)H oxidasa o la eNOS (Fig. 15 A). La co-incubación con quercetina o isorramnetina (1 o 10 μ M) reduce significativamente el incremento en la producción vascular de O_2^- inducido por ET-1, no presentando efecto en los anillos incubados en condiciones control (Fig. 15 B y C, respectivamente).

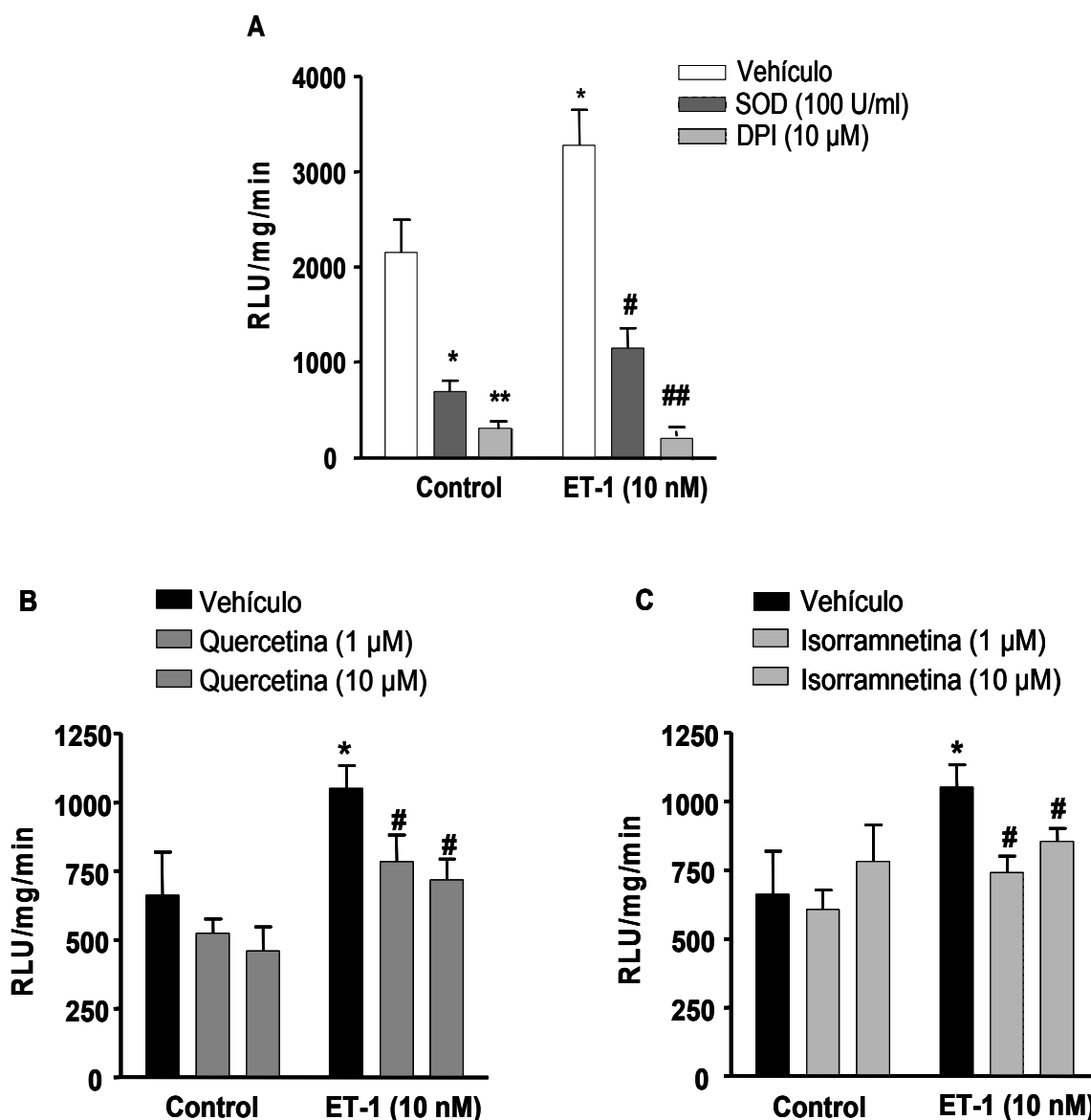


Figura 15. Efectos de endotelina-1 (ET-1) sobre la producción vascular de radicales superóxido (O_2^-) medida mediante quimioluminiscencia con lucigenina. Anillos aórticos con endotelio de ratas Wistar fueron incubados durante 2 horas en presencia o en ausencia de ET-1 (10 nM). (A) Durante los últimos 30 minutos de incubación, algunos anillos se incubaron con superóxido dismutasa (SOD, 100 U/ml) o con el inhibidor de flavín proteínas, difeniléniodonio (DPI, 10 μM). (B y C) Algunos anillos fueron co-incubados durante 2 horas con vehículo (DMSO, 0,1%) o quercetina (1 μM o 10 μM) o isorramnetina (1 μM o 10 μM) en presencia o en ausencia de ET-1 (10 nM). La producción de O_2^- fue estimulada por la adición de NADPH (100 μM). Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm SEM, n=6. * $P < 0,05$ vs anillos control, ** $P < 0,001$ vs anillos control, # $P < 0,05$ vs ET-1 sola y ### $P < 0,001$ vs ET-1 sola.

Resultados

Para determinar el papel de la eNOS en la producción vascular de O_2^- inducida por ET-1, también medimos, mediante quimioluminiscencia con lucigenina, la producción de O_2^- en anillos estimulados con el ionóforo de calcio, A23187 ($10 \mu\text{M}$). En este caso, la incubación con ET-1 (10 nM) durante 2 horas también induce un incremento en la producción vascular de O_2^- . Este incremento en la producción de O_2^- inducido por ET-1 es inhibido en anillos sin endotelio y por la co-incubación con L-NAME, apocinina o sepiapterin (Fig. 16 A), y los flavonoides quercetina e isorramnetina ($10\mu\text{M}$) (Fig. 16 A y B, respectivamente).

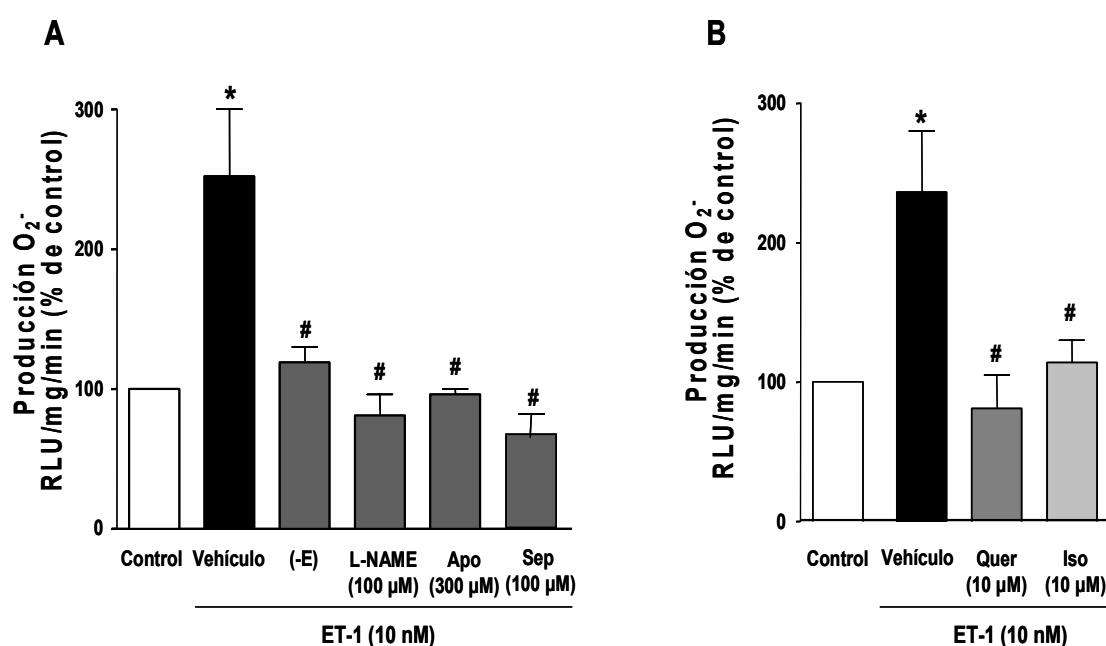


Figura 16. Efectos de endotelina-1 (ET-1) sobre la producción vascular de radicales superóxido (O_2^-) estimulada por el ionóforo de calcio, A23187 ($10 \mu\text{M}$), medida mediante quimioluminiscencia con lucigenina. Anillos aórticos con endotelio de ratas Wistar fueron incubados durante 2 horas en presencia o en ausencia de ET-1 (10 nM). (A) Papel del endotelio. Algunos anillos se co-incubaron durante 2 horas con apocinina (Apo, $300 \mu\text{M}$), L-NAME ($100 \mu\text{M}$) o sepiapterin (Sep, $100 \mu\text{M}$), o bien, se les eliminó mecánicamente el endotelio (-E) después de la incubación con ET-1. (B) Algunos anillos fueron co-incubados durante 2 horas con vehículo (DMSO, $0,1\%$) o quercetina ($10 \mu\text{M}$) o isorramnetina ($10 \mu\text{M}$) en presencia o ausencia de ET-1 (10 nM). Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm SEM, $n=5-6$. * $P < 0,05$ vs anillos control y # $P < 0,05$ vs ET-1 sola.

1.4. Efectos en la expresión de las subunidades p47^{phox} y p22^{phox} del sistema NAD(P)H oxidasa.

La incubación de los anillos aórticos con ET-1 durante 2 horas induce un aumento en la expresión, tanto génica como proteica, de p47^{phox} (Fig. 17 A y C) sin afectar a la expresión de p22^{phox} (Fig. 17 B y D), medida por RT-PCR y western blot, respectivamente. La co-incubación con quercetina o isorramnetina (1μM y 10μM), previene el aumento de la expresión de p47^{phox} inducido por ET-1 (Fig. 17 A y C).

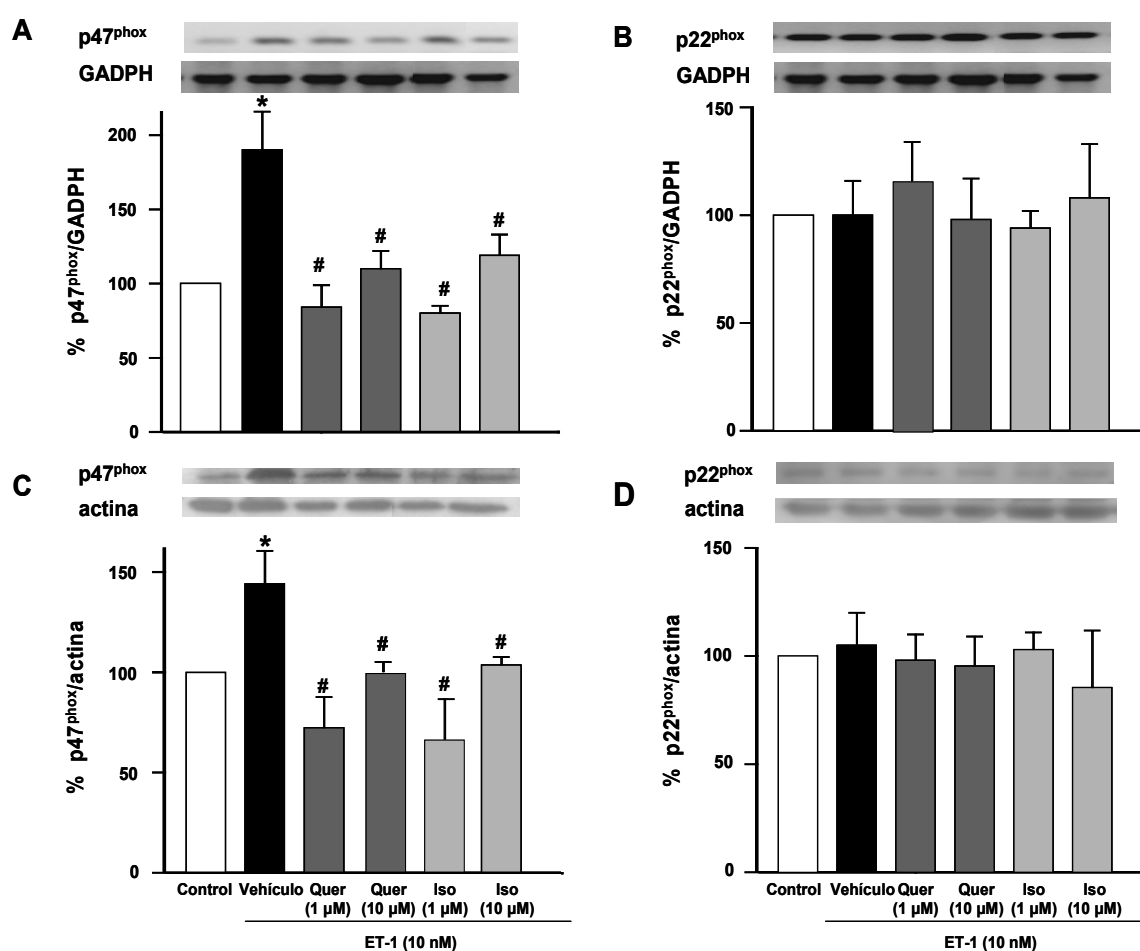


Figura 17. Expresión vascular de p47^{phox} y p22^{phox}. Efectos de quercetina (Quer) e isorramnetina (Iso) co-incubadas durante 2 horas con endotelina-1 (ET-1) sobre la expresión génica (A y B) y proteica (C y D) de p47^{phox} y p22^{phox}. El vehículo fue DMSO al 0,1%. Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm SEM de los valores de densidad de la banda normalizados con los correspondientes valores para GADPH (A y B) o para α -actina (C y D) y expresados como porcentaje de los anillos control, $n=4-6$. * $P < 0,05$ vs anillos control y # $P < 0,05$ vs ET-1 sola.

1.5. Papel de la PKC.

La reducción en la respuesta vasodilatadora a Ach y el aumento en la expresión de p47^{phox} inducido por ET-1 (10 nM) incubada durante 2 horas, es suprimido por la co-incubación con el inhibidor de la PKC, celeritrina (Fig. 18 A y B, respectivamente). El aumento en la producción de O₂⁻ en anillos aórticos inducido por ET-1 también es inhibido por la co-incubación con celeritrina (Fig. 18 C). Además, la incubación con el éster de forbol PMA, activador de PKC, también incrementa la producción de O₂⁻ en anillos aórticos. Este efecto es inhibido tanto por celeritrina, como por los flavonoides quercetina e isorramnetina (Fig. 18 D).

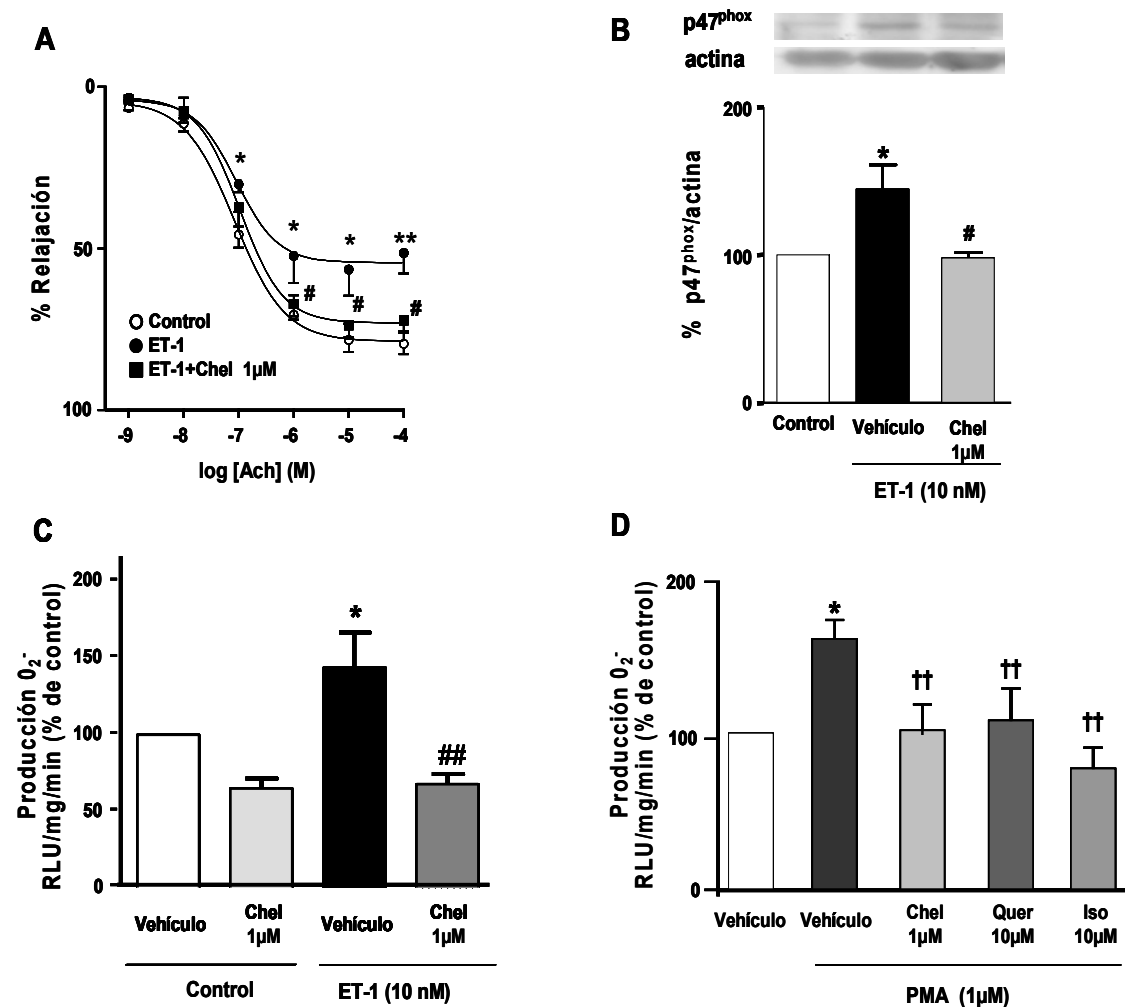


Figura 18. Papel de la proteína kinasa C (PKC). Anillos aórticos con endotelio de ratas Wistar fueron incubados durante 2 horas con vehículo (DMSO, 0,1%) o celeretrina (Chel, 1 μ M) en presencia o en ausencia de ET-1 (10 nM). (A) Curva de relajación concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina (Phe). (B) Expresión vascular de p47^{phox} a nivel proteico mediante western blot. (C) Efectos de celeretrina (Chel, 1 μ M) sobre la producción vascular de radicales superóxido (O₂⁻) inducida por ET-1 (10 nM) medida mediante quimioluminiscencia con lucigenina. (D) Efectos de quercetina (Quer, 10 μ M), isoramnetina (Iso, 10 μ M) o celeretrina (Chel, 1 μ M) sobre la producción vascular de radicales superóxido (O₂⁻) inducida por 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) (1 μ M), medida mediante quimioluminiscencia con lucigenina. Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm SEM, n=4-7. * P<0,05 vs anillos control, ** P<0,01 vs anillos control, # P<0,05 vs ET-1 sola, ## P<0,01 vs ET-1 sola y †† P<0,01 vs PMA.

Todos estos resultados muestran la implicación de la PKC en la vía de señalización por la que ET-1 induce disfunción endotelial y aumento en la producción vascular de radicales O_2^- . Además, determinamos la actividad PKC mediante un kit de ELISA, observando que la incubación de los anillos aórticos con ET-1 o PMA durante 30 minutos induce un incremento en su actividad. Ambos efectos fueron prevenidos por la incubación con celeritrina. La co-incubación con quercetina, pero no con isorramnetina, disminuye significativamente el incremento en la actividad PKC inducido por ET-1 (Fig. 19).

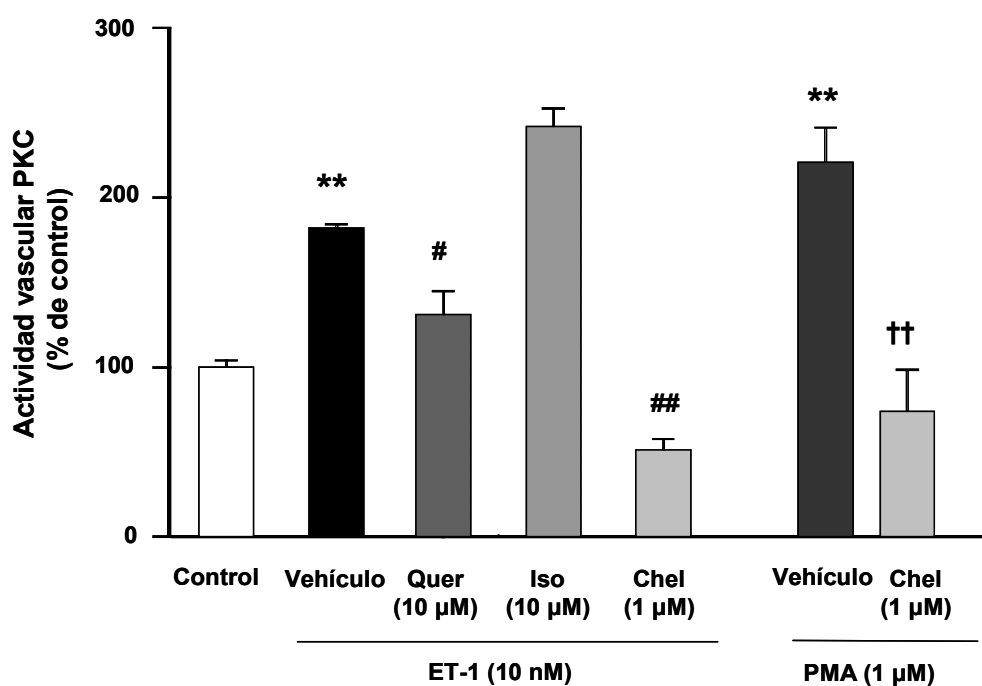


Figura 19. Efectos de quercetina (Quer, 10 μM), isorramnetina (Iso, 10 μM) o celeritrina (Chel, 1 μM) sobre la actividad vascular de PKC inducida por 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA, 1 μM) o ET-1 (10 nM) incubados durante 30 minutos. Los resultados se expresaron como la media aritmética ± SEM, n=4-7. * P < 0,05 vs anillos control, ** P < 0,01 vs anillos control, # P < 0,05 vs ET-1 sola, ## P < 0,01 vs ET-1 sola y †† P < 0,01 vs PMA.

1.6. Papel de c-Src.

Para determinar si el aumento en la producción vascular de radicales O_2^- inducido por ET-1 se produce por una vía c-Src dependiente, medimos la formación de O_2^- intracelular en anillos aórticos incubados con PP2, inhibidor selectivo de Src, en presencia o en ausencia de ET-1, mediante la técnica del DHE. En anillos preincubados con PP2, el aumento en la producción vascular de radicales O_2^- inducido por ET-1 es inhibido. En cambio, en anillos preincubados con PP3, análogo inactivo de PP2, no se reduce el aumento en la generación vascular de radicales O_2^- estimulada por ET-1 (Fig. 20 A y B).

Además, la incubación con ET-1 (10 nM) durante 2 horas induce un incremento en la producción vascular de O_2^- , medido mediante quimioluminiscencia con lucigenina, en anillos aórticos estimulados con NADPH (100 μ M). Este aumento es inhibido en anillos preincubados con PP2, mientras que en anillos preincubados con PP3 no se inhibe.

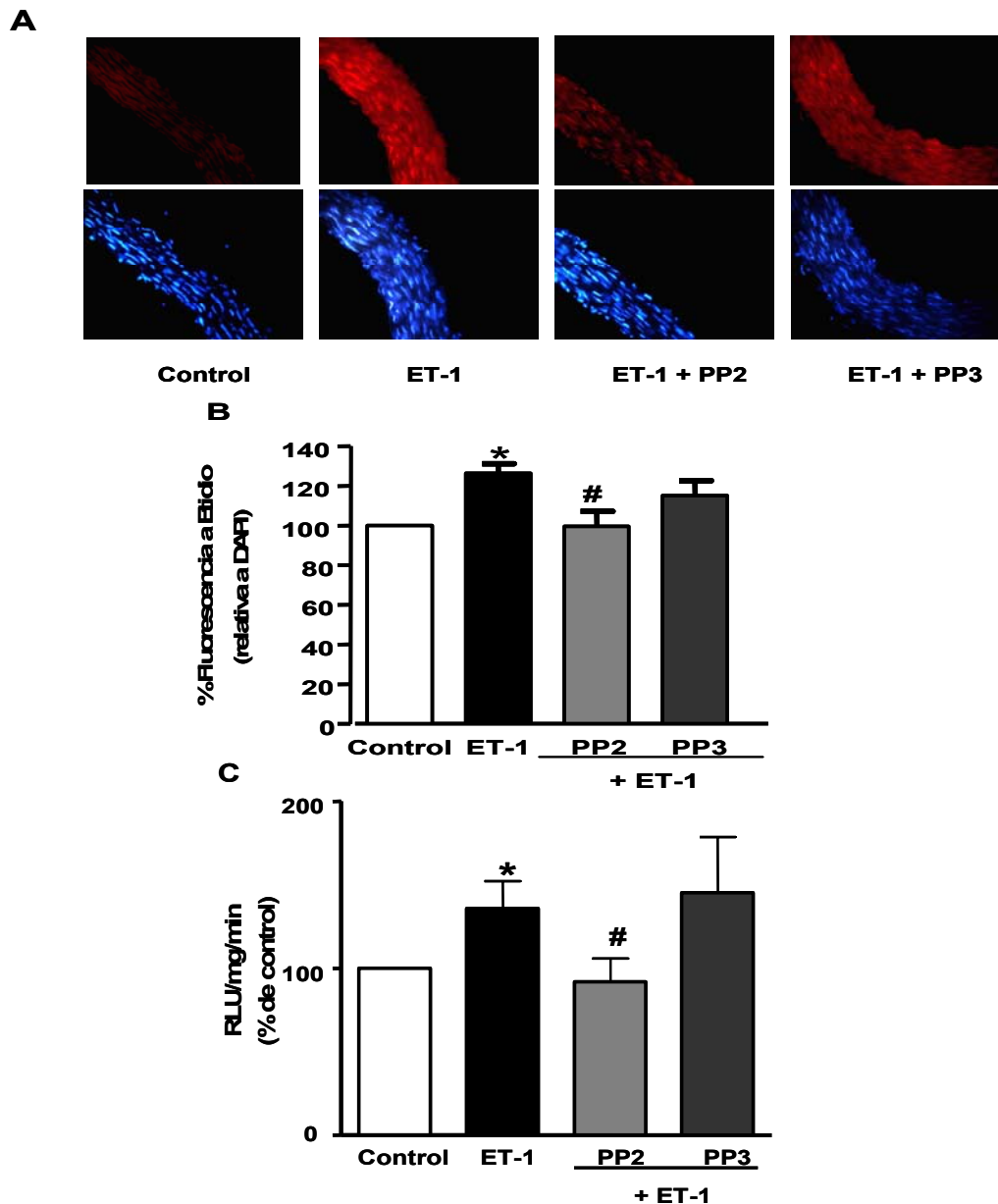


Figura 20. Papel de la tirosina kinasas *c-Src* en la producción vascular de radicales superóxido (O_2^-) inducida por endotelina-1 (ET-1). Anillos aórticos con endotelio de ratas Wistar fueron incubados durante 2 horas con vehículo (DMSO, 0,1%) o el inhibidor selectivo de *c-Src*, PP2 (10 μ M), o su análogo inactivo, PP3 (10 μ M), en presencia o ausencia de ET-1 (10 nM). (A) Las imágenes de arriba muestran los cortes histológicos de los anillos aórticos incubados con DHE, que emite fluorescencia roja cuando es oxidado a etidio por O_2^- . Las imágenes de abajo muestran los mismos cortes histológicos de los anillos aórticos incubados con el marcador nuclear DAPI, que emite fluorescencia azul al unirse a restos de adenina (B) Valores de la fluorescencia roja a etidio normalizados respecto a la fluorescencia azul del DAPI. (C) Efectos de PP2 y PP3 sobre la producción vascular de O_2^- inducida por ET-1 medida mediante quimioluminiscencia con lucigenina. Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm SEM, $n=4-6$. * $P < 0,05$ vs anillos control y # $P < 0,05$ vs ET-1 sola.

Dado que c-Src juega un papel importante en la síntesis de proteínas (Ma y Huang, 2002) y en la expresión de las subunidades Nox-2, p22^{phox} y p47^{phox} estimulada por Ang II en VSMC (Touyz *et al.*, 2003), investigamos si c-Src está implicada en el aumento en la expresión de la subunidad p47^{phox} inducido por ET-1 en anillos aórticos. Para ello, determinamos la expresión de p47^{phox} tanto a nivel de RNA mensajero (Fig. 21 A) como de proteína (Fig. 21 B) mediante RT-PCR y western blot, respectivamente. El aumento en la expresión de la subunidad p47^{phox} inducido por ET-1 es inhibido en anillos preincubados con PP2. En cambio, la incubación con PP3 no modifica la expresión génica de esta subunidad de la NAD(P)H oxidasa (Fig. 21 A y B).

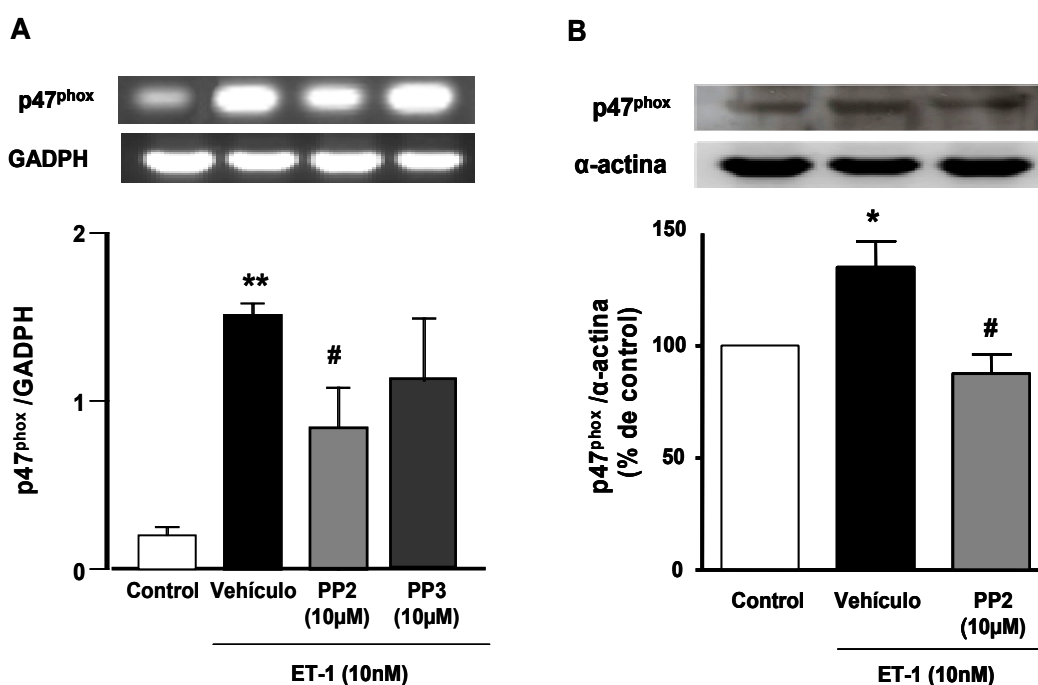


Figura 21. Papel de la tirosina kinasa c-Src en el aumento de la expresión vascular de p47^{phox} inducido por ET-1. Anillos aórticos con endotelio de ratas Wistar fueron incubados durante 2 horas con vehículo (DMSO, 0,1%) o el inhibidor selectivo de c-Src, PP2 (10 μM), o su análogo inactivo, PP3 (10 μM), en presencia o ausencia de ET-1 (10 nM). Expresión vascular de p47^{phox} (A) a nivel de RNA mensajero mediante RT-PCR y (B) a nivel proteico mediante western blot. Los resultados se expresaron como la media aritmética ± SEM de los valores de densidad de la banda normalizados con los correspondientes valores de GADPH (A) o de α-actina (B) y expresados como porcentaje de los anillos control, n=4-6. * P< 0,05 vs anillos control, ** P<0,01 vs anillos control y # P<0,05 vs ET-1 sola.

También quisimos analizar si ET-1 modifica el grado de fosforilación (activación) y la actividad de c-Src. La incubación con ET-1 (10 nM) durante 2 horas induce un incremento en el grado de fosforilación de c-Src con respecto a los anillos control (Fig. 22 A). Este aumento en el grado de fosforilación de c-Src es inhibido en anillos preincubados con PP2. Además, la incubación con ET-1 (10 nM) durante 2 horas induce un incremento en la expresión tanto génica como proteica de c-Src (Fig. 22 B y D), lo cual no es inhibido por la preincubación con PP2. Por tanto, ET-1 aumenta tanto el grado de fosforilación como la expresión de c-Src, lo cual da lugar a que no existan diferencias significativas al realizar la ratio fosfo-Src/Src entre los anillos control y los incubados con ET-1 (Fig 22 C).

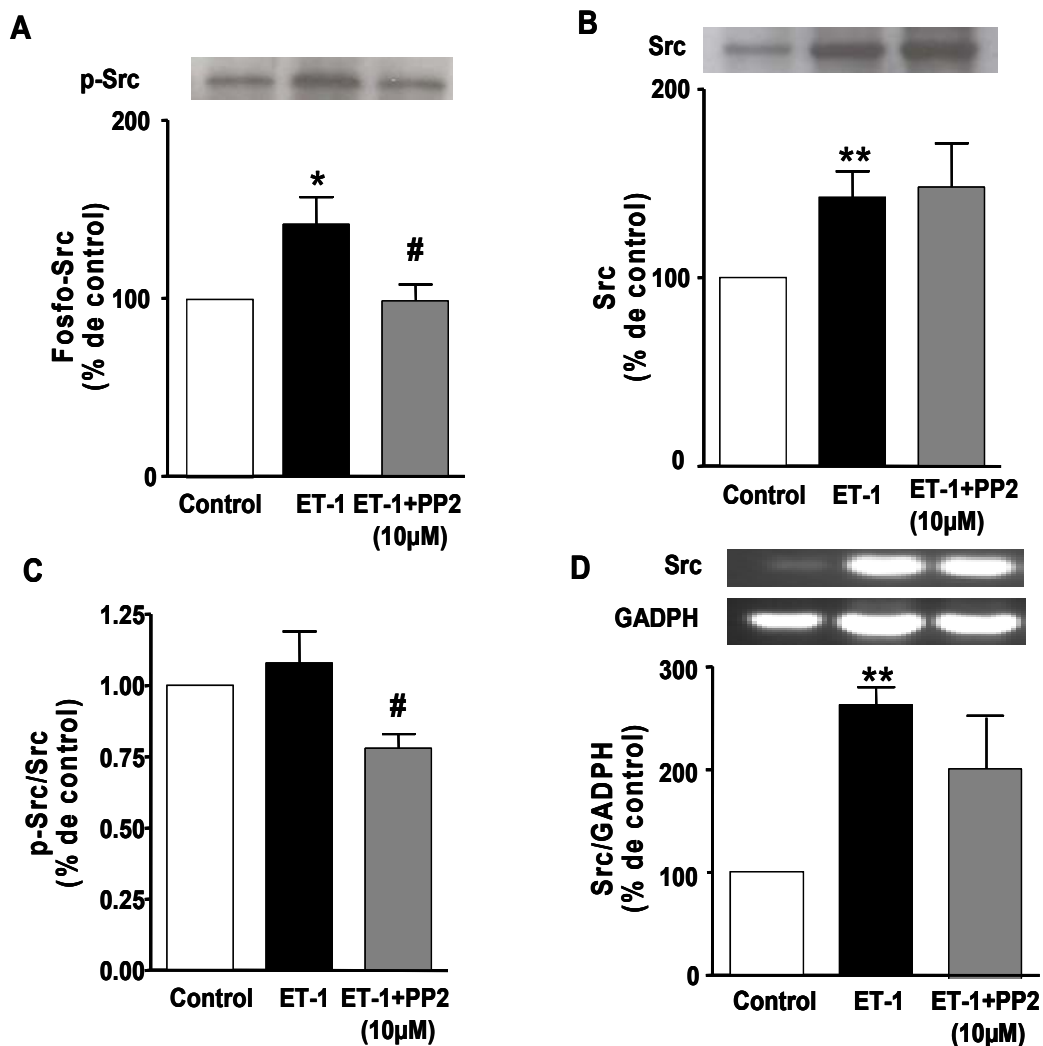


Figura 22. Efectos sobre la actividad de la tirosina kinasa *c-Src* inducidos por ET-1. Anillos aórticos con endotelio de ratas Wistar fueron incubados durante 2 horas con vehículo (DMSO, 0,1%) o el inhibidor selectivo de *c-Src*, PP2 (10 μ M) en presencia o ausencia de ET-1 (10 nM). (A y B) Expresión vascular de fosfo-Src y Src medida mediante western blot. (C) Relación en porcentaje de los valores de expresión de fosfo-Src y Src. (D) Expresión vascular de Src a nivel de RNA mensajero mediante RT-PCR. Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm SEM, $n=4-6$. * $P < 0,05$ vs anillos control, ** $P < 0,01$ vs anillos control, # $P < 0,05$ vs ET-1 sola.

Al no existir diferencias en el ratio fosfo-Src/Src entre los anillos control y los incubados con ET-1, no podemos determinar si ET-1 aumenta la actividad de c-Src. Es por ello que analizamos de forma indirecta la actividad de c-Src mediante el grado de fosforilación de su sustrato específico, cortactin, el cual es fosforilado cuando c-Src es activa. La incubación con ET-1 (10 nM) durante 2 horas induce un incremento en el grado de fosforilación de cortactin con respecto a los anillos control. Este aumento en el grado de fosforilación de cortactin es inhibido en anillos preincubados con PP2 (Fig 23 A). Quercetina también es capaz de reducir el nivel de fosforilación de cortactin inducido por ET-1 (Fig 23 B), lo cual sugiere que este flavonoide es inhibidor de la tirosina kinasa no acoplada a receptor c-Src y/o actúa en un paso previo de la vía de señalización de ET-1, posiblemente inhibiendo a la PKC. Por el contrario, isorramnetina, que no inhibe la actividad PKC, no es capaz de reducir de forma significativa el nivel de fosforilación de cortactin (Fig 23 B).

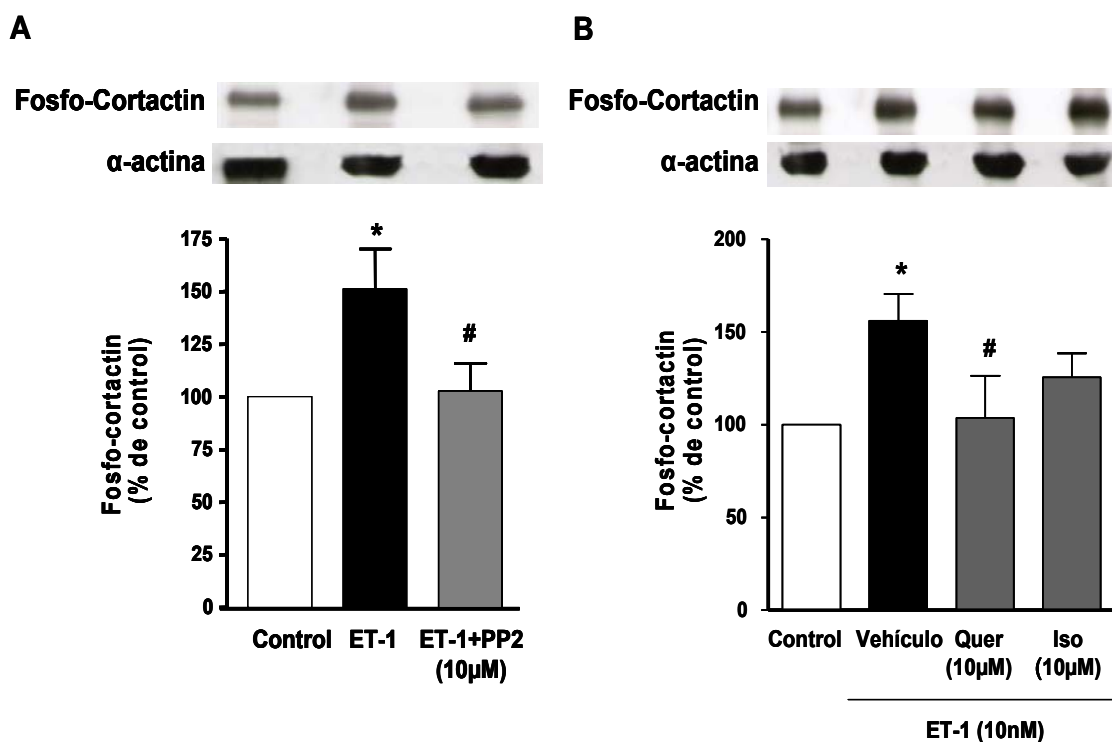


Figura 23. Efectos sobre la activación de la tirosina kinasa *c-Src* inducidos por ET-1. (A) Expresión vascular de fosfo-cortactin en anillos aórticos incubados durante 2 horas con vehículo (DMSO, 0,1%) o el inhibidor selectivo de *c-Src*, PP2 (10 μM) en presencia o ausencia de ET-1 (10 nM). (B) Expresión vascular de fosfo-cortactin en anillos aórticos incubados durante 2 horas con vehículo (DMSO, 0,1%) o quercetina (Quer, 10 μM) o isorramnetina (Iso, 10 μM) en presencia o ausencia de ET-1 (10 nM). Los resultados se expresaron como la media aritmética ± SEM de los valores de densidad de la banda normalizados con los correspondientes valores de α-actina y expresados como porcentaje de los anillos control, n=4-6. * P< 0,05 vs anillos control y # P<0,05 vs ET-1 sola.

Por último, quisimos determinar la posición de *c-Src* en la vía de señalización de ET-1 por la cual induce el aumento en la producción de radicales O_2^- y en la expresión de la subunidad $p47^{\text{phox}}$. Para ello, estudiamos si la activación de *c-Src* inducida por ET-1 es dependiente o no de PKC. Dado que la activación de *c-Src* inducida por ET-1 está relacionada más con el aumento de la expresión de *c-Src* que con el aumento en el grado de fosforilación de *c-Src* inducido por ET-1, determinamos la expresión de *c-Src* a nivel de proteína mediante western blot, en anillos preincubados con el inhibidor de PKC, celeritrina (1μM), en presencia o ausencia de ET-1 (10 nM). Observamos que el aumento

en el grado de fosforilación de c-Src producido por ET-1 es inhibido por la incubación con celeritrina, lo que nos indica que la activación de c-Src inducida por ET-1 es dependiente de PKC (Fig. 24).

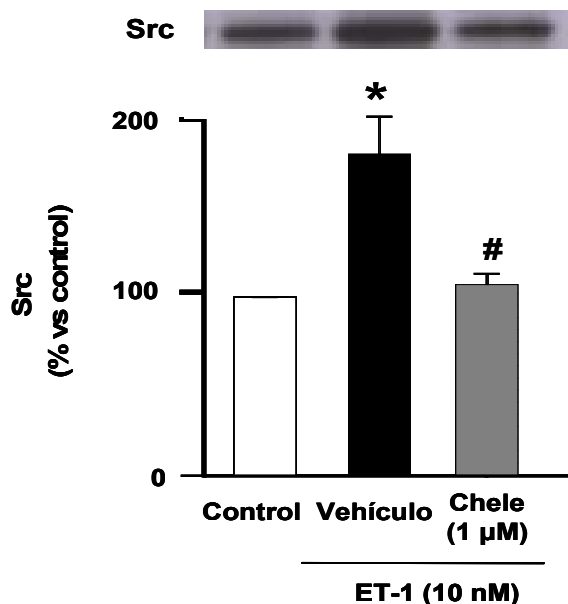


Figura 24. Implicación de la PKC en la activación de la tirosina quinasa c-Src inducida por ET-1. Expresión vascular de c-Src en anillos aórticos incubados durante 2 horas con vehículo (DMSO, 0,1%) o el inhibidor selectivo de PKC, celeritrina (Chele, 1μM) en presencia o ausencia de ET-1 (10 nM). Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm SEM de los valores de densidad de la banda normalizados con los correspondientes valores de actina y expresados como porcentaje de los anillos control, $n=4-6$. * $P < 0,05$ vs anillos control y # $P < 0,05$ vs ET-1 sola.

1.7. Papel de las MAPKs.

Para determinar la participación de MAPKs en el aumento de la producción vascular de radicales O_2^- inducido por ET-1, medimos la formación de O_2^- intracelular en anillos aórticos incubados con los inhibidores selectivos de las principales MAPKs (ERK1/2, p38^{mapk} y SAPK/JNK) en presencia o en ausencia de ET-1, mediante la técnica del DHE. En anillos preincubados con PD98059 (10 μ M, inhibidor específico de ERK1/2), el aumento en la producción vascular de radicales O_2^- inducido por ET-1 es inhibido. Sin embargo, en anillos preincubados con SB203580 (10 μ M, inhibidor específico de p38^{mapk}) o con SP600125 (25 μ M, inhibidor específico de SAPK/JNK), no se altera el aumento en la producción vascular de radicales O_2^- estimulado por ET-1 (Fig. 25 A y B).

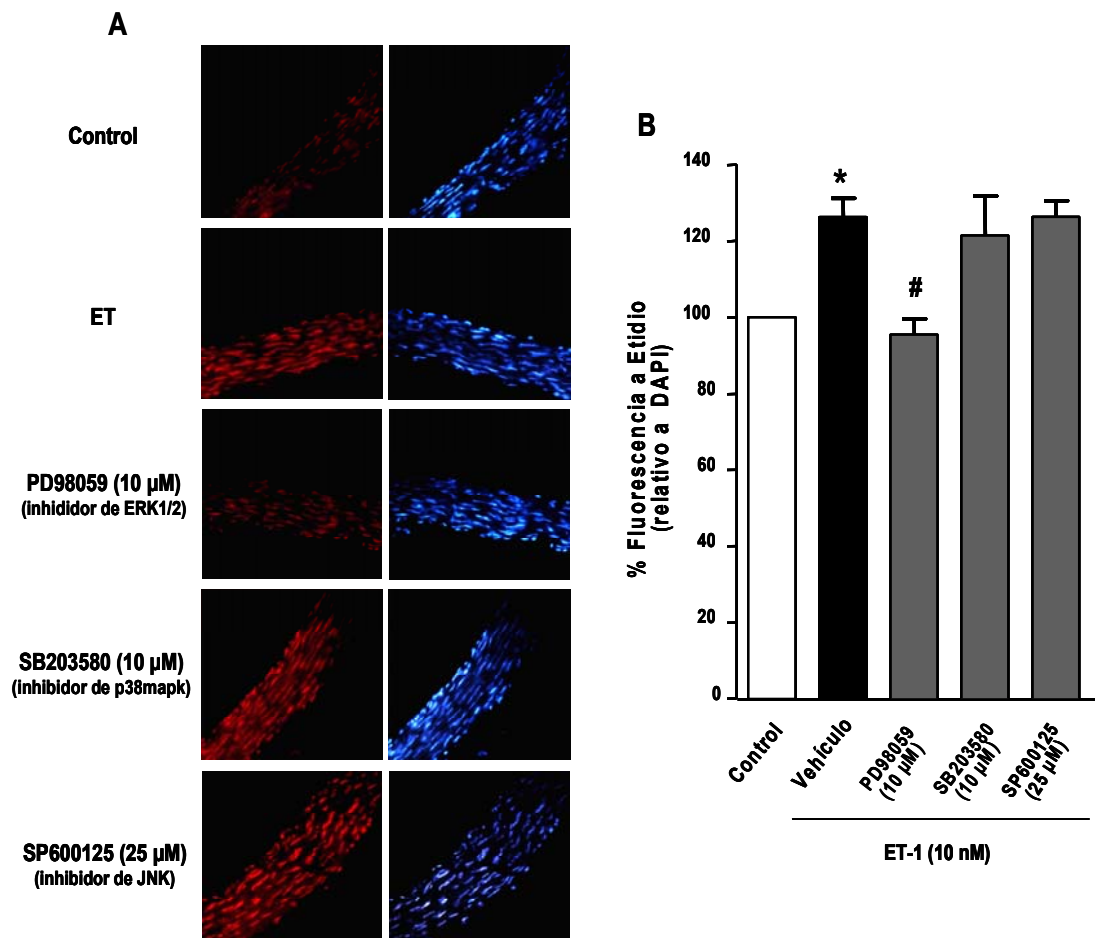


Figura 25. Efectos de la inhibición de las principales MAPKs sobre la producción vascular de radicales superóxido (O_2^-) inducida por endotelina-1 (ET-1) medida mediante fluorescencia con dibidroetidio (DHE). (A) Las imágenes de la izquierda muestran los cortes histológicos de los anillos aórticos incubados con DHE, que emite fluorescencia roja cuando es oxidado a etidio por O_2^- . Las imágenes de la derecha muestran los mismos cortes histológicos de los anillos aórticos incubados con el marcador nuclear DAPI, que emite fluorescencia azul al unirse a restos de adenina (B) Valores de la fluorescencia roja a etidio normalizados respecto a la fluorescencia azul del DAPI. El vehículo fue DMSO al 0,1%. Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm SEM, $n=5$. * $P < 0,05$ vs anillos control y # $P < 0,05$ vs ET-1 sola.

Dado que sólo ERK1/2 parece estar implicada en el aumento de la producción vascular de radicales O_2^- inducido por ET-1, quisimos evaluar su papel en el aumento de la expresión de la subunidad $p47^{phox}$ inducido por ET-1. Para ello, determinamos la expresión proteica de $p47^{phox}$ mediante western blot. En anillos preincubados con PD98059, el aumento en la expresión de la subunidad $p47^{phox}$ inducido por ET-1 es inhibido (Fig. 26). Por el contrario, en anillos preincubados con SB203580 (inhibidor específico de $p38^{mapk}$) o con SP600125 (inhibidor específico de SAPK/JNK), no se modifica el aumento en la expresión de la subunidad $p47^{phox}$ inducido por ET-1 (Fig. 26), lo cual parece estar relacionado con la falta de efecto en el aumento de la producción vascular de radicales O_2^- inducido por ET-1.

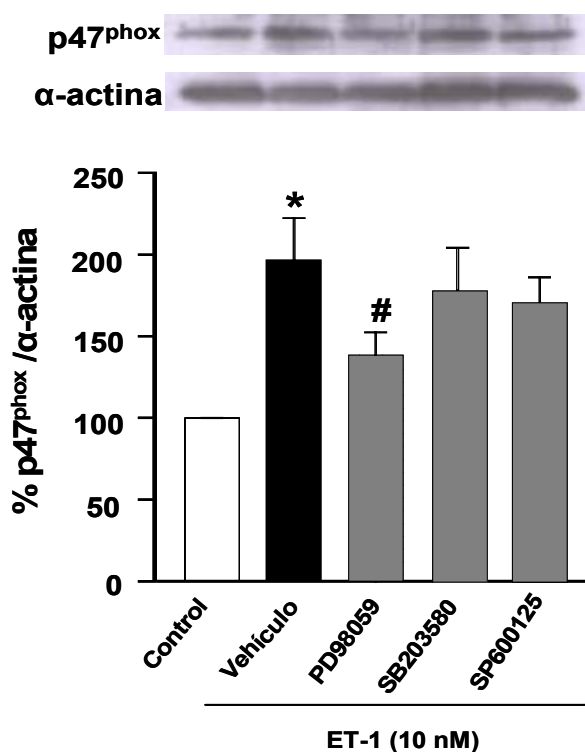


Figura 26. Expresión vascular de $p47^{phox}$. Efectos del inhibidor de las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2), PD98059 (10 μ M), el inhibidor de $p38^{mapk}$, SB203580 (10 μ M) o el inhibidor de c-Jun N-terminal kinasa (JNK), SP600125 (25 μ M) preincubados 30 minutos y después co-incubadas durante 2 horas con endotelina-1 (ET-1) sobre la expresión vascular de $p47^{phox}$ a nivel proteico mediante western blot. El vehículo fue DMSO al 0,1%. Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm SEM de los valores de densidad de la banda normalizados con los correspondientes valores de α -actina y expresados como porcentaje de los anillos control, $n=4-5$ * $P < 0,05$ vs anillos control y # $P < 0,05$ vs ET-1 sola.

Además, analizamos si ET-1 modifica el grado de fosforilación de ERK1/2. Para ello, estudiamos el estado de fosforilación de ERK1/2 mediante western blot en anillos aórticos incubados con ET-1 (10 nM) a distintos tiempos. Se observa que la incubación con ET-1 (10 nM) induce un aumento en el grado de fosforilación de ERK1/2 con respecto al tiempo, existiendo diferencias significativas con respecto a los anillos control a partir de 1 hora de incubación y manteniéndose dicho aumento hasta las 2 horas (Fig. 27).

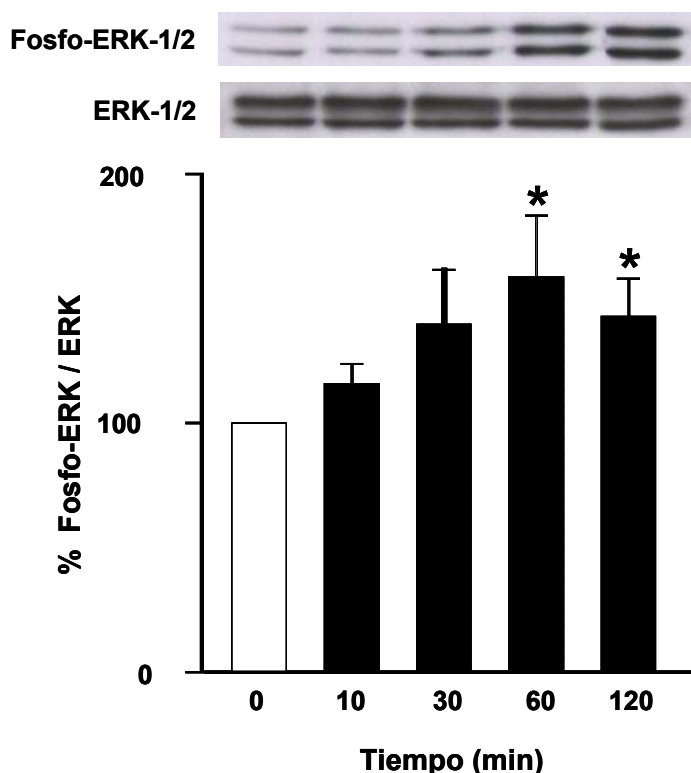


Figura 27. Efecto de ET-1 (10 nM) sobre la fosforilación de ERK1/2 a diferentes tiempos de incubación. Anillos aórticos fueron incubados con ET-1 (10 nM) durante 0, 10, 30, 60 o 120 minutos. Posteriormente, los homogenados fueron utilizados para realizar western blot para fosfo-ERK1/2 y ERK1/2. Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm SEM de los valores de densidad de la banda para fosfo-ERK1/2 normalizados con los correspondientes valores de ERK1/2 y expresados como porcentaje de los anillos control, $n=4-5$ * $P < 0.05$ vs anillos control.

Este aumento en el grado de fosforilación de ERK1/2 se redujo de forma significativa en anillos preincubados con el inhibidor selectivo de ERK1/2, PD98059 (10 μ M), por el inhibidor selectivo de c-Src, PP2 (10 μ M) y por el inhibidor de PKC, celeritrina (10 μ M) (Fig. 28 A y B). Estos resultados nos indican que la activación de ERK1/2 inducida por ET-1 es un paso posterior a la activación de PKC y c-Src en la vía de señalización de la ET-1.

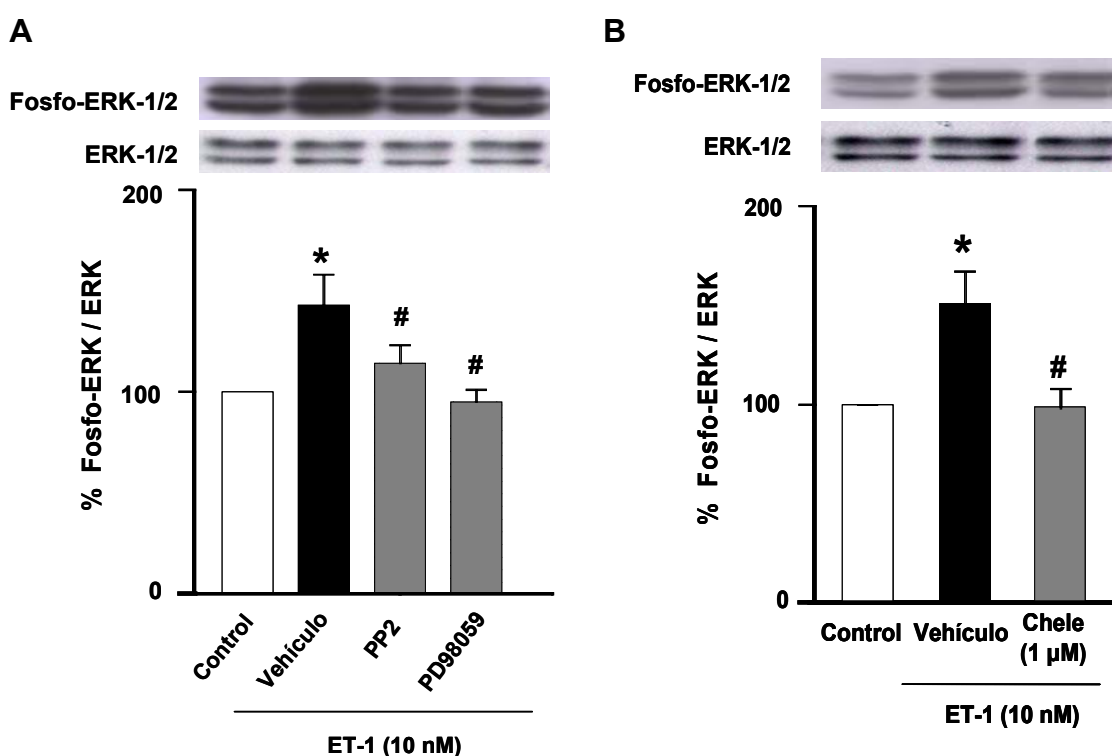


Figura 28. Implicación de PKC y c-Src en el aumento de la fosforilación de ERK1/2 inducido por endotelina-1 (ET-1). (A) Efectos del inhibidor de las kinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2), PD98059 (10 μ M) y del inhibidor selectivo de c-Src, PP2 (10 μ M) preincubados 30 minutos y después co-incubados durante 2 horas con ET-1 sobre el aumento de la fosforilación de ERK1/2 inducida por ET-1 a nivel proteico mediante western blot. (B) Efectos del inhibidor de PKC, celeritrina (10 μ M) preincubado 30 minutos y después co-incubado durante 2 horas con ET-1 sobre el aumento de la fosforilación de ERK1/2 inducida por ET-1 a nivel proteico mediante western blot. El vehículo fue DMSO al 0,1%. Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm SEM de los valores de densidad de la banda para fosfo-ERK1/2 normalizados con los correspondientes valores de ERK1/2 y expresados como porcentaje de los anillos control, $n=4-5$ * $P < 0.05$ vs anillos control y # $P < 0.05$ vs ET-1 sola.

Resultados

La co-incubación con los flavonoides quercetina e isorramnetina ($1\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$), también inhibió el aumento de la fosforilación de ERK1/2 inducido por ET-1 (Fig. 29 A y B).

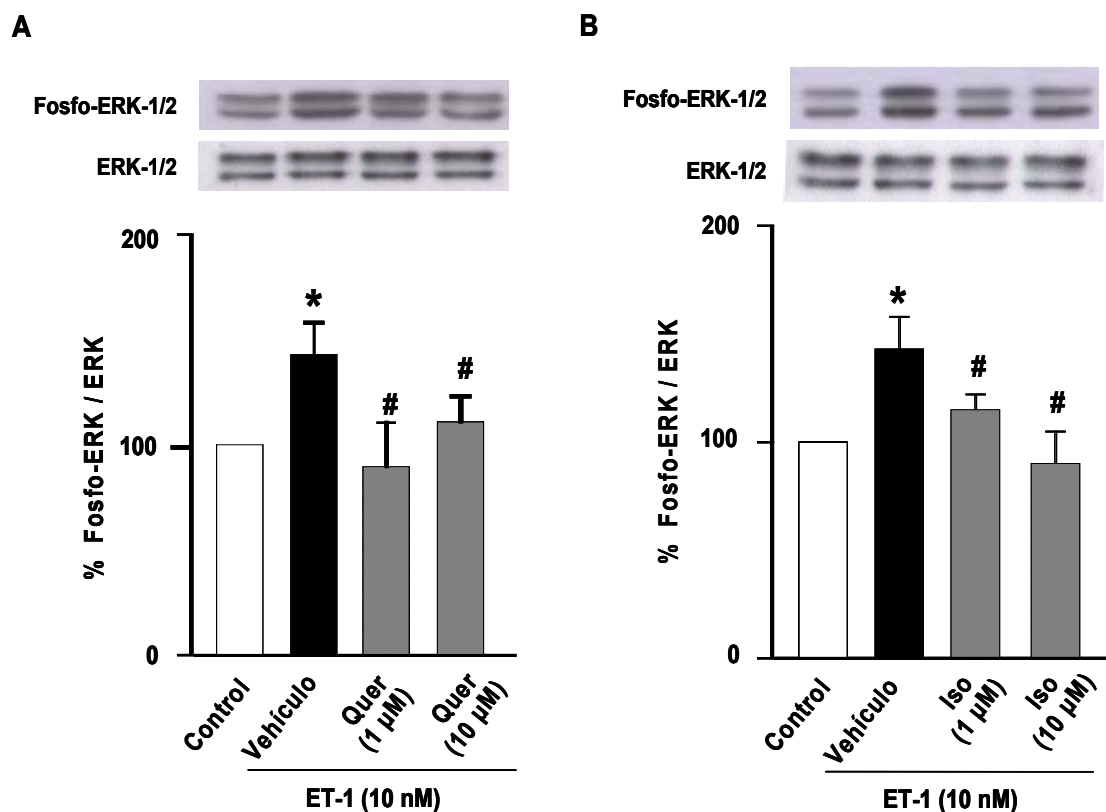


Figura 29. Efectos de quercetina e isorramnetina sobre la fosforilación de ERK1/2 inducida por endotelina-1 (ET-1). (A) Efectos de quercetina (Quer) ($1\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$) co-incubada durante 2 horas con endotelina-1 (ET-1) sobre el aumento de la fosforilación de ERK1/2 inducida por ET-1. (B) Efectos de isorramnetina (Iso) ($1\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$) co-incubada durante 2 horas con ET-1 sobre el aumento de la fosforilación de ERK1/2 inducida por ET-1. El vehículo fue DMSO al 0,1%. Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm SEM de los valores de densidad de la banda para fosfo-ERK1/2 normalizados con los correspondientes valores de ERK1/2 y expresados como porcentaje de los anillos control, $n=4-5$ * $P < 0.05$ vs anillos control y # $P < 0.05$ vs ET-1 sola.

Discusión.

Discusión.

1. Efecto de quercetina e isorramnetina sobre la disfunción endotelial inducida por endotelina-1 *in vitro*. Participación de la PKC.

La ET-1 es un conocido agente vasoconstrictor derivado del endotelio que incrementa el estrés oxidativo a nivel vascular, lo que conlleva a una inactivación del NO por los radicales O_2^- . Este efecto juega un papel importante en la génesis de la disfunción endotelial observada en una amplia variedad de condiciones patológicas, tales como aterosclerosis, hipertensión y diabetes (Miyachi *et al.*, 1999).

Los resultados de esta Tesis Doctoral muestran que la ET-1 induce un incremento en la producción de radicales O_2^- en la pared vascular mediado por una activación del sistema NADPH oxidasa. Este efecto se ve amplificado por el desacoplamiento de la eNOS inducido por el aumento de radicales O_2^- , lo que origina a una mayor generación de ROS, que conduce a la aparición de disfunción endotelial. Este mecanismo es similar al que se describe en estudios previos (Loomis *et al.*, 2005; Munzel *et al.*, 2005). Por tanto, a la disfunción endotelial inducida por ET-1 contribuyen tanto la activación del sistema NADPH oxidasa como el desacoplamiento de la eNOS.

Además, demostramos que ET-1 activa al sistema NADPH oxidasa mediante el aumento en la expresión de la subunidad p47^{phox}, sin afectar a la subunidad p22^{phox}, por una vía PKC dependiente.

En esta Tesis Doctoral, demostramos también, por primera vez, que la disfunción endotelial inducida por ET-1, puede ser prevenida por el flavonol quercetina y su principal metabolito plasmático, isorramnetina, independientemente de la posible interferencia de estos flavonoles en la síntesis de ET-1. Además, ambos flavonoles previenen el incremento en la producción de radicales O_2^- producido por ET-1 vía desacoplamiento de la eNOS y

activación del sistema NADPH oxidasa, al prevenir el incremento en la expresión de la subunidad p47^{phox}. Finalmente, quercetina, pero no isorramnetina, previene la activación de la PKC inducida por ET-1.

La disfunción endotelial está presente en algunos modelos experimentales de hipertensión, donde la ET-1 juega un papel importante en su fisiopatología, tales como ratas hipertensas DOCA-sal, un modelo de hipertensión bajo en renina-angiotensina (Li *et al.*, 2003), ratas con diabetes inducida con estreptozotocina (insulino-dependientes) (Makino *et al.*, 1998), ratas hipertensas por infusión con ET-1 (Elmarakby *et al.*, 2005) y ratones transgénicos que sobre-expresan el gen para preproET-1 específicamente en el endotelio vascular (Amiri *et al.*, 2004).

El hecho de que ET-1 pueda inducir también disfunción endotelial *in vitro* en aorta de rata (Loomis *et al.*, 2005; Kamata *et al.*, 2004 y resultados presentes) indica que estos cambios son debidos a una acción directa de la ET-1 sobre la pared vascular, independientemente de los niveles de hormonas circulantes, mecanismos neurogénicos o cambios en la presión arterial. En nuestros experimentos, la disfunción endotelial inducida por ET-1 fue observada por una reducción en la respuesta vasodilatadora después de la activación de la eNOS inducida por Ach, así como por un aumento en la respuesta vasoconstrictora a Phe.

La administración crónica de quercetina reduce la presión arterial y mejora la disfunción endotelial observada en ratas DOCA-sal. Estos efectos preventivos han sido relacionados con las propiedades antioxidantes de quercetina, que reduce el estrés oxidativo sistémico y vascular (Galisteo *et al.*, 2004a, b). Sin embargo, se desconoce si los efectos en la función endotelial son debidos a un efecto directo sobre la pared de los vasos, secundario a la reducción de la presión arterial, o bien son debidos a los mecanismos neurohumorales de quercetina y sus metabolitos.

Los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que tanto quercetina como su principal metabolito plasmático, isorramnetina, son también efectivas *in vitro*, incrementando la respuesta vasodilatadora a Ach y disminuyendo la respuesta vasoconstrictora a Phe en anillos aórticos expuestos a ET-1. Además, se ha de destacar que

la quercetina a la concentración de 1 μ M es efectiva para reducir la disfunción endotelial, por lo que este efecto parece ser fisiológicamente relevante (Manach *et al.*, 2005).

El efecto de ET-1 fue observado después de 2 horas de incubación, aún cuando la ET-1 estaba ausente durante las curvas concentración-respuesta a Phe o Ach. Igualmente, ambos flavonoles, quercetina e isorramnetina, estuvieron presentes durante la incubación con ET-1, pero ausentes durante el estudio de la función endotelial. Estos cambios inducidos por ET-1 en la función endotelial están relacionados con los cambios en la expresión proteica de las fuentes generadoras de radicales O₂⁻, tales como el aumento en la expresión de la subunidad p47^{phox} del sistema NADPH oxidasa.

El aumento en la producción de radicales O₂⁻ está implicado en la destrucción de NO asociada a la disfunción endotelial que se observa en los anillos aórticos de ratas DOCA-sal (Li *et al.*, 2003; Galisteo *et al.*, 2004a) y en anillos incubados con ET-1 (Kamata *et al.*, 2004). En nuestros experimentos, la presencia de SOD, un agente “scavenger” de radicales O₂⁻ extracelulares, en el baño de órganos mejoró la respuesta vasodilatadora inducida por Ach en anillos aórticos incubados con ET-1. De forma similar, Kamata y cols. (2004) observaron que la co-incubación de los anillos aórticos con ET-1 y PEG-SOD, un “scavenger” de radicales O₂⁻ intracelular, prevenía completamente la menor respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente a Ach inducida por ET-1. En nuestro estudio, la apocinina, un inhibidor selectivo de la actividad NADPH oxidasa, revirtió tanto el incremento en la respuesta vasoconstrictora a Phe como la menor respuesta vasodilatadora a Ach provocada por ET-1. Sepiapterin, que previene el desacoplamiento de la eNOS (Alp *et al.*, 2004), también revierte el incremento en la respuesta vasoconstrictora a Phe, aunque no mejoro significativamente la menor respuesta vasodilatadora a Ach inducida por ET-1. Estos resultados muestran el papel fundamental de la actividad NADPH oxidasa en la modulación del tono vascular frente a una actividad eNOS basal o estimulada, mientras que el desacoplamiento de la eNOS inducido por ET-1 parece estar implicado principalmente en el incremento de la respuesta contráctil a vasoconstrictores.

Numerosos estudios han descrito al sistema NADPH oxidasa como la principal fuente generadora de ROS inducida por ET-1 (Li *et al.*, 2003b, c, d). Sin embargo, otros autores

han sugerido que otros sistemas enzimáticos son las principales fuentes generadoras de ROS inducidas por ET-1, tales como la eNOS desacoplada y la cadena respiratoria mitocondrial (Touyz *et al.*, 2004; Callera *et al.*, 2006). Los resultados de esta Tesis Doctoral muestran que ET-1 aumenta la actividad de la NADPH oxidasa, ya que, en presencia de NADPH, sustrato de este sistema enzimático, se incrementa la producción de radicales O_2^- en anillos aórticos expuestos a ET-1. Además, hemos observado un incremento en la fluorescencia roja a etidio inducido por ET-1 en las capas media y adventicia de la pared vascular, donde la eNOS no está expresada, sugiriendo que la ET-1 activa a la NADPH oxidasa vascular dando lugar a un aumento en la producción de radicales O_2^- .

Igualmente, se ha descrito que ET-1 incrementa la producción de radicales O_2^- y la expresión de gp91^{phox}, una subunidad membranal esencial para la actividad de la NADPH oxidasa, en células endoteliales (Duerschmidt *et al.*, 2000). Esta subunidad también estaba sobreexpresada en la aorta de ratones transgénicos que presentaban un aumento en los niveles de ET-1 (Amiri *et al.*, 2004). Sin embargo, Touyz y cols. (2004) han descrito que la expresión de las subunidades p22^{phox} y p47^{phox} no es incrementada por ET-1 en VSMC. En esta Tesis Doctoral, anillos aórticos incubados con ET-1 durante 2 horas muestran un incremento en la expresión de la subunidad p47^{phox} pero no de la subunidad p22^{phox}. Este incremento en la expresión de la subunidad p47^{phox} está relacionado con el aumento en la producción de radicales O_2^- encontrado en anillos aórticos estimulados por ET-1. La co-incubación con el flavonol quercetina o su metabolito isorramnetina, revierte el incremento en la expresión de la subunidad p47^{phox} inducido por ET-1. Estos resultados sugieren que la quercetina y su metabolito metilado isorramnetina revierten el incremento de la producción de radicales O_2^- inducido por ET-1 debido a que inhiben el aumento de la expresión de la subunidad p47^{phox} de la NADPH oxidasa vascular. Estos resultados están en relación con datos previos obtenidos por nuestro grupo de investigación. Así, en un estudio reciente, nuestro grupo ha demostrado que en SHR, la mejora de la función endotelial debida a la administración crónica de quercetina, está asociada con la reducción de la actividad de la NADPH oxidasa, la cual está aumentada en ratas SHR en comparación con sus controles normotensos, ratas Wistar-Kyoto (Sánchez *et al.*, 2006). Además, quercetina e

isoramnetina previenen la disfunción endotelial inducida por Ang II al inhibir el aumento de expresión de la subunidad p47^{phox} (Sánchez *et al.*, 2007). Los resultados de esta Tesis sugieren que la reducción de la producción de radicales O₂⁻ vía NADPH oxidasa vascular, y por tanto la menor inactivación de NO, puede ser un mecanismo importante para la prevención de la disfunción endotelial inducida por quercetina *in vivo* en modelos experimentales de ET-1.

El desacoplamiento de la eNOS, por deficiencia en su cofactor BH4, es también una fuente de generación de radicales O₂⁻ a nivel vascular. El ionóforo de calcio, A23187, que induce la activación de la eNOS de forma calcio-dependiente, incrementa la producción de radicales O₂⁻ en anillos aórticos expuestos a ET-1. Como se esperaba, este efecto fue abolido por la inhibición de la eNOS con L-NAME, por el precursor de BH4, sepiapterin, y por la eliminación mecánica del endotelio. Además, los presentes resultados amplían los descubrimientos previos (Loomis *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2003d), indicando que la ET-1 incrementa la producción de radicales O₂⁻ vía desacoplamiento de la eNOS. La generación de radicales O₂⁻ inducida por el ionóforo de calcio A23187 en anillos incubados con ET-1, fue prevenida por el inhibidor de la NADPH oxidasa, apocinina, lo que sugiere que la producción de radicales O₂⁻ vía NADPH oxidasa es necesaria para el desacoplamiento de la eNOS. Quercetina e isoramnetina también inhibieron la producción de radicales O₂⁻ inducida por el ionóforo de calcio A23187, lo cual nos indica que ambos previenen el desacoplamiento de la eNOS inducido por ET-1. Este efecto presumiblemente es secundario a la inhibición del incremento de la actividad de la NADPH oxidasa y de la expresión de la subunidad p47^{phox} inducido por ET-1.

ET-1 es un potente estimulador de la PKC (Takenaka *et al.*, 1993), la cual también está implicada en la activación de la NADPH oxidasa e incremento de la producción de radicales O₂⁻ (Heitzer *et al.*, 1993). Por tanto, es posible que la ET-1 active a la NADPH oxidasa mediante un mecanismo PKC-dependiente. En esta Tesis Doctoral, hemos demostrado que la celeritrina, un inhibidor de la PKC, mejora la respuesta vasodilatadora inducida por Ach en anillos aórticos incubados con ET-1, reduce el incremento de la expresión de la subunidad p47^{phox} inducido por ET-1 y disminuye el incremento de la

producción de radicales O_2^- y el incremento de la actividad PKC inducidos por ET-1 o PMA, activador de PKC. Estos resultados sugieren que la ET-1 estimula la producción de radicales O_2^- mediante la activación de la NADPH oxidasa vascular, lo cual da lugar a una disfunción endotelial mediante un mecanismo PKC-dependiente. Quercetina y otros flavonoides relacionados son inhibidores de proteínas kinasas, incluyendo a PKC y c-Src (Middleton *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 2009). De hecho, hemos observado que tanto quercetina como isorramnetina inhiben la producción de radicales O_2^- estimulada por PMA, e igualmente que la celeritrina, reduce el aumento de expresión de la subunidad p47^{phox} y la disfunción endotelial inducida por ET-1. Por tanto, la inhibición de la PKC por estos flavonoles puede estar implicada en la prevención de la disfunción endotelial inducida por ET-1, por inhibición de la activación de la NADPH oxidasa de forma PKC-dependiente, lo que está de acuerdo con los resultados observados por otros autores en plaquetas (Pignatelli *et al.*, 1993). De hecho, quercetina reduce significativamente el aumento de la actividad PKC inducido por ET-1, sugiriendo que el efecto preventivo de quercetina en el aumento de la producción de radicales O_2^- y la disfunción endotelial está relacionado con la inhibición de la PKC. Sin embargo, isorramnetina, que inhibe el aumento de la producción de radicales O_2^- vía NADPH oxidasa inducido por PMA y ET-1, no redujo el aumento de la actividad PKC inducido por ET-1, sugiriendo que este flavonoide debe actuar en un paso posterior a la PKC en la vía de señalización de la ET-1 que conduce al aumento de la producción de radicales O_2^- .

2. Participación de c-Src y MAPKs en la vía de señalización de ET-1.

Los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran la participación de la tirosina kinasa no acoplada a receptor c-Src y de la MAPKs ERK1/2 en la vía de señalización de ET-1 que conduce al aumento de la expresión vascular de la subunidad p47^{phox} del sistema NAD(P)H oxidasa y de la generación de radicales O₂⁻. Quercetina, pero no isoramnetina, previene la activación de c-Src inducida por ET-1. En cambio, la activación de ERK1/2 inducida por ET-1 es inhibida tanto por quercetina como por isoramnetina. Por tanto, los efectos preventivos de quercetina son mediados por la inhibición de la vía PKC-c-Src-ERK1/2, mientras que los efectos preventivos de isoramnetina son mediados únicamente por su capacidad de inhibir la activación de ERK1/2 inducida por ET-1.

ET-1, al igual que Ang II, media una gran cantidad de acciones vasculares a través de la unión a sus receptores acoplados a proteínas G. Tanto ET-1 como Ang II activan vías de señalización comunes para promover cambios en la reactividad vascular, la función endotelial, el remodelado tisular, la inflamación y el estrés oxidativo. Dentro de estas vías de señalización se incluyen proteínas tirosina kinasa receptor dependientes e independientes, pequeñas GTPasas y MAPKs (Ushio-Fukai *et al.*, 1998, Touyz *et al.*, 1999; Neylon, 1999; Daou *et al.*, 2004; Touyz *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005).

c-Src es un regulador crítico de la generación de O₂⁻ a través del sistema NAD(P)H oxidasa inducida por Ang II, que contribuye a la amplificación del estrés oxidativo (Touyz *et al.*, 2003; Seshiah *et al.*, 2002). Estudios previos han demostrado que c-Src es un efector de la vía de señalización de ET-1 en células no vasculares (Kodoma *et al.*, 2002; Kodoma *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2005; Milan *et al.*, 2006; Kovacic *et al.*, 1998). En cambio, existe una gran controversia en cuanto a su participación en la vía de señalización de ET-1 en VSMC. Los resultados de esta Tesis Doctoral muestran que c-Src está implicada en la vía de señalización por la que ET-1 induce un aumento en la expresión de la subunidad p47^{phox} en anillos aórticos de rata, actuando como paso previo en la activación del sistema NADPH

oxidasa y la generación de radicales O_2^- . Así, la inhibición farmacológica de c-Src, mediante la preincubación de los anillos con PP2 (inhibidor selectivo de c-Src), inhibe el aumento de la producción de radicales O_2^- y el aumento de la expresión de la subunidad p47^{phox} inducidos por ET-1. Además, ET-1 aumenta la fosforilación de cortactin, un sustrato específico de c-Src, lo cual confirma la implicación de c-Src en la vía de señalización de ET-1. En los anillos preincubados con PP2 (10 μ M) se inhibe el aumento en la fosforilación de cortactin inducido por ET-1, indicando que a esta concentración de PP2 la actividad de c-Src es reducida. Igualmente, ET-1 aumenta la fosforilación de c-Src, la forma activa de esta tirosina kinasa, y este efecto es inhibido por la preincubación con PP2. Este efecto contrasta con los resultados de un reciente estudio en VSMC de arterias mesentéricas de ratones, en el que la estimulación con ET-1 durante 5 minutos no modifica el grado de fosforilación de c-Src (Yogi *et al.*, 2007). Sin embargo, nuestros resultados se obtienen después de 2 horas de incubación con ET-1 y parecen estar relacionados con el aumento en la expresión de c-Src. Este último efecto, no es inhibido por PP2.

La vía de señalización por la que ET-1 aumenta la fosforilación de c-Src no se conoce bien. ET-1 aumenta rápidamente la actividad de PKC y esta activación de PKC está implicada en el aumento de expresión de p47^{phox}. Sin embargo, no es posible que PKC, una serina-treonina kinasa, pueda fosforilar y activar directamente a c-Src, dado que la fosforilación de c-Src ocurre en restos de tirosina. Sin embargo, el incremento del grado de fosforilación de c-Src que se observa tras la incubación de los anillos aórticos con ET-1, parece estar relacionado con un aumento en la expresión proteica de esta enzima. Esta mayor expresión proteica de c-Src inducida por ET-1, se reduce al incubar los anillos aórticos con los inhibidores de PKC, celeritrina y quercetina, pero no se altera con isorramnetina, que a la concentración utilizada (10 μ M), no reduce la actividad PKC. Estos resultados sugieren que la PKC es un regulador positivo de la activación de c-Src inducida por ET-1.

Igualmente, estudiamos también la implicación de las MAPKs en el aumento en la producción de radicales O_2^- y en la expresión de la subunidad p47^{phox} inducido por ET-1.

Las MAPKs son una familia de serina/treonina kinasas que se han asociado clásicamente en VSMC con procesos de contracción, migración, diferenciación, adherencia, depósito de colágeno, crecimiento y supervivencia celular (Pearson *et al.*, 2001). De las principales MAPKs, ERK1/2, p38^{mapk} y SAPK/JNK son las más estudiadas (Pearson *et al.*, 2001). Diversos autores han descrito que ET-1 es capaz de aumentar el grado de fosforilación de MAPKs en diferentes tipos celulares (Kwon *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Kodama *et al.*, 2003; Chu *et al.*, 2007). Igualmente, se ha descrito que la activación de MAPKs en diferentes tipos celulares parece ser dependiente de la activación de c-Src (Luttrell *et al.*, 2004; Touyz *et al.*, 2001; Ishida *et al.*, 1998). No obstante, no existen evidencias del papel de c-Src como regulador previo de la activación de MAPKs inducida por ET-1. En esta Tesis Doctoral observamos, mediante inhibición farmacológica de las principales MAPKs en aorta torácica de rata, que sólo la inhibición de ERK 1/2 es capaz de prevenir el aumento de la producción de radicales O₂⁻ y de la expresión de la subunidad p47^{phox} inducido por ET-1. Además, ET-1 induce un aumento en la fosforilación de estas tres MAPKs (resultados no mostrados), pero sólo el aumento de la fosforilación de ERK 1/2 inducido por ET-1 es inhibido por la preincubación de PP2, lo cual nos indica que c-Src está implicada en la vía de señalización por la que ET-1 aumenta el grado de fosforilación de ERK 1/2. Estos resultados contrastan con los resultados obtenidos por Yogi y cols. (2007), que observan que sólo el aumento de la fosforilación de p38^{mapk} inducido por ET-1 es inhibido en VSMC de ratones que no expresan el gen para c-Src. Las diferencias observadas podrían estar relacionadas con el uso de una especie distinta en nuestro estudio y/o con el uso de una preparación vascular en la que coexisten tanto VSMC como células endoteliales.

También hemos encontrado que la PKC regula la fosforilación de ERK1/2 producida por ET-1, puesto que el inhibidor selectivo de PKC, celeritrina, suprime la fosforilación de esta proteína, posiblemente por su capacidad reguladora de la actividad c-Src.

Por último, la co-incubación con quercetina e isorramnetina también inhibió el aumento de la fosforilación de ERK 1/2 inducido por ET-1, lo cual nos indica que los efectos de isorramnetina y parte de los efectos de quercetina para inhibir el aumento de la

producción de radicales O_2^- y de la expresión de la subunidad $p47^{phox}$ inducidos por ET-1, son debidos a su capacidad para inhibir la fosforilación de ERK1/2.

En conjunto estos resultados indican que, ET-1 induce un aumento en la producción de radicales O_2^- mediante la sobre-expresión de la subunidad $p47^{phox}$ y el posterior incremento de la actividad NADPH oxidasa y desacoplamiento de la eNOS, lo cual conduce a una menor biodisponibilidad del NO y a la aparición de disfunción endotelial.

En la vía de señalización de este efecto está implicada la activación de PKC, de c-Src y el aumento de la fosforilación de ERK1/2. Al contrario que para los efectos a corto plazo, que implican vías de señalización distintas para Ang II y ET-1 en la activación de la NADPH oxidasa vascular, los efectos a largo plazo en la regulación de la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa parece ser similar para estos dos agentes vasoactivos mediante un mecanismo c-Src dependiente (Touyz *et al.*, 2004; Laplante *et al.*, 2006).

Los flavonoides quercetina y su principal metabolito metilado, isorramnetina, previenen el aumento en la producción de radicales O_2^- vía NADPH oxidasa y el aumento en la expresión de la subunidad $p47^{phox}$ inducido por ET-1, evitando la disminución en la biodisponibilidad del NO y la aparición de disfunción endotelial. Los efectos de quercetina en la prevención de la disfunción endotelial inducida por ET-1 *in vitro* están mediados por su capacidad inhibidora de la PKC, inhibiendo la vía de señalización de ET-1 en su inicio, mientras que, los efectos de isorramnetina están mediados por su capacidad para inhibir la activación de ERK1/2 inducida por ET-1, inhibiendo la vía de señalización en un paso posterior. (Figura 30).

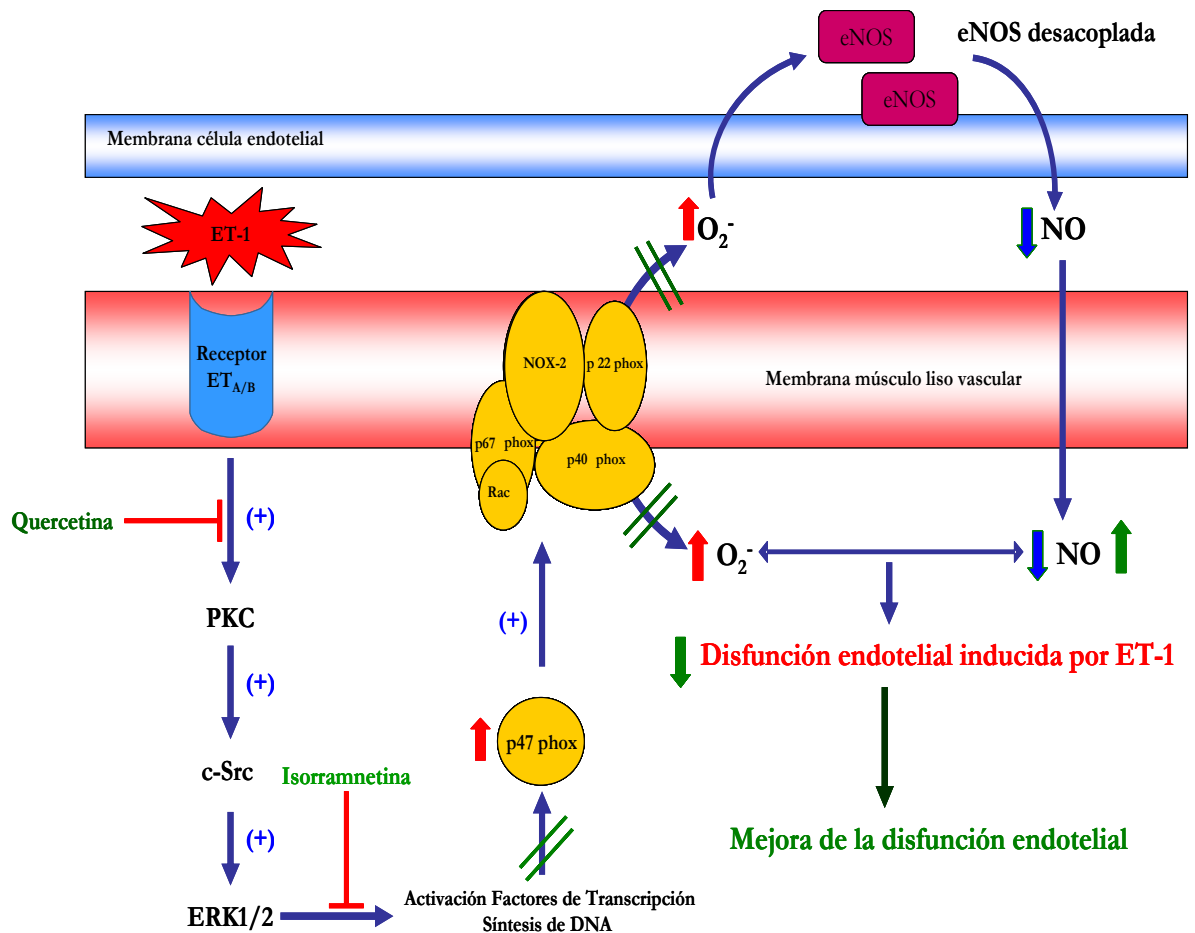


Figura 30. Esquema de disfunción endotelial inducida por endotelina-1(ET-1) y efecto sobre ella de los flavonoides quercetina e isorramnetina. Cuando ET-1 se une a sus receptores (ET_{A/B}) induce la activación de una vía de señalización en la que está implicada la proteína quinasa C (PKC), la tirosina quinasa no acoplada a receptor (c-Src) y la proteína quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2). La activación de esta vía de señalización induce una mayor expresión de la subunidad p47^{phox} de NAD(P)H oxidasa en las células del músculo liso vascular y en las células endoteliales, y una mayor producción de anión superóxido (O₂⁻) por activación de la NAD(P)H oxidasa y un desacoplamiento de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Esto se traduce en una disminución de la biodisponibilidad de NO y la aparición de disfunción endotelial (flechas en azul). Quercetina e isorramnetina reducen la sobre-expresión de p47^{phox}, disminuyen la producción de anión superóxido y así aumentan la biodisponibilidad de NO, mejorando la disfunción endotelial (flechas en verde), debido a que actúan inhibiendo la vía de señalización inducida por ET-1. Abreviaturas y símbolos: En azul, efectos debidos a disfunción endotelial. En verde, efectos debidos a los flavonoides. (+): Activación.

3. Limitaciones del estudio.

3.1. Este estudio pretende justificar los efectos protectores del consumo dietético de quercetina sobre la disfunción endotelial que aparece en modelos animales asociados a altos niveles plasmáticos y/o vasculares de ET-1. Sin embargo, es conocido que tras la administración oral de este bioflavonoides, los niveles plasmáticos de quercetina y de su metabolito metilado isoramnetina, en forma de genina, son muy bajos, inferiores a los utilizados en este estudio. Este dato limita el valor fisiológico de los resultados obtenidos. Sin embargo, hay que destacar que un reciente estudio de nuestro grupo de investigación, demuestra que los metabolitos plasmáticos de quercetina en forma de glucurónido o de sulfato, previenen la disfunción endotelial originada en anillos aórticos de rata incubados con ET-1 durante 4 horas (Lodi *et al.*, 2009). Es posible que en este periodo de incubación, estos metabolitos se transformen en geninas libres por acción de glucuronidasas y/o sulfatasas tisulares, tal y como ha sido sugerido previamente por Shimoi y cols. (2001). Esta hipótesis deberá ser constatada en estudios posteriores.

3.2. Para el análisis de la vía de señalización de ET-1 se han utilizado fármacos inhibidores selectivos de PKC, c-Src y MAPKs. Estudios paralelos en los que se regula a la baja la expresión de PKC, por ejemplo, mediante estimulación continua con PMA durante 24 horas, o en los que se consigue un silenciamiento génico de c-Src o ERK1/2 en aorta de rata, mediante la tecnología de si-ARNm, nos permitirían confirmar la participación de estas proteínas en el aumento de la actividad NAD(P)H oxidasa inducido por ET-1.

3.3. Hemos demostrado que la ET-1 produce un aumento en la expresión de la subunidad p47^{phox} de la NAD(P)H oxidasa. Esta subunidad citosólica aumenta la actividad de este sistema enzimático únicamente cuando se transloca a la membrana y se une al resto de componentes membranales (Nox y p22^{phox}). En nuestro estudio se ha demostrado únicamente la cantidad total de proteína, pero no si está localizada en forma activa en la

membrana celular. Para ello, serían necesarios estudios en los que se separan las fracciones citosólica y membranal de esta subunidad p47^{phox} y/o estudios de co-precipitación de p47^{phox}-p22^{phox}, que aclararían el grado de participación de p47^{phox} en el incremento de la actividad de este sistema generador de O₂⁻ inducido por ET-1.

Conclusiones.

Conclusiones.

1. La ET-1 reduce la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio inducida por acetilcolina e incrementa la respuesta vasoconstrictora de fenilefrina, en anillos aórticos de rata. Esta disfunción endotelial se debe al aumento de la producción vascular de radicales O_2^- procedentes del sistema NAD(P)H oxidasa y de la eNOS desacoplada.
2. El desacoplamiento de la eNOS es un acontecimiento posterior al aumento de la actividad NAD(P)H oxidasa inducido por ET-1, que deriva de la sobreexpresión de la subunidad citosólica p47^{phox}.
3. La vía de señalización de ET-1 para aumentar la generación de radicales O_2^- a través del sistema NAD(P)H oxidasa incluye, de forma secuencial, la activación de PKC, c-Src y ERK1/2.
4. El flavonoide quercetina y su metabolito plasmático, isorramnetina, previenen la disfunción endotelial originada por ET-1. Este efecto está relacionado con la reducción de la generación de radicales O_2^- , mediada por la inhibición de la sobreexpresión de la subunidad citosólica p47^{phox}, que conduce a una menor actividad NAD(P)H oxidasa y el consiguiente menor desacoplamiento de la eNOS.
5. El efecto preventivo de quercetina sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1, se debe a su capacidad inhibidora de PKC, mientras que isorramnetina actúa en un paso posterior en la vía de señalización, inhibiendo la proteína kinasa activada por mitógeno, ERK1/2.

Conclusions.

Conclusions.

1. ET-1 reduces endothelium-dependent relaxant response to acetylcholine and increase the vasoconstrictor response to phenylephrine in rat aortic rings. This endothelial dysfunction is due to increase vascular O_2^- production via NAD(P)H oxidase and uncoupled eNOS.
2. The eNOS uncoupling is a following step to increase NAD(P)H oxidase activity induced by ET-1, which is due to up-regulation of its cytosolic subunit p47^{phox}.
3. The signaling pathway for ET-1 to lead increased vascular O_2^- generation through NAD(P)H oxidase involves, in a sequential manner, PKC, c-Src and ERK1/2 activation.
4. The flavonoid quercetin and its cytoplasmic metabolite isorhamnetin prevent ET-1-induced endothelial dysfunction. This effect is related with the reduction of vascular O_2^- production through down-regulation of the cytosolic subunit p47^{phox}, which result to reduced NAD(P)H oxidase activity and the subsequent lesser eNOS uncoupling.
5. The preventive effect of quercetin in endothelial dysfunction induced by ET-1 is related to its ability to inhibit PKC, whereas isorhamnetin acts downstream of PKC in the signaling pathway, inhibiting the mitogen-activated protein kinase, ERK1/2.

Bibliografía.

Bibliografia.

Alonso D and Radomski MW. The Nitric Oxide-Endothelin-1 Connection. *Heart Failure Reviews* 2003; 8:107–15.

Alp NJ and Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:413–20.

Agapitov AV and Haynes WG. Role of endothelin in cardiovascular disease *JRAAS* 2002; 3:1-15.

Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H, Iida M. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 2004; 109:227–33.

Amiri F, Viridis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL, Schiffrin EL. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodelling and endothelial dysfunction. *Circulation* 2004; 110:2233-40.

Andriambelason E, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33:248–54.

Andriambelason E, Magnier C, Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr* 1998; 128:2324–33.

Ansari HR, Kaddour-Djebbar I, Abdel-Latif AA. Involvement of Ca²⁺ channels in endothelin-1-induced MAP kinase phosphorylation, myosin light chain phosphorylation and contraction in rabbit iris sphincter smooth muscle. *Cell Signal* 2004; 16:609-19.

Aoi W, Niisato N, Miyazaki H, Marunaka Y. Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315:892-6.

Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH, Karanja N. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *N Engl J Med* 1997; 33:1117–24.

Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinae N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr* 2000; 130:2243-50.

Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348:730-32.

Araki S, Haneda M, Togawa M, Kikkawa R. Endothelin-1 activates c-Jun NH2-terminal kinase in mesangial cells. *Kidney Int* 1997; 51:631-9.

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

Aura AM, O'Leary KA, Williamson G, Ojala M, Bailey M, Puupponen-Pimiä R, Nuutila AM, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *J Agric Food Chem* 2002; 50:1725-30.

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.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93:1464-76.

Barton M, Traupe T, Haudenschild CC. Endothelin, hipercolesterolemia and atherosclerosis. *Coron Artery Dis* 2003; 14:477-90.

Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, Shaw S, Münter K, Lüscher TF. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:14367-72.

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

Bengtson SHM, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30:849-54.

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.

- Berry CE and Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 2004; 555:589–606.
- Best PJ, McKenna CJ, Hasdai D, Holmes DR Jr, Lerman A. Chronic endothelin receptor antagonism preserves coronary endothelial function in experimental hypercholesterolemia. *Circulation* 1999; 99:1747–52.
- Blanc A, Pandey NR, Srivastava AK. Synchronous activation of ERK1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease. *Int J Mol Med* 2003; 11:229–34.
- Böhm F and Pernow J. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2007; 76:8–18.
- Böhm F, Settergren M, Pernow J. Vitamin C blocks vascular dysfunction and release of interleukin-6 induced by endothelin-1 in humans in vivo. *Atherosclerosis* 2007; 190:408–15.
- Bouallegue A, Daou GB, Srivastava AK. Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Curr Vasc Pharmacol* 2007; 5:45–52.
- Boulanger C and Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990; 85:587–90.
- Bousette N and Giaid A. Endothelin-1 in atherosclerosis and other vasculopathies. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81:578–87.
- Broncel M, Koziróg-Kolacińska M, Andryskowski G, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Owczarczyk A, Chojnowska-Jeziarska J. Effect of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on blood pressure, concentration of endothelin-1 and lipids in patients with metabolic syndrome. *Pol Merkur Lekarski* 2007; 23:116–9.
- Browatzki M, Schmidt J, Kubler W, Kranzhofer R. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 2000; 95:98–105.
- Brunner F, Brás-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: Essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 2006; 111:508–31.
- Bugiardini R, Manfrini O, Pizzi C, Fontana F, Morgagni G. 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, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2003; 24:471-8.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-4.

Callera GE, Tostes RC, Yogi A, Montezano AC, Touyz RM. Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hipertensión involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110:243-53.

Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S, Schiffrin EL. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension* 2005; 45:773-9.

Callera GE, Montezano AC, Touyz RM, Zorn TM, Carvalho MH, Fortes ZB, Nigro D, Schiffrin EL, Tostes RC. ET_A receptor blockade decreases adhesion molecules expression and cardiac injury in Doca-salt hypertension. *Hypertension* 2004; 43:872-9.

Callera GE, Touyz RM, Teixeira SA, Muscara MN, Helena M, Carvalho C, Fortes ZB, Nigro D, Schiffrin EL, Tostes RC. ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension. *Hypertension* 2003; 42:811-7.

Cardillo C, Campia U, Bryant MB, Panza JA. Increased activity of endogenous endothelin in patients with type II diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106:1783-7.

Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO 3rd, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 1997; 30:57-63.

Carlstrom J, Symons JD, Bruno RS, Litwin SE, Jalili T. A quercetin supplemented diet does not prevent cardiovascular complications in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 2007; 137:628-33.

Cernacek P, Stewart DJ, Monge JC, Rouleau JL. The endothelin system and its role in acute myocardial infarction. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81:598-606.

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: R117-24.

Chamseddine AH and Miller JFJ. gp91phox Contributes to NADPH oxidase activity in aortic fibroblasts, but not smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H2284–H2289.

Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res* 1993; 13:2165–70.

Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M, Bodin F, Rubin LJ. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2001; 358:1119-23.

Chen D, Balyakina EV, Lawrence M, Christman BW, Meyrick B. Cyclooxygenase is regulated by ET-1 and MAPKs in peripheral lung microvascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284:L614-21.

Chen Y, Sin Y, Lin J, Zhou A, Wang H. Research on the mechanism of endothelin inflammatory effects on human mesangial cells. *Chin Med J* 1997; 110:530-4.

Cheng CM, Hong HJ, Liu JC, Shih NL, Juan SH, Loh SH, Chan P, Chen JJ, Cheng TH. Crucial role of extracellular signal-regulated kinase pathway in reactive oxygen species-mediated endothelin-1 gene expression induced by endothelin-1 in rat cardiac fibroblasts. *Mol Pharmacol* 2003; 63:1002-11.

Chiloeches A, Paterson HF, Marais R, Clerk A, Marshall CJ, Sugden PH. Regulation of Ras-GTP loading and Ras-Raf association in neonatal rat ventricular myocytes by G protein-coupled receptor agonists and phorbol ester. Activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by phorbol ester is mediated by Ras. *J Biol Chem* 1999; 274:19762-70.

Chu TS, Wu MS, Wu KD, Hsieh BS. Endothelin-1 activates MAPKs and modulates cell cycle proteins in OKP cells. *J Formos Med Assoc* 2007; 106:273-80.

Clive Rosendorff. Endothelin, vascular hypertrophy and hypertension. *Cardiovasc Drugs Ther* 1996; 10:795-802.

Conquer JA, Maiani G, Azzini E, Raguzzini A, Holub BJ. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *J Nutr* 1998; 128:593-7.

Cooke JP, Rossitch E, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 1991; 88:1663-71.

Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Viseu Dos Santos AC, Wood EG, Carrier MJ. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* 2001; 414:863–4.

Cozza EN, Gomez-Sanchez CE, Foecking M, Chiou S. Endothelin binding to cultured calf adrenal zona glomerulosa cells and stimulation of aldosterone secretion. *J Clin Invest* 1989; 84:1032-5.

Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, Remesy C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J Agric Food Chem* 2002; 50:618-21.

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

Cruzado MC, Risler NR, Miatello RM, Yao G, Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase activity during the development of hypertension: effect of angiotensin II and role of insulinlike growth factor-1 receptor transactivation. *Am J Hypertens* 2005; 18:81–7.

Cunningham ME, Huribal M, Bala RJ, McMillen MA. Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines. *Crit Care Med* 1997; 25:958-64.

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

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

Dajas F, Rivera F, Blasina F, Arredondo F, Echeverry C, Lafon L, Morquio A, Heizen H. Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotox Res* 2003; 5:425–32.

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.

Daou GB and Srivastava AK. Reactive oxygen species mediate Endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2004; 37:208-15.

Davignon J and Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109:III27-32.

Day AJ, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, Williamson G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 1199-206.

Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MR, Williamson G. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res* 2001; 35:941-52.

de Andrade RL, Meirelles LM, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effect of enalapril in spontaneously hypertensive rats cardiac remodeling with nitric oxide synthesis blockade. *J Cell Mol Med* 2002; 6:599-608.

de Rijke YB, Demacker PN, Assen NA, Sloots L M, Katan MB, Stalenhoef AF. Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoproteins in volunteers. *Am J Clin Nutr* 1996; 63:329-34.

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.

Denault JB, Claing A, D Orleans-Juste P, Sawamura T, Kido T, Masaki T, Leduc R. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett* 1995; 362:276-80.

Dhaun N, Goddard J, Webb DJ. The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:943-55.

Dikic I, Tokiwa G, Ley S, Courtneidge SA, Schlessinger J. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 1996; 383:547-50.

D'Orleans-Juste P, Plante M, Honore JC, Carrier E, Labonte J. Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharm* 2003; 81:503-10.

Dong F, Zhang X, Wold LE, Ren Q, Zhang Z and Ren, J. Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br J Pharmacol* 2005; 145:323-33.

Duarte J, Andriambelason E, Diebolt M, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilatation. *Physiol Res* 2004; 53:595-602.

Duarte J, Jiménez R, O'Valle F, Galisteo M, Pérez-Palencia R, Vargas F, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J Hypertens* 2002; 20:1843-54.

Duarte J, Galisteo M, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 2001a; 221:155-60.

Duarte J, Pérez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2001b; 133:117-24.

Duarte J, Jiménez R, Villar IC, Pérez-Vizcaino F, Jiménez J, Tamargo J. Vasorelaxant effects of the bioflavonoid chrysin in isolated rat aorta. *Planta Med* 2001c; 67:567-9.

Duarte J, Pérez-Vizcaino F, Utrilla P, Jiménez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol* 1993a; 24: 857-62.

Duarte J, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Jiménez J, Tamargo J. Vasodilator effects of quercetin on isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1993b; 239:1-7.

Duerrschmidt N, Wippich N, Goettsch W, Broemme HJ, Morawietz H. Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269:713-7.

Dupuis J, Schwab AJ, Simard A, Cernacek P, Stewart DJ, Goresky CA. Kinetics of endothelin-1 binding in the dog liver microcirculation in vivo. *Am J Physiol* 1999; 277:905-14.

Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 1996; 81:1510-5.

Eddahibi S, Springall D, Mannan M, Carville C, Chabrier PE, Levame M, Raffestin B, Polak J, Adnot S. Dilator effect of endothelins in pulmonary circulation: changes associated with chronic hypoxia. *Am J Physiol* 1993; 265:L571- 80.

Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD, Jalili T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr* 2007; 137:2405-11.

Edwards RM, Trizna W, Ohlstein EH. Renal microvascular effects of endothelin. *Am J Physiol* 1990; 259:F217-21.

Elmarakby AA, Loomis ED, Pollock JS, Pollock DM. NADPH oxidase inhibition attenuates oxidative stress but not hypertension produced by chronic ET-1. *Hypertension* 2005; 45:283–7.

Emori T, Hirata Y, Imai T, Eguchi S, Kanno K, Marumo F. 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, Kanno K, Eguchi S. Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* 1991; 18:165-70.

Endemann DH and Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:1983-92.

Favot L, Martin S, Keravis T, Andriantsitohaina R, Lugnier C. Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2003; 59:479–87.

Fei J, Viedt C, Soto U, Elsing C, Jahn L, Kreuzer J. Endothelin-1 and smooth muscle cells: induction of jun amino-terminal kinase through an oxygen radical-sensitive mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1244-9.

Ferrandiz ML and Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents actions* 1991; 32:283-8.

Filep JG, Bodolay E, Sipka S, Gyimesi E, Csipö I, Szegedi G. Plasma endothelin correlates with antiendothelial antibodies in patients with mixed connective tissue disease. *Circulation* 1995; 92:2969–74.

Firth JD, Ratcliffe PJ, Raine AE, Ledingham JG. Endothelin: an important factor in acute renal failure?. *Lancet* 1988; 2:1179-82.

Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol* 1993; 265:H774-8.

Forstermann U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem* 2006; 387:1521-33.

Foschi M, Chari S, Dunn MJ, Sorokin A. Biphasic activation of p21ras by endothelin-1 sequentially activates the ERK cascade and phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J* 1997; 16:6439-51.

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

Fukami K. Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J Biochem (Tokyo)* 2002; 131:293-9.

Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M and Nishikibe M. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:1461-5.

Galiè N, Manes A, Uguccioni L, Serafini F, De Rosa M, Branzi A, Magnani B. Primary pulmonary hypertension: insights into pathogenesis from epidemiology. *Chest* 1998; 114:184S-94S.

Galis ZS and Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; 90:251-62.

Galisteo M, Garcia-Saura MF, Jiménez R, Villar IC, Wangenstein R, Zarzuelo A, Vargas F, Duarte J. Effects of quercetin treatment on vascular function in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Comparative study with verapamil. *Planta Med* 2004a; 70:334-41.

Galisteo M, Garcia-Saura MF, Jiménez R, et al. Effects of chronic quercetin treatment on antioxidant defence system and oxidative status of deoxycorticosterone acetate-salt-hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 2004b; 259:91-9.

Garcia-Saura MF, Galisteo M, Villar IC, Bermejo A, Zarzuelo A, Vargas F, Duarte J. Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. *Mol Cell Biochem* 2005; 270:147-55.

Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT. Intestinal transport involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 2000; 130:2765-71.

Gee JM, DuPont MS, Rhodes MJC, Johnson IT. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Rad Biol Med* 1998; 25:19-25.

Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association or tea flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study. *Am J Clin Nutr* 2002; 75:880-6.

Giaid A, Michel RP, Stewart DJ, Sheppard M, Corrin B, Hamid Q. Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* 1993a; 341:1550-4.

Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993b; 328:1732-9.

Ginnan R, Singer HA. CaM kinase II-dependent activation of tyrosine kinases and ERK 1/2 in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282:C754-61.

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.

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.

Gonzalez-Pacheco FR, Caramelo C, Castilla MA, Deudero JJ, Arias J, Yague S, Jiménez 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.

Gorlach C, Benyo Z, Wahl M. Endothelin-1-induced contraction in cerebral vessels mediated by phospholipase C/protein kinase C cascade. *Kidney Int Suppl* 1998; 67:S224-5.

Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H, Veit M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol* 2001; 41:492-9.

Gray GA. Generation of endothelin. In: Gray GA, Webb DJ (eds.). *Molecular Biology and Pharmacology of the Endothelins*. Austin: RG Landes 1995:13-32.

Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* 2004; 90:491-3.

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

Griendling KK, Tsuda T, Alexander RW. Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1989; 264:8237-40.

Grover AK, Samson SE, Robinson S, Kwan CY. Effects of peroxynitrite on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump in pig coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284:C294-301.

Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1987; 36:317-22.

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:H1396-403.

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; 106:653-8.

Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001; 37:529-34.

Hashimoto Y, Ziff M, Hurd ER. Increased endothelial cell adherence, aggregation, and superoxide generation by neutrophils incubated in systemic lupus erythematosus and Felty's syndrome sera. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1409-18.

Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2744-52.

Haystead TA, Dent P, Wu J, Haystead CM, Sturgill TW. Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett* 1992; 306:17-22.

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

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

Heitzer T, Wenzel U, Hink U, et al. Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int* 1999; 55:252–60.

Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet* 1997; 349:699.

Hertog MGL, Hollman PCH, Putte van de B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea, infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem* 1996; 41:1242-6.

Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 1993a; 20:21-9.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993b; 342:1007–11.

Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1985; 248:C550–6.

Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, Hiroki J, Mukai Y, Morikawa K, Ichiki T, Takahashi S, Takeshita A. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res* 2003; 93:767–75.

Hofman FM, Chen P, Jeyaseelan R, Incardona F, Fisher M, Zidovetzki R. Endothelin-1 induces production of the neutrophil chemotactic factor interleukin-8 by human brain-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92:3064–72.

Hollman PC, Katan MB. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic Res* 1999; 31: S75-80.

Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Gaid A, Yanagisawa M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 1994; 79:1267–76.

Howard PG, Plumpton C, Davenport AP. Anatomical localisation and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *J Hypertens* 1992; 10:1379-86.

Huang H, Jia Q, Ma J, Qin G, Chen Y, Xi Y, Lin L, Zhu W, Ding J, Jiang H, Liu H. Discovering novel quercetin-3-O-amino acid-esters as a new class of Src tyrosine kinase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2009; 44:1982-8.

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

Husain S, Abdel-Latif AA. Role of protein kinase C alpha in endothelin-1 stimulation of cytosolic phospholipase A2 and arachidonic acid release in cultured cat iris sphincter smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1392:127-44.

Huxley RR and Neil HA. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57:904-8.

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:H2167-72.

Ibarra M, Pérez-Vizcaíno F, Cogolludo A, Duarte J, Zaragoza-Arnez F, López-López JG, Tamargo J. Cardiovascular effects of isorhamnetin and quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rat atria. *Planta Med* 2002; 68:307–10.

Iglarz M and Clozel M. Mechanism of ET-1-induced endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 50:621-8.

Iglarz M, Touyz RM, Amiri F, Lavoie MF, Diep QN, Schiffrin EL. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor- α and - γ activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:45– 51.

Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Lett* 2001; 171:11–6.

Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S, Eto M, Ako J, Liang YQ, Sudoh N, Hosoda K, Nakahara K, Toba K, Ouchi Y. Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation* 2000; 101:805-11.

Imai T, Hirata Y, Emori T, Marumo F. Heparin has an inhibitory effect on endothelin-1 synthesis and release by endothelial cells. *Hypertension* 1993; 21:353-8.

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyachi T. The human endothelin family-3 structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by 3 separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2863-7.

Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 2000; 87:179–83.

Ishida M, Ishida T, Thomas SM, Berk BC. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998; 82:7–12.

Ishihata A, Tasaki K, Katano Y. Involvement of p44/42 mitogen-activated protein kinases in regulating angiotensin II- and endothelin-1-induced contraction of rat thoracic aorta. *Eur J Pharmacol* 2002; 445:247-56.

Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol* 1988; 255:H970-3.

Jiménez R, López-Sepúlveda R, Kadmiri M, Romero M, Vera R, Sánchez M, Vargas F, O'Valle F, Zarzuelo A, Dueñas M, Santos-Buelga C, Duarte J. Polyphenols restore endothelial function in DOCA-salt hypertension: role of endothelin-1 and NADPH oxidase. *Free Radic Biol Med* 2007; 43:462-73.

Johnström P, Fryer TD, Richards HK, Harris NG, Barret O, Clark JC, Pickard JD, Davenport AP. Positron emission tomography using 18F-labelled endothelin-1 reveals prevention of binding to cardiac receptors owing to tissue-specific clearance by ETB receptors in vivo. *Br J Pharmacol* 2005; 144:115–22.

Juan CC, Shen YW, Chien Y, Lin YJ, Chang SF, Ho LT. Insulin infusion induces endothelin-1-dependent hypertension in rats. *Am J Physiol* 2004; 287:948-54.

Kamata K, Kanie N, Matsumoto T, Kobayashi T. Endothelin-1-induced impairment of endothelium-dependent relaxation in aortas isolated from controls and diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44:S186–90.

Kamoun WS, Karaa A, Kresge N, Merkel SM, Korneszczyk K, Clemens MG. LPS inhibits endothelin-1-induced endothelial NOS activation in hepatic sinusoidal cells through a negative feedback involving caveolin-1. *Hepatology* 2006; 43:182–90.

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

Karaa A, Kamoun WS, Clemens MG. Oxidative stress disrupts nitric oxide synthase activation in liver endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2005; 39:1320–31.

Kawaguchi H, Sawa H, Yasuda H. Effect of endothelin on angiotensin converting enzyme in cultured pulmonary artery endothelial cells. *J Hypertens* 1991; 9:171-4.

Kawanabe Y, Hashimoto N, Masaki T. Involvements of voltage- independent Ca^{2+} channels and phosphoinositide 3-kinase in endothelin-1-induced Pyk2 tyrosine phosphorylation. *Mol Pharmacol* 2003; 63:808-13.

Kawanabe Y, Hashimoto N, Masaki T. Effects of phosphoinositide 3-kinase on endothelin-1-induced activation of voltage- independent Ca^{2+} channels and vasoconstriction. *Biochem Pharmacol* 2004; 68:215-21.

Kedzierski RM and Yanagisawa M. Endothelin System: The double-edged sword in health and disease. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:851-76.

King AJ, Brenner BM, Anderson S. Endothelin: a potente renal and systemic vasoconstrictor peptide. *Am J Physiol* 1989; 256:F1051-8.

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.

Kishi F, Minami K, Okishima N, Murakami M, Mori S, Yano M, Niwa Y, Nakaya Y, Kido H. Novel 31-amino acid length endothelins cause constriction of vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248:387-90.

Kodama H, Fukuda K, Takahashi E, Tahara S, Tomita Y, Ieda M, Kimura K, Owada KM, Vuori K, Ogawa S. Selective involvement of p130Cas/Crk/Pyk2/c-Src in endothelin-1-induced JNK activation. *Hypertension* 2003; 41:1372-9.

Kodama H, Fukuda K, Takahashi T, Sano M, Kato T, Tahara S, Hakuno D, Sato T, Manabe T, Konishi F, Ogawa S. Role of EGF Receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:139-50.

Koga H, Terasawa H, Nuno H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67phox participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1999; 274:25051–60.

Kohan DE. The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15:34–40.

Kohno 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; 70:241-7.

Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1988; 238:249-52.

Korth P, Bohle RM, Corvol P, Pinet F. Cellular distribution of endothelin-converting enzyme-1 in human tissues. *J Histochem Cytochem* 1999; 47:447-62.

Kottra G and Daniel H. Flavonoid-glycosides are not transported by the human Na⁺/glucose transporter when expressed in *Xenopus leavis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322:829-35

Kovacic B, Ilić D, Damsky CH, Gardner DG. c-Src activation plays a role in endothelin-dependent hypertrophy of the cardiac myocyte. *J Biol Chem* 1998; 273:35185-93.

Kuchan MJ and Frangos JA. Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1993; 264:H150-6.

Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1976; 24:117-91.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81:807-69.

Kyriakis JM, Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* 1996; 18:567-77.

Kwon S, Lee WJ, Fang LH, Kim B, Ahn HY. Mitogen-activated protein kinases partially regulate endothelin-1-induced contractions through a myosin light chain phosphorylation-independent pathway. *J Vet Med Sci* 2003; 65:225-30.

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.

Laplante MA and de Champlain J. The interrelation of the angiotensin and endothelin systems on the modulation of NAD(P)H oxidase. *Can J Physiol Pharmacol* 2006; 84:21-8.

- Laplante MA, Wu R, Moreau P, de Champlain J. Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats. *Free Radic Biol Med* 2005; 38:589–96.
- Lapouge K, Smith SJ, Walker PA, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Rittinger K. Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac. *GTP Mol Cell* 2000; 6:899–907.
- Lassègue B and Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension: an update. *Am J Hypertens* 2004; 17:852–60.
- Lassègue B and Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285:R277-97.
- Lassègue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signalling pathways. *Circ Res* 2001; 88:888–94.
- Lerman A, Webster MW, Chesebro JH, Edwards WD, Wei CM, Fuster V, Burnett JC Jr. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in hypercholesterolemic pigs. *Circulation* 1993; 88:2923–8.
- Li L, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. Vasopressin induces vascular superoxide via endothelin-1 in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 2003a; 41:663-8.
- Li L, Watts SW, Banes AK, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced vasoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 2003b; 42:316-21.
- Li L, Chu Y, Fink GD, Engelhardt JF, Heistad DD, Chen AF. Endothelin-1 stimulates arterial VCAM-1 expression via NADPH oxidase-derived superoxide in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 2003c; 42:997-1003.
- 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* 2003d; 107:1053–8.
- Li JM and 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 TC, Tong LJ, Pang YZ, Liu XH, Wang XQ, Hu DY, Tang CS. Endothelin- stimulated proliferation of thoracic artery smooth muscle cell involves activation of mitogen-activated protein kinase. *Sheng Li Xue Bao* 1996; 48:337-42.

Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001; 104:365–72.

Lima J, Fonollosa V, Fernández-Cortijo J, Ordi J, Cuenca R, Khamashta MA, Vilardell M, Simeón CP, Picó M. Platelet activation, endothelial cell dysfunction in the absence of anticardiolipin antibodies in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1991; 18:1833–6.

Lodi F, Jiménez R, Moreno L, Kroon PA, Needs PW, Hughes DA, Santos-Buelga C, González-Paramas A, Cogolludo A, López-Sepulveda R, Duarte J, Pérez-Vizcaíno F. Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis* 2009; 204:34-9.

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

Loomis ED, Sullivan JC, Osmond DA, Pollock DM, Pollock JS. Endothelin mediates superoxide production and vasoconstriction through activation of NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide synthase in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315:1058–64.

López-López G, Moreno L, Cogolludo A, Galisteo M, Ibarra M, Duarte J, Lodi F, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F. Nitric oxide NO; scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol* 2004; 65:851–9.

Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315:1046–51.

Luttrell DK and Luttrell LM. Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. *Oncogene* 2004; 23:7969-78.

Ma YC and Huang XY. Novel regulation and function of Src tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59:456-62.

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

Makino A and Kamata K. Elevated plasma endothelin-1 level in streptozotocin-induced diabetic rats and responsiveness of the mesenteric arterial bed to endothelin-1. *Br J Pharmacol* 1998; 123:1065–72.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:230S–42S.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:727-47.

Martin GS. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:467-75.

Martin S, Giannone G, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Delphinidin, an active compound of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis. *Br J Pharmacol* 2003; 139:1095–102.

Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. *Nutr Hosp* 2002; 17:271-8.

Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164:74–80

McCall DO, McGartland CP, McKinley MC, Patterson CC, Sharpe P, McCance DR, Young IS, Woodside JV. Dietary intake of fruits and vegetables improves microvascular function in hypertensive subjects in a dose-dependent manner. *Circulation* 2009; 119:2153-60.

McNair LL, Salamanca DA, Khalil RA. Endothelin-1 promotes Ca²⁺ antagonist-insensitive coronary smooth muscle contraction via activation of epsilon-protein kinase C. *Hypertension* 2004; 43:897-904.

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 M, Lehnart S, Pieske B, Schlottauer K, Munk S, Holubarsch C, Just H, Hasenfuss G. Influence of endothelin 1 on human atrial myocardium-myocardial function and subcellular pathways. *Basic Res Cardiol* 1996; 91:86–93.

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

- Milan J, Charalambous C, Elhag R, Chen TC, Li W, Guan S, Hofman FM, Zidovetzki R. Multiple signaling pathways are involved in endothelin-1-induced brain endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 291:C155-64.
- Miller AW, Tulbert C, Puskar M, Busija DW. Enhanced endothelin activity prevents vasodilation to insulin in insulin resistance. *Hypertension* 2002; 40:78-82.
- Miller VM and Burnett JC Jr. Modulation of NO and endothelin by chronic increases in blood flow in canine femoral arteries. *Am J Physiol* 1992; 263:H103-8.
- Minshall RD, Sessa WC, Stan RV, Anderson RG, Malik AB. Caveolin regulation of endothelial function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285:L1179-83.
- Mishra R, Wang Y, Simonson MS. Cell cycle signaling by endothelin-1 requires Src nonreceptor protein tyrosine kinase. *Mol Pharmacol* 2005; 67:2049-56.
- Miyauchi T and Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1999; 61:391-415.
- Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 2002; 90:E58-65.
- Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A. Complexes of Ras-GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 1993; 260:1658-61.
- Moon JH, Tsushida T, Nakahara K, Terao J. Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:1274-85.
- Moon SK, Cho GO, Jung SY, Gal SW, Kwon TK, Lee YC, Madamanchi NR, Kim CH. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: Role of ERK1/2, cell-cycle regulation and matrix metalloproteinase-9. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301:1069-78.
- Morawietz H, Duerschmidt N, Niemann B, Galle J, Sawamura T, Holtz J. Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103:9S-12S.

Morawietz H, Duerschmidt N, Niemann B, Galle J, Sawamura T, Holtz J. Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:961–5.

Moreau P and Schiffrin EL. Role of endothelins in animal models of hypertension: focus on cardiovascular protection. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81:511–21.

Morise T, Takeuchi Y, Kawano M, Koni I, Takeda R. Increased plasma levels of immunoreactive endothelin and vonWillebrand factor in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1995; 18:87–9.

Muller DN, Fiebeler A, Park JK, Dechend R, Luft FC. Angiotensin II and endothelin induce inflammation and thereby promote hypertension-induced end-organ damage. *Clin Nephrol* 2003a; 60:S2–12.

Muller L, Barret A, Etienne E, Meidan R, Valdenaire O, Corvol P, Tougaard C. Heterodimerization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease. *J Biol Chem* 2003b; 278:545–55.

Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1551–7.

Munzel T, Li H, Mollnau H, Hink U, Matheis E, Hartmann M, Oelze M, Skatchkov M, Warnholtz A, Duncker L, Meinertz T, Forstermann U. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res* 2000; 86:E7-12.

Nadar S, Blann AD, Lip GY. Antihypertensive therapy and endothelial function. *Curr Pharm Des* 2004; 10:3607-14.

Nakajima K, Kumagaye S, Nishio H, Kuroda H, Watanabe TX, Kobayashi Y, Tamaoki H, Kimura T, Sakakibara S. Synthesis of endothelin-1 analogues, endothelin-3, and sarafotoxin S6b: structure-activity relationships. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13:S8-12.

Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:10045-8.

Nam S, Smith DM, Dou QP. Tannic acid potently inhibits tumor cell proteasome activity, increases p27 and Bax expression, and induces G1 arrest and apoptosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:1083–8.

- Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols cause endothelium dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310:371–7.
- Neylon CB. Vascular biology of endothelin signal transduction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26:149-53.
- Nicholson SK, Tucker GA, Brameld JM. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proceedings of Nutrition Society* 2008; 67:42-7.
- Niemann B, Rohrbach S, Catar RA, Muller G, Barton M, Morawietz H. Native and oxidized low-density lipoproteins stimulate endothelinconverting enzyme-1 expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334:747–53.
- Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD. The p67phox activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* 1999; 274:22999–3005.
- O'Brien RF, Robbins RJ, McMurtry IF. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J Cell Physiol* 1987; 132:263–70.
- Oda Y, Renaux B, Bjorge J, Saifeddine M, Fujita DJ, Hollenberg MD. c-Src is a major cytosolic tyrosine kinase in vascular tissue. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 77:606-17.
- Ogita H and 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.
- Ozgova S, Hermanek J, Gut I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:1127-237.
- Pacher R, Stanek B, Hulsmann M, Koller-Strametz J, Berger R, Schuller M, Hartter E, Ogris E, Frey B, Heinz G, Maurer G. Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:633–41.
- Palloshi 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.

Pan MH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Zhu NQ, Ho CT, Lin JK. Induction of apoptosis by the oolong tea polyphenol theasinensin A through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in human U937 cells. *J Agric Food Chem* 2000; 48:6337-46.

Panza JA, Casino PR, Badar DM, Quyyumi AA. Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. *Circulation* 1993; 87:1475-81.

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.

Patriarca P, Cramer R, Marussi M, Rossi F, Romeo D. Mode of activation of granule-bound NADPH oxidase in leucocytes during phagocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1991; 237:335-8.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22:153-83.

Pérez-Vizcaíno F, Duarte J, Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: Effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res* 2006; 40:1054-65.

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

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, Maio R, Tripepi G, Zoccali C. Endothelial dysfunction and mild renal insufficiency in essential hypertension. *Circulation* 2004; 110:821-5.

Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001; 104:191-6.

- Picq M, Dubois M, Prigent AF, Nemoz G, Pacheco H. Inhibition of the different cyclic nucleotide phospho-esterase isoforms separated from rat brain by flavonoid compounds. *Biochem Int* 1989; 18:47–57.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:639-50.
- Pietta P, Simonetti P, Roggi C. Dietary flavonoids and oxidative stress. In: Kumpulainen JT, Salonen JT, eds. *Natural antioxidants and food quality in atherosclerosis and cancer prevention*. London: Royal Society of Chemistry 1996: 249-55.
- Pignatelli P, Di Santo S, Buchetti B, Sanguigni V, Brunelli A, Violi F. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPHoxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J* 2006; 20:1082–9.
- Piskula MK and Terao J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr* 1998; 128:1172-8.
- Plumpton C, Champeney R, Ashby MJ, Kuc RE, Davenport AP. Characterization of endothelin isoforms in human heart: endothelin-2 demonstrated. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22:S26-8.
- Pueyo ME, Arnal JF, Rami J, Michel JB. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; 274:C214–20.
- Qamirani E, Ren Y, Kuo L, Hein TW. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:995–1001.
- Quehenberger P, Exner M, Sunder-Plassmann R, Ruzicka K, Bieglmayer C, Endler G, Muellner C, Speiser W, Wagner O. Leptin induces endothelin-1 in endothelial cells in vitro. *Circ Res* 2002; 90:711–8.
- Quyyumi AA. Prognostic value of endothelial function. *Am J Cardiol*. 2003; 91:19H-24H.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 1987a; 92:181–7.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The antiaggregating properties of vascular endothelium: Interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987b; 92:639–46.

Rakugi H, Tabuchi Y, Nakamaru M, Nagano M, Higashimori K, Mikami H, Ogihara T. Endothelin activates the vascular renin-angiotensin system in rat mesenteric arteries. *Biochem Int* 1990; 21:867-72.

Rameh LE and Cantley LC. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 1999; 274:8347-50.

Rao GN, Katki KA, Madamanchi NR, Wu Y, Birrer MJ. JunB forms the majority of the AP-1 complex and is a target for redox regulation by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor agonists in smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999; 274:6003-10.

Ray R and Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109:217-26.

Redon J, Oliva NR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Saez GT. Antioxidant activities and oxidative stress by products in human hypertension. *Hypertension* 2003; 41:1096-101.

Reshef N, Hayari Y, Goren C, Boaz M, Madar Z, Knobler H. Antihypertensive effect of sweetie fruit in patients with stage I hypertension. *Am J Hypertens* 2005; 18:1360-3.

Rey FE, Li XC, Carretero OA, Garvin JL, Pagano PJ. Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91phox. *Circulation* 2002; 106:2497-502.

Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 2001; 70:281-312.

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

Robin P, Boulven I, Desmyter C, Harbon S, Leiber D. ET-1 stimulates ERK signalling pathway through sequential activation of PKC and Src in rat myometrial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283:C251-60.

Rosen B, Barg J, Zimlichman R. The effects of angiotensin II, endothelin-I and protein kinase C inhibitor on DNA synthesis and intracellular calcium mobilization in vascular smooth cells from young normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1999; 12:1243-51.

Rosendorff C. Endothelin, Vascular Hypertrophy and Hypertension. *Cardiovasc Drugs Ther* 1996; 10:795-802.

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.

Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346:896-903.

Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1997; 336:111-7.

Ruetten H and Thiemermann C. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48:675-88.

Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Human endothelial cell storage granules: a novel intracellular site for isoforms of the endothelin converting enzyme. *Circ. Res* 1998; 83:314-21.

Saito S, Hirata Y, Emori T, Imai T, Marumo F. Angiotensin II activates endothelial constitutive nitric oxide synthase via AT1 receptors. *Hypertens Res* 1996; 19:201-6.
Sakurai T and Goto K. Endothelins. Vascular actions and clinical implications. *Drugs* 1993; 46:795-804.

Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, Katan MB. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc* 2002; 102:1414-20.

Sánchez M, Lodi F, Vera R, Villar IC, Cogolludo A, Jiménez R, Moreno L, Romero M, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarete J. Quercetin and isorhamnetin prevent endothelial dysfunction, superoxide production and overexpression of p47^{phox} induced by angiotensin II in rat aorta. *J Nutr* 2007; 137:910-5.

Sánchez M, Galisteo M, Vera R, Villar IC, Zarzuelo A, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2006; 24:75-84.

Scalbert A and Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J Nutr* 2000; 130:2073S-85.

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.

Schieffer B, Luchtefeld M, Braun S, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H. Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. *Circ Res* 2000; 87:1195–201.

Schieffer B, Drexler H, Ling BN, Marrero MB. G protein-coupled receptors control vascular smooth muscle cell proliferation via pp60c-src and p21ras. *Am J Physiol* 1997; 272:C2019-30.

Schiffirin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vasc Pharmacol* 2005; 43:19–29.

Schiffirin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens* 2004; 17:1192-200.

Schiffirin EL and Touyz RM. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: Benefits of AT1 receptor blockade. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 42:911-3.

Schiffirin 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.

Schiffirin EL, Pu Q, Park JB. Effect of amlodipine compared to atenolol on small arteries of previously untreated essential hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2002b; 15:105-10.

Schiffirin EL and Touyz RM. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32:S2–S13.

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.

Seger R and Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9:726-35.

Sesink AL, O'Leary KA, Hollman PC. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. *J Nutr* 2001; 131:1938-41.

Servant MJ, Giasson E, Meloche S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; 271:16047-52.

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 2002; 91:406-13.

Sharif I, Kane KA, Wainwright CL. Endothelin and ischaemic arrhythmias-antiarrhythmic or arrhythmogenic?. *Cardiovasc Res* 1998; 39:625–32.

Shimada K, Takahashi M, Tanzawa K. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269:18275–8.

Shimoi K, Saka N, Nozawa R, Sato M, Amano I, Nakayama T, Kinoshita N. Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug Metab Dispos* 2001; 29:1521-4.

Simonyi A, Wang Q, Miller RL, Yusof M, Shelat PB, Sun AY, Sun GY. Polyphenols in cerebral ischemia: Novel targets for neuroprotection. *Mol Neurobiol* 2005; 31:135–48.

Sorokin A, Foschi M, Dunn MJ. Endothelin signalling and regulation of protein kinases in glomerular mesangial cells. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103:132S-6S.

Sorokin A, Kozlowski P, Graves L, Philip A. Protein-tyrosine kinase Pyk2 mediates endothelin-induced p38mapk activation in glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* 2001; 276:21521-8.

Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srini S, Rice-Evans C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* 1999; 458:224-30.

Steffen Y, Gruber C, Schewe T, Sies H. Momo-O-methylated flavanols and other favonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2008; 469:209-19.

Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999; 100:1050–5.

Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 1991; 114:464–9.

Sudheesh S, Sandhya C, Sarah KA, Vijayalakshmi NR. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytoter Res* 1999; 13:393-6.

Sugden PH. An overview of endothelin signalling in the cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35:871-86.

Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999; 401:79–82.

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.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti A. Vascular effects of endothelin-1 in essential hypertension: Relationship with cyclooxygenase-derived endothelium-dependent contracting factors and nitric oxide. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35:S37–40.

Taddei S and Vanhoutte PM.. Endothelium-dependent contractions to endothelin in the rat aorta are mediated by thromboxaneA2. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22:S328–31.

Takenaka T, Forster H, Epstein M. Protein kinase C and calcium channel activation as determinants of renal vasoconstriction by angiotensin II and endothelin. *Circ Res* 1993; 73:743–50.

Tamarisa P, Frishman WH, Kumar A. Endothelin and endothelin antagonism: Roles in cardiovascular health and disease. *Am Heart J* 1995; 130:601-10.

Tauber AI, Fay JR, Marletta MA. Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Biochem Pharmacol* 1984; 33:1367–9.

Thorup C, Kornfeld M, Goligorsky MS, Moore LC. AT1 receptor inhibition blunts angiotensin II-stimulated nitric oxide release in renal arteries. *J Am Soc Nephrol Suppl* 1999; 10:S220–4.

Tostes RC, Fortes ZB, Callera GE, Montezano AC, Touyz RM, Webb RC, Carvalho MC. Endothelin, sex and hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2008; 14:85-97.

Tostes RC and Muscara MN. Endothelin receptor antagonists: another potential alternative for cardiovascular diseases. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005; 5:287–301

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signalling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 2004; 44:248-52.

Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F, Schiffrin EL. Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2004; 22:1141-9.

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, 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, He G, Wu XH, Park JB, Mabrouk ME, Schiffrin EL. Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients. *Hypertension* 2001; 38:56-64.

Touyz RM, Deng LY, He G, Wu XH, Schiffrin EL. Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J Hypertens* 1999; 17:907–16.

Turner AJ and Tanzawa K. Mammalian membrane metalloproteinases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J* 1997; 11:355–64.

Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: a potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 1999; 100:1223–9.

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.

Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, Alexander RW. Novel role of gp91phox-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* 2002; 91:1160–7.

Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. p38 mitogen activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1998; 273:15022–9.

Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougard C, Michel JB. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem* 1999; 264:341–9.

Van Acker SA, Tromp MN, Haenen GR, Van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214:755–9.

Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res* 2003; 37:121-7.

Vassileva I, Mountain C, Pollock DM. Functional role of ETB receptors in the renal medulla. *Hypertension* 2003; 41:1359–63.

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.

Vieira O, Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Basile JP, Laranjinha J, Almeida L, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br J Pharmacol* 1998; 123:565–73.

Villar IC, Vera R, Galisteo M, O'Valle F, Romero M, Zarzuelo A, Duarte J. Endothelial nitric oxide production stimulated by the bioflavonoid chrysin in rat isolated aorta. *Planta Med* 2005; 71:829-34.

Villar IC, Galisteo M, Vera R, O'Valle F, García-Saura MF, Zarzuelo A, Duarte J. Effects of the dietary flavonoid chrysin in isolated rat mesenteric vascular bed. *J Vasc Res* 2004; 41:509-16.

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

Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens* 2004; 22:535-42.

Virdis A, Schiffrin EL. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12:181–7.

Vlachopoulos C, Tsekoura D, Alexopoulos N, Panagiotakos D, Aznaouridis K, Stefanadis C. Type 5 phosphodiesterase inhibition by sildenafil abrogates acute smoking-induced endothelial dysfunction. *Am J Hypertens* 2003; 17:1004–14.

Wagner OF, Vierhapper H, Gasic S, Nowotny P, Waldhäusl W. Regional effects and clearance of endothelin-1 across pulmonary and splanchnic circulation. *Eur J Clin Invest* 1992; 22:277-82.

Wallerath T, Poleo D, Li H, Förstermann U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:471-8.

Warner TD, Mitchell JA, Sheng H, Murad F. Effects of cyclic-GMP on smooth muscle relaxation. *Adv Pharmacol* 1994; 26:171-94.

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:H1600-5.

Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, Linz W, Böhm M, Nickenig G. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:300-5.

Waterhouse AL. Wine phenolics. *Ann NY Acad Sci* 2002; 957:21-36.

Wedgwood S, Dettman RW, Black SM. ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *Am J Physiol* 2001; 281:L1058-67.

Wedgwood S and 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:L305-12.

Wedgwood S, McMullan DM, Bekker JM, Fineman JR, Black SM. Role for endothelin-1-induced superoxide and peroxynitrite production in rebound pulmonary hypertension associated with inhaled nitric oxide therapy. *Circ Res* 2001; 89:357-64.

Welch WJ and Wilcox CS. AT1 receptor antagonist combats oxidative stress and restores nitric oxide signaling in the SHR. *Kidney Int* 2001; 59:1257-63.

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999; 79:143-80.

Williamson G and Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:243-5S.

Wolpert HA, Steen SN, Istfan NW, Simonson DC. Insulin modulates circulating endothelin-1 levels in humans. *Metabolism* 1993; 42:1027-30.

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.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-5.

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.

Yogi A, Callera GE, Montezano AC, Aranha AB, Tostes RC, Schiffrin EL, Touyz RM. Endothelin-1, but not Ang II, activates MAP kinases through c-Src independent Ras-Raf dependent pathways in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:1960-7.

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.

Yoshizumi M, Tsuchiya K, Suzaki Y, Kirima K, Kyaw M, Moon JH, Terao J, Tamaki T. Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293:1458-65.

Yue TL, Gu JL, Wang C, Reith AD, Lee JC, Mirabile RC, Kreutz R, Wang Y, Maleeff B, Parsons AA, Ohlstein EH. Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 2000; 275:37895-901.

Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M. ECE-1: a membrane bound metalloprotease that catalyses the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994; 78:473-85.

Zanzinger J. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. *Auton Neurosci* 2002; 98:24-27.

Zhang YM, Wang KQ, Zhou GM, Zuo J, Ge JB. Endothelin-1 promoted proliferation of vascular smooth muscle cell through pathway of extracellular signal-regulated kinase and cyclin D1. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24:563-8.

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:F671-8.

Zhao Y, Liu J, Li L, Liu L, Wu L. Role of Ras/PKCzeta/MEK/ERK1/2 signaling pathway in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Regul Pept* 2005; 128:43–50.

Zhao X, Gu Z, Attele AS, Yuan CS. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *J Ethnopharmacol* 1999; 67:279–85.

Zheng HZ, An GS, Nie SH, Tang CS, Liu NK, Wang SH. Inhibition of signal transduction pathways of endothelin-1-induced proliferation of vascular smooth muscle cells by nitric oxide. *Sheng Li Xue Bao* 1998; 50:379-84.

Zheng J and Ramírez VD. Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br J Pharmacol* 2003; 130:1115-23.

Zheng JS, Yang XQ, Lookingland KJ, Fink GD, Hesslinger C, Kapatos 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, Raj L. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress. *Hypertension* 2004; 44:186-90.

Zouki C, Baron C, Fournier A, Filep JG. Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery cells: role of ET(A) receptors and platelet-activating factor. *Br J Pharmacol* 1999; 127:969-79.