

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



**Efectos de los polifenoles del vino tinto  
sobre la disfunción endotelial hipertensiva.**

**Tesis Doctoral para aspirar  
al Grado de Doctor que presenta el  
Licenciado D. Manuel Gómez Guzmán**

**2011**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Manuel Gómez Guzmán  
D.L.: GR 2442-2011  
ISBN: 978-84-694-2916-7





UNIVERSIDAD  
DE  
GRANADA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

D. Julio Gálvez Peralta, Catedrático y Director del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada,

Certifica: que la Tesis Doctoral titulada “Efectos de los polifenoles del vino tinto sobre la disfunción endotelial hipertensiva”, ha sido realizada por el Licenciado en Farmacia D. Manuel Gómez Guzmán, en los laboratorios de este Departamento.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 1 de febrero de 2011.

Dr. Julio Gálvez Peralta





UNIVERSIDAD  
DE  
GRANADA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

D. Juan Manuel Duarte Pérez y Dña. Rosario Jiménez Moleón, Catedrático y Profesora Titular respectivamente del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, como Directores,

Certifican: que la Tesis Doctoral titulada “Efectos de los polifenoles del vino tinto sobre la disfunción endotelial hipertensiva”, presentada por el Licenciado en Farmacia D. Manuel Gómez Guzmán, reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 1 de febrero de 2011.

Dr. Juan Manuel Duarte Pérez

Dra. Rosario Jiménez Moleón



*A mis padres.*  
*A mis hermanos.*  
*A María Luisa.*



*Era evidente que cuando a uno se le contagiaba  
el mal de la ciencia, resultaba tan imposible  
escapar de él como de la peste.*

ORHAN PAMUK

*El castillo blanco*

*- No me hagas hablar más. Tengo sed. Sed de agua.  
- La sed de agua es primitiva. La sed de vino es cultura.*

MANUEL VÁZQUEZ MONTALBÁN

*Quinteto de Buenos Aires.*

*Porque con cuatro la dicha encontrarás:  
el vino, la salud, el dinero y el amor.*

*Las mil y una noches.*



---

**INTRODUCCIÓN**
**1. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL, ESTRÉS OXIDATIVO Y ET-1**

<b>1.1. Disfunción endotelial: Definición y concepto</b>	3
<b>1.2. Disfunción endotelial y estrés oxidativo</b>	4
<b>1.2.1. Papel de la NAD(P)H oxidasa en el estrés oxidativo vascular</b>	8
- <i>Estructura, función y localización</i>	8
- <i>Actividad mediada por ET-1</i>	11
- <i>Efectos in vitro de la activación de NADPH oxidasa</i>	12
- <i>Efectos in vivo de la actividad de NADPH oxidasa</i>	13
<b>1.2.2. Papel del desacoplamiento de la eNOS</b>	14
<b>1.2.3. Papel de la xantina oxidasa</b>	17
<b>1.2.4. Papel de las enzimas antioxidantes</b>	17
<b>1.3. Endotelina-1.</b>	18
<b>1.3.1. Biosíntesis, regulación y lugares de generación.</b>	18
<b>1.3.2. Receptores de ET-1.</b>	22
<b>1.4. Disfunción endotelial y ET-1</b>	24
<b>1.5. Valor pronóstico de la disfunción endotelial</b>	26
<b>1.6. Tratamiento de la disfunción endotelial</b>	27

**2. HIPERTENSIÓN DOCA-SAL O HIPERTENSIÓN VOLUMEN  
DEPENDIENTE**

<b>2.1. Generalidades de la hipertensión DOCA-sal</b>	30
<b>2.2. Patogénesis de la hipertensión DOCA-sal</b>	31
<b>2.3. Alteraciones anatomopatológicas de la hipertensión DOCA-sal</b>	32
<b>2.4. Reactividad vascular en la hipertensión DOCA-sal</b>	33
<b>2.5. Estrés oxidativo e hipertensión DOCA-sal</b>	36

<b>3. HIPERTENSIÓN L-NAME</b>	
<b>3.1. Generalidades de la hipertensión L-NAME</b>	39
<b>3.2. Patogénesis de la hipertensión L-NAME</b>	40
<b>3.3. Alteraciones anatomopatológicas de la hipertensión L-NAME</b>	46
<b>3.4. Reactividad vascular en la hipertensión L-NAME</b>	47
<b>3.5. Estrés oxidativo e hipertensión L-NAME</b>	49
<b>4. POLIFENOLES DEL VINO TINTO (RWPs)</b>	51
<b>4.1. Flavan-3-oles.</b>	53
<b>4.2. Biodisponibilidad y metabolismo de los RWPs.</b>	55
- <i>Farmacocinética de los flavanoles.</i>	57
<b>4.3. Evidencias epidemiológicas de la protección cardiovascular.</b>	60
<b>4.4. Efectos cardioprotectores de los RWPs.</b>	63
<b>4.4.1. Efectos antioxidantes</b>	63
- <i>Efectos sobre las subunidades de la NADPH oxidasa</i>	65
- <i>Efectos sobre las lipoproteínas de baja densidad</i>	66
- <i>Efecto prooxidante</i>	67
<b>4.4.2. Efectos sobre las lipoproteínas de alta densidad</b>	67
<b>4.4.3. Efectos sobre las células del músculo liso vascular</b>	68
<b>4.4.4. Efectos sobre el proceso regenerativo: impacto sobre la circulación de células progenitoras endoteliales.</b>	69
<b>4.4.5. Efectos sobre la agregación plaquetaria</b>	70
<b>4.4.6. Efectos sobre la función endotelial</b>	70
- <i>Los polifenoles inducen incremento de la expresión de eNOS</i>	72
- <i>Los polifenoles inducen un incremento en la actividad de la eNOS</i>	73
- <i>Papel del Ca<sup>2+</sup> intracelular</i>	75

---

- <i>Papel de la vía PI3K/AKT</i>	76
- <i>Los RWPs inducen relajación mediada por FHDE</i>	76
- <i>Los RWPs inducen una mayor liberación de prostaciclina de células endoteliales</i>	77
- <i>Los RWPs inducen inhibición de la síntesis endotelial de ET-1</i>	77
- <i>Efectos de los RWPs sobre la producción de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)</i>	78
- <i>Efectos de los RWPs sobre el receptor estrogénico (ER, Estrogenic Receptor) <math>\alpha</math> en el endotelio</i>	79
<b>4.4.7. Efectos antihipertensivos</b>	80
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	91
<b>JUSTIFICATION AND AIMS</b>	99
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	107
<b>1. Estudios <i>in vitro</i>. Efectos de los RWPs sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1</b>	107
<b>1.1. Polifenoles objeto de estudio</b>	107
<b>1.2. Animales de experimentación</b>	108
<b>1.3. Aislamiento e incubación de los anillos aórticos de rata</b>	109
<b>1.4. Estudios de reactividad vascular</b>	109
<b>1.5. Detección <i>in situ</i> de la producción vascular de O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	112
<b>1.6. Actividad NADPH oxidasa</b>	113
<b>1.7. Western Blot</b>	114
<b>1.8. Reacción en cadena de la polimerasa</b>	118

<b>1.9. Reactivos</b>	119
<b>1.10. Análisis estadístico</b>	119
<b>2. Estudios <i>in vivo</i></b>	
<b>2.1. Polifenol objeto de estudio: epicatequina.</b>	120
<b>2.2. Animales y grupos experimentales</b>	120
<b>2.2.1. Experimento I: Efectos de la epicatequina sobre la hipertensión DOCA-sal.</b>	120
<b>2.2.2. Experimento II: Efectos de la epicatequina sobre la hipertensión L-NAME.</b>	121
<b>2.3. Medida de la presión arterial</b>	122
<b>2.4. Parámetros morfológicos</b>	123
<b>2.5. Determinaciones plasmáticas</b>	124
<b>2.5.1. Determinación del nivel de peroxidación lipídica</b>	124
<b>2.5.2. Determinación de los niveles de ET-1</b>	124
<b>2.5.3. Determinación del factor de necrosis tumoral <math>\alpha</math> (TNF<math>\alpha</math>)</b>	124
<b>2.6. Determinaciones en orina</b>	125
<b>2.6.1. Determinación de 8-iso-prostaglandina (iso-PG) F<sub>2<math>\alpha</math></sub></b>	125
<b>2.6.2. Proteinuria</b>	125
<b>2.7. Parámetros histológicos</b>	126
<b>2.8. Estudios de reactividad vascular</b>	126
<b>2.9. Detección <i>in situ</i> de la producción vascular de O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	128
<b>2.10. Actividad NADPH oxidasa</b>	128
<b>2.11. Western blot</b>	129
<b>2.12. Reacción en cadena de la polimerasa</b>	131
<b>2.13. Amplificación del cDNA (PCR-RT a tiempo real)</b>	132
<b>2.14. Reactivos</b>	133

2.15. Análisis estadístico	133
----------------------------	-----

## RESULTADOS

1. Efectos de los RWP's sobre la disfunción endotelial provocada por ET-1 <i>in vitro</i> .	137
1.1. Efectos sobre la disfunción endotelial	137
1.2. Efectos sobre la producción de $O_2^-$	140
1.3. Efectos sobre la actividad NADPH oxidasa	142
1.4. Efectos sobre la expresión génica y proteica de eNOS, caveolina-1, ET <sub>A</sub> , p47 <sup>phox</sup> y p22 <sup>phox</sup>	144
1.5. Papel del receptor estrogénico y del receptor activado por el proliferador de peroxisoma	146
1.6. Papel de las cinasas reguladas por señales extracelulares	147
1.7. Efectos de los polifenoles aislados en la funcionalidad y en cambios bioquímicos inducidos por ET-1	148
2. Efectos de la epicatequina sobre ratas con hipertensión DOCA-sal	151
2.1. Efectos sobre la presión arterial	151
2.2. Efectos sobre las variables morfológicas y proteinuria	152
2.3. Efectos sobre los niveles plasmáticos de ET-1	153
2.4. Efectos sobre el estrés oxidativo sistémico	154
2.5. Efectos sobre la producción vascular <i>in situ</i> $O_2^-$	155
2.6. Efectos sobre la actividad NADPH oxidasa	157
2.7. Efectos sobre la expresión proteica de subunidades de NADPH oxidasa	158
2.8. Efectos sobre la expresión génica de Nrf2 y genes controlados por Nrf2/ARE	159
2.9. Efectos sobre la función endotelial <i>ex vivo</i>	160
2.10. Efectos sobre la vía vascular AKT/eNOS	163

<b>3. Efectos de la epicatequina sobre la hipertensión L-NAME.</b>	164
<b>3.1. Efectos sobre la presión arterial y los índices de peso de ventrículo izquierdo y riñón</b>	164
<b>3.2. Efectos en la histología renal y en la proteinuria</b>	167
<b>3.3. Efectos sobre el estrés oxidativo sistémico</b>	170
<b>3.4. Efectos sobre la vía del NO vascular</b>	171
<b>3.5. Efectos sobre la vía de la COX vascular</b>	174
<b>3.6. Efectos sobre la producción vascular <i>in situ</i> de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y en la vía de la NADPH oxidasa</b>	175
<b>3.7. Efectos en el estado inflamatorio</b>	177
<b>3.8. Efectos en las vías vasculares de AKT y ERK 1/2</b>	178

## **DISCUSIÓN**

<b>1. Efectos de los RWP sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1</b>	181
<b>2. Efectos de la epicatequina sobre la hipertensión DOCA-sal</b>	188
<b>3. Efectos de la epicatequina sobre la hipertensión L-NAME</b>	195

## **DISCUSSION**

<b>1. Effects of the RWP on the endothelial dysfunction induced by ET-1</b>	203
<b>2. Effects of epicatechin in DOCA-salt hypertension</b>	209
<b>3. Effects of epicatechin in L-NAME hypertension</b>	215

<b>CONCLUSIONES</b>	223
---------------------	-----

<b>CONCLUSIONS</b>	227
--------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	231
---------------------	-----

## **Introducción.**

---

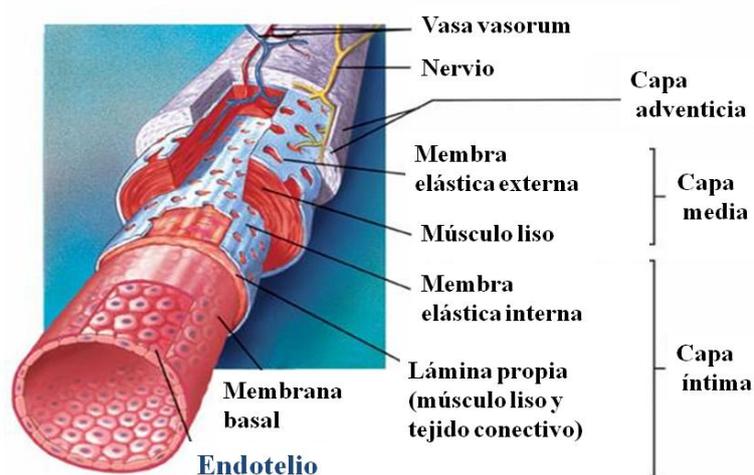


## 1. Disfunción endotelial, estrés oxidativo y ET-1.

### 1.1. Disfunción endotelial: definición y concepto.

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

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 (Fig. 1). Sin embargo, en situaciones patológicas, sus funciones pueden alterarse y no responder adecuadamente a las necesidades orgánicas.



- Funciones del endotelio**
- Superficie permeable, coagulación, angiogénesis.
  - Productor de vasodilatadores: **NO**, **PGI<sub>2</sub>**, **FHDE**.
  - Productor de vasoconstrictores: **ET-1**, **TXA<sub>2</sub>**, **PGH<sub>2</sub>**, **ROS**.
  - Equilibrio VD/VC: Tono vascular.

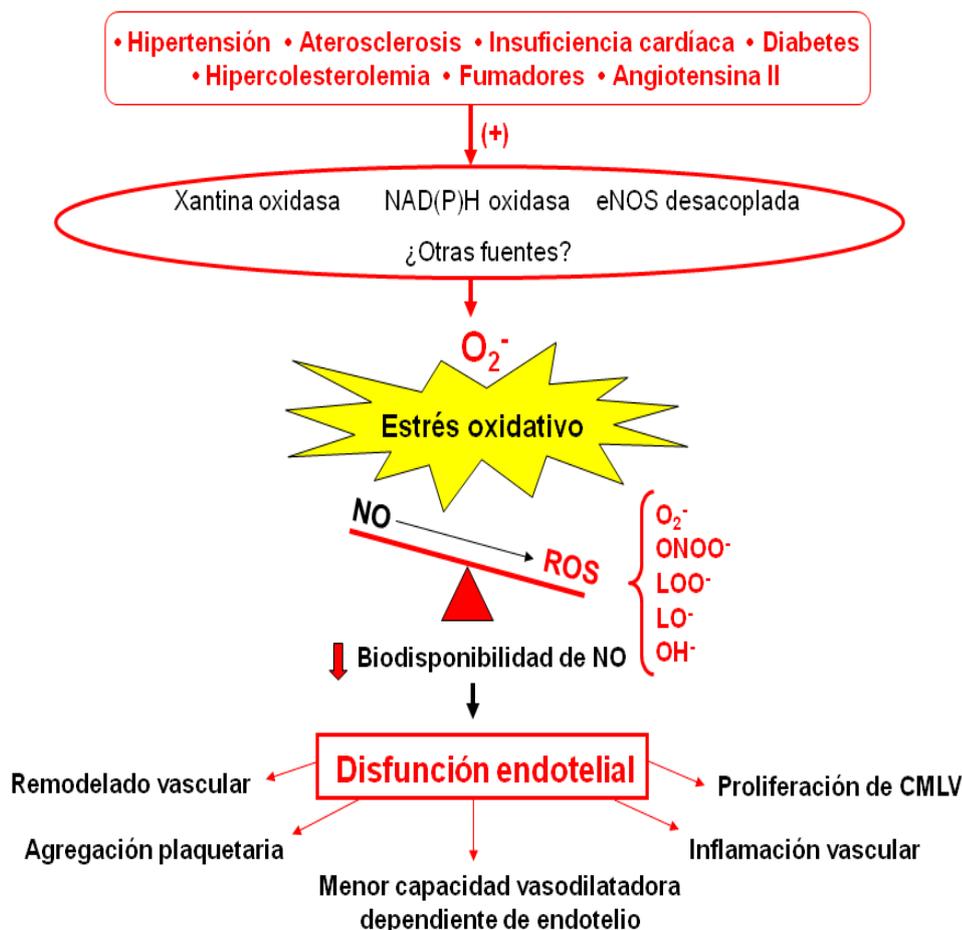
**Figura 1. Estructura de la pared del vaso sanguíneo. Endotelio vascular y sus principales funciones.** *ET-1*, endotelina-1; *FHDE*, factor hiperpolarizante derivado de endotelio; *NO*, óxido nítrico; *PGH<sub>2</sub>*, prostaglandina H<sub>2</sub>; *PGI<sub>2</sub>*, prostaciclina; *ROS*, especies reactivas de oxígeno; *TXA<sub>2</sub>*, tromboxano A<sub>2</sub>; *VC*, vasoconstricción; *VD*, vasodilatación. Imagen modificada de The Mac Graw-Hill Companies.

La disfunción endotelial puede definirse como el desequilibrio entre la síntesis, liberación o efecto de los factores endoteliales vasodilatadores (VD) y el de las sustancias vasoconstrictoras (VC) 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 que tener en cuenta, no obstante, 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 CMVL (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).

## **1.2. 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 especies reactivas de oxígeno (ROS) en la pared de los vasos, incluyendo la hipercolesterolemia, la diabetes y la hipertensión, patologías asociadas a la disfunción endotelial (Fig. 2).

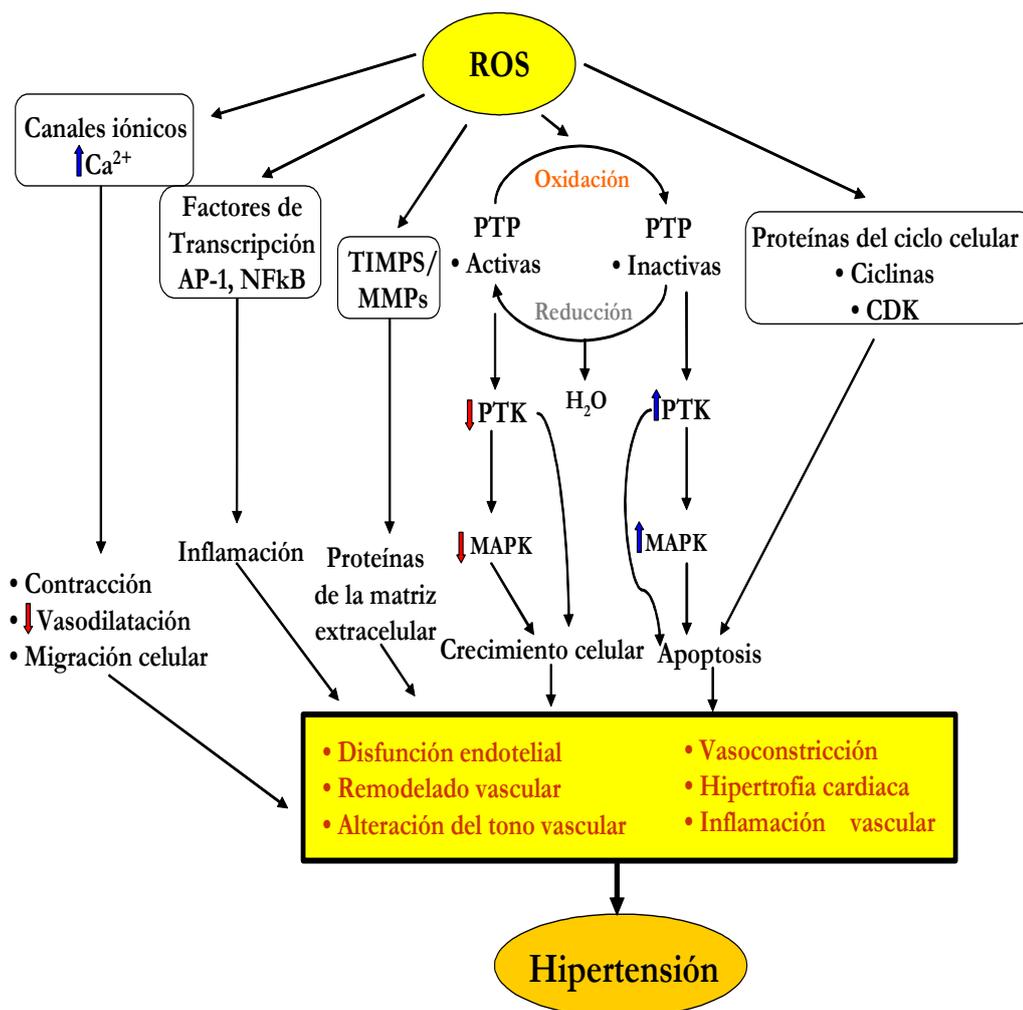


**Figura 2. Mecanismos causantes de la disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares.** Distintos agentes, como enfermedades cardiovasculares (hipertensión, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis), factores de riesgo (hipercolesterolemia, tabaco, tolerancia 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 ( $ONOO^-$ ), radicales lipídicos ( $LOO^-$  y  $LO^-$ ) o radical hidroxilo ( $OH^-$ ) principalmente), que disminuye la biodisponibilidad del agente vasodilatador óxido nítrico (NO) al aumentar su degradación por las ROS. Esto produce la denominada disfunción endotelial, donde se observa un estado vascular proinflamatorio, proagregante plaquetario y con alteración en el tono vascular, debido a que se produce un remodelado vascular, un aumento de la agregación plaquetaria, inflamación vascular, la proliferación de CMLV 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 ( $O_2^-$ ), radicales hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) y radicales lipídicos ( $LO^\cdot$  y  $LOO^\cdot$ ). Todos ellos poseen electrones desapareados, por lo que se clasifican como radicales libres. Sin embargo, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y el ácido hipocloroso ( $HClO$ ) no son radicales libres, pero tienen propiedades oxidantes y contribuyen también al estrés oxidativo, especialmente en presencia de cationes metálicos.

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  $F_{2\alpha}$ , 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 acetato de deoxicorticosterona (DOCA) más dieta rica en sal (DOCA-sal), en los que igualmente se ve elevada la producción de  $O_2^-$  vascular y los marcadores de estrés oxidativo (Li *et al.*, 2003a, b; Sedeek *et al.*, 2003, Zheng y Ramírez, 2003). Por tanto, podemos afirmar que en muchos modelos experimentales, la hipertensión está asociada a una elevada producción de ROS (Fig. 3).



**Figura 3. Mecanismos de señalización redox dependientes en las CMLV y sus efectos fisiológicos mediados por especies reactivas de oxígeno (ROS), tendentes a producir y mantener la hipertensión.** Las ROS intracelulares modifican la actividad de proteínas tirosina cinasas (PTK), como Src, Ras, JAK2, PI3K y EGFR, así como proteína cinasas activadas por mitógeno (MAPK), particularmente ERK1/2, p38mapk y SAPK/JNK, probablemente debido a la oxidación/reducción de proteínas tirosina fosforiladas (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). Las 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. **CDK**, cinasa dependiente de ciclina.

$\uparrow$ : aumento.  $\downarrow$ : disminución.

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 P<sub>450</sub> 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, la xantina oxidasa (XO) y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*) desacoplada.

### **1.2.1. Papel de la NAD(P)H oxidasa en el estrés oxidativo vascular.**

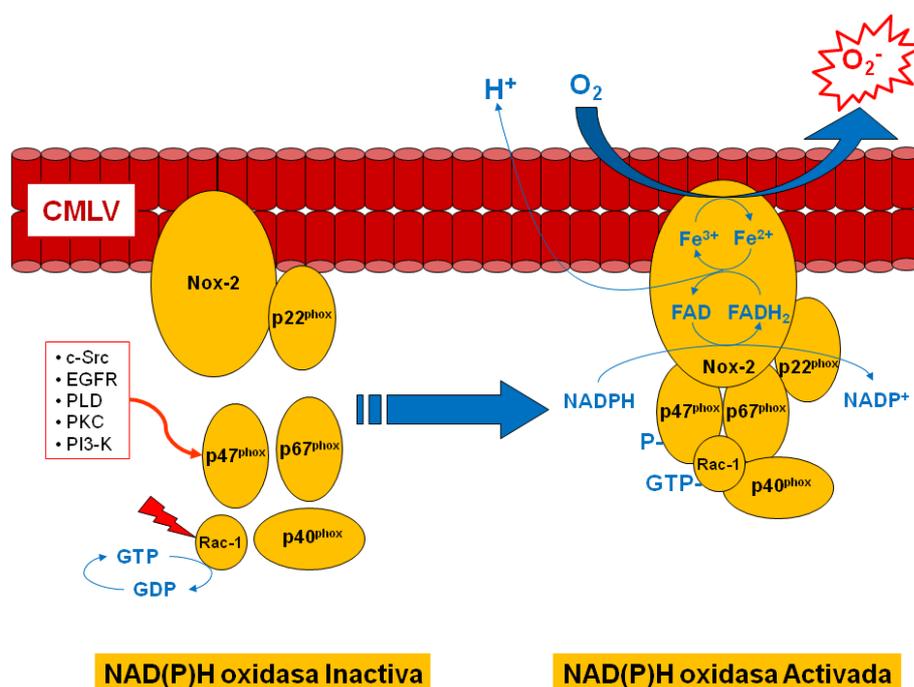
Numerosos estudios han identificado una oxidasa asociada a la membrana plasmática como la principal fuente de ROS en los vasos humanos, situada tanto en el endotelio como en las capas media y adventicia (Griendling *et al.*, 2000). La activación de esta enzima produce gran cantidad de señales intracelulares que pueden desembocar en disfunción endotelial, proliferación de las CMLV, expresión de genes pro-inflamatorios y síntesis de la matriz extracelular (Rao *et al.*, 1992; Irani, 2000; Lassegue *et al.*, 2004; Viridis *et al.*, 2004; Qamirani *et al.*, 2005).

#### ***Estructura, función y localización.***

Esta enzima está presente en leucocitos fagocíticos (monocitos, macrófagos, neutrófilos) y en la pared vascular. En un principio se determinó la estructura y la función de la NAD(P)H oxidasa en neutrófilos (Patriarca *et al.*, 1971). En realidad se trata de un complejo multi-enzimático formado por un dominio con actividad reductasa compuesto por una flavoproteína y un citocromo b558 formado por las subunidades gp22<sup>phox</sup> y gp91<sup>phox</sup>. Otras importantes subunidades citoplasmáticas incluyen p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> 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 (Koga *et al.*, 1999; Babior, 1999; Lapouge *et al.*, 2000).

La activación del sistema NAD(P)H oxidasa requiere la fosforilación de la subunidad  $p47^{\text{phox}}$ , que permite su desplazamiento 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  $\text{O}_2^-$ , fundamentalmente extracelular (Nisimoto *et al.*, 1999; Cross y Segal, 2004) (Fig. 4).



**Figura 4. Mecanismo de activación y acción de la NAD(P)H oxidasa vascular.** La activación de diferentes receptores en la membrana de las células del músculo liso vascular (CMLV) promueven la fosforilación de  $p47^{\text{phox}}$ . El mecanismo incluye la activación de fosfolipasa D (PLD), de proteína cinasa C (PKC), del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y de la tirosina cinasa c-Src. La fosforilación de  $p47^{\text{phox}}$  promueve su unión y la del resto de subunidades citoplasmáticas, a las subunidades de membrana de la enzima. El desplazamiento de Rac-1, una vez unida a GTP gracias a la acción de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3-K), a la membrana contribuye también a la activación de la enzima, que entonces, a partir de NAD(P)H y  $\text{O}_2$  produce, mediante un sistema redox de transporte electrónico en el dominio reductasa formado por las subunidades Nox-2 y  $p22^{\text{phox}}$ ,  $\text{NAD(P)}^+$ ,  $\text{H}^+$  y anión superóxido,  $\text{O}_2^-$ .

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 iodonium*), 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, y 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 (Griendling *et al.*, 2000; Touyz *et al.*, 2002; Wassmann *et al.*, 2002). En los últimos años se ha descubierto una familia de proteínas homólogas a la subunidad gp91<sup>phox</sup> 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<sup>phox</sup> de neutrófilos) y Nox-4, y sus subunidades reguladoras son p22<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y rac (Touyz *et al.*, 2002; Bengtson *et al.*, 2003; Lassègue y Clempus, 2003). Las subunidades Nox y p22<sup>phox</sup> 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 más abundante (Ago *et al.*, 2004; Higashi *et al.*, 2003; Lassègue y Clempus, 2003). Nox-4 también es la isoforma más abundante en CMLV (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  $O_2^-$  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 oxidasa vascular es regulada por citocinas, 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 (Li *et al.*, 2003; Callera *et al.*, 2005; 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* (Duerrschmidt *et al.*, 2000; Fei *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2003; 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).

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, 2004) como fuentes generadoras de ROS.

Nuestro grupo ha descrito recientemente que 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<sup>phox</sup>, y que la vía de señalización de ET-1 para aumentar la generación de radicales O<sub>2</sub><sup>-</sup> a través del sistema NAD(P)H oxidasa incluye, de forma secuencial, la activación de PKC, c-Src y ERK1/2 (Romero *et al.*, 2009; 2010).

#### ***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, *platelete derivated grown factor*) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) incrementan la actividad de NAD(P)H oxidasa y la producción de ROS en las CMLV (Griendling *et al.*, 2000). 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derivado de la NAD(P)H oxidasa está implicado en la hipertrofia de las CMLV causada por Ang II (Servant *et al.*, 1996; Griendling *et al.*, 2000). 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 chemotactic proteína 1*) (Tummala *et al.*, 1999), de VCAM-1 (*vascular cell adhesión molecule 1*) (Chen *et al.*,

1997; Li *et al.*, 2003c) e interleucina- 6 (IL-6) (Browatzki *et al.*, 2000; Schieffer *et al.*, 2000; Böhm *et al.*, 2007). Las ROS derivadas de NAD(P)H oxidasa parecen modular también la angiogénesis a través de la activación de los receptores del factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE) (Ushio-Fukai *et al.*, 2002). Igualmente, las ROS producidas por la 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<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO, favoreciendo así la formación de ONOO<sup>-</sup> (Saito *et al.*, 1996; Pueyo *et al.*, 1998; Thorup *et al.*, 1999).

#### ***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<sub>2</sub><sup>-</sup> 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<sub>2</sub><sup>-</sup> 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 de pacientes diabéticos e hipercolesterolémicos, el aumento en la producción de  $O_2^-$  se debe a un aumento en la actividad de la 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.

### **1.2.2. Papel del desacoplamiento de la eNOS.**

El NO es una pequeña molécula gaseosa que actúa como mediador en numerosos procesos biológicos. Se produce a partir del grupo guanidino de la L-arginina, siendo el otro producto de esta reacción biológica la L-citrulina. La óxido nítrico sintasa (NOS) es la enzima que cataliza esta reacción. Es una hemoproteína que, además del sustrato, requiere oxígeno molecular (Leone *et al.*, 1991), la presencia de calmodulina (Cam) y cuatro cofactores: NADPH, flavín adenín dinucleótido (forma oxidada) (FAD), flavín mononucleótido (forma oxidada) (FMN) y tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) (Stuehr, 1997).

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

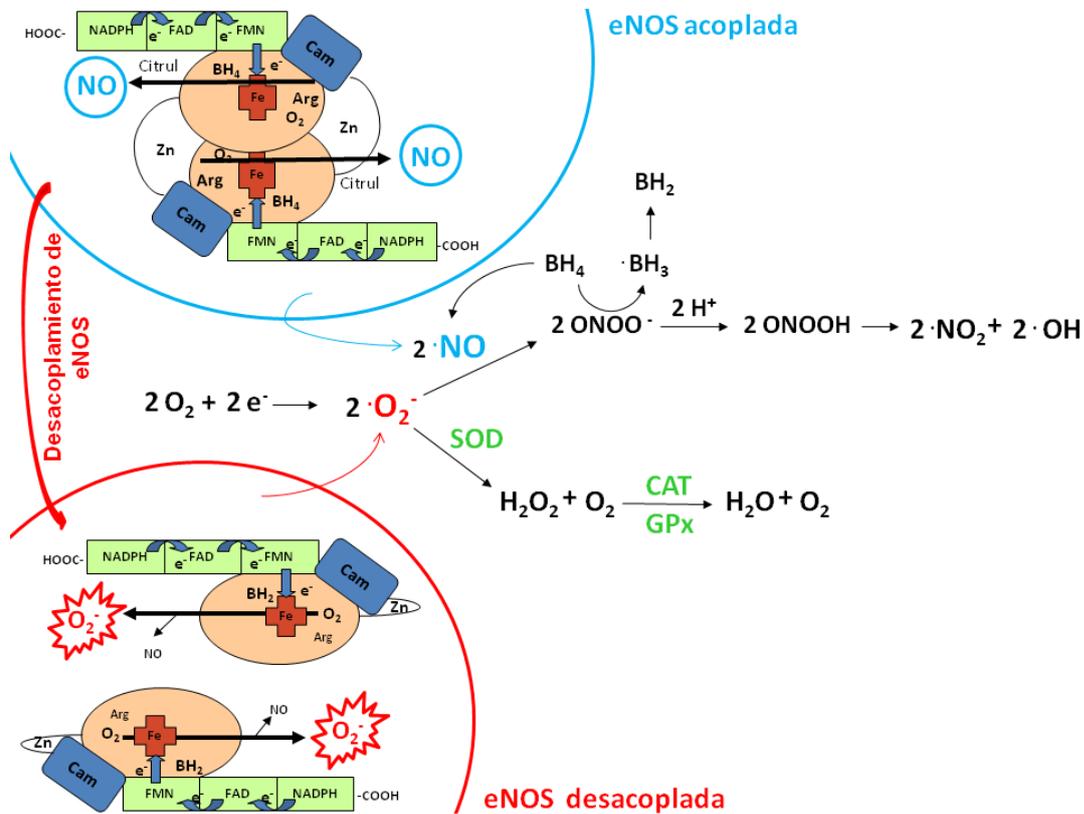
Para que la NOS sea activa, se ha de producir el acoplamiento inverso entre dos monómeros (Figura 5). Cada monómero a su vez presenta dos dominios, uno con actividad oxigenasa y otro con actividad reductasa, que actúan de manera

independiente. La  $BH_4$  favorece la formación de este dímero activo a partir de los monómeros de proteína inactiva. El dímero activo contiene lugares de unión para la L-arginina y la  $BH_4$ , y el grupo hemo en la porción N-terminal (dominio con actividad oxigenasa). En las NOS constitutivas hay además lugares para la fosforilación por proteínas cinasas (PK) que regulan su actividad. Existe así mismo un lugar de unión a la calmodulina en la parte media, y unas secuencias de unión al FMN, FAD, y NADPH en la porción C-terminal (dominio con actividad reductasa) (Stuehr, 1997).

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 (Fig. 5).

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 dihidrobiopterina ( $BH_2$ )), 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  $N^0$ -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). Diferentes estudios (Loomis *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2009) sugieren que la generación de  $O_2^-$  debida a la NADPH oxidasa es necesaria para el desacoplamiento de la eNOS. Puesto que el

desacoplamiento de la eNOS inducido por ET-1 fue secundario a NADPH oxidasa y se previno con sepiapterin (Romero *et al.*, 2009), es probable que la oxidación de BH<sub>4</sub> esté implicada en dicho desacoplamiento de la eNOS.



**Figura 5. Desacoplamiento de la eNOS.** La enzima en forma de monómero o en condiciones de baja biodisponibilidad de L-arginina o de tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (por aumento de su oxidación a dihidrobiopterina (BH<sub>2</sub>)) 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<sub>2</sub><sup>•-</sup>. El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se genera mediante la reducción del O<sub>2</sub> por un electrón. La superóxido dismutasa (SOD) lo descompone rápidamente en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La catalasa (CAT) o la glutatión peroxidasa (GPx) descomponen el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>. El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> también puede reaccionar, sobre todo en condiciones de alto estrés oxidativo, con el NO y formar peroxinitrito (ONOO<sup>•</sup>). El ONOO<sup>•</sup> puede reducirse a ácido peroxinitrico, que generará NO<sub>2</sub><sup>•</sup> y OH<sup>•</sup>. 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.

### 1.2.3. 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 ( $\text{NAD}^+$ ), mientras que la segunda reduce el oxígeno molecular produciendo  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (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 (Cardillo *et al.*, 1997; Butler *et al.*, 2000; Mervaala *et al.*, 2001). También, en SHR, el oxipurinol es capaz de reducir los valores de presión arterial, indicando un papel de la XO en el mantenimiento de las presiones arteriales elevadas (Nakazono *et al.*, 1991).

### 1.2.4. 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  $\text{O}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que posteriormente será degradado a  $\text{H}_2\text{O}$  por la catalasa (CAT) o la glutatión peroxidasa ( $\text{GP}_x$ ). 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  $\text{GP}_x$  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.

### **1.3. Endotelina-1.**

#### **1.3.1. Biosíntesis, regulación y lugares de generación.**

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 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.

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 (ECE) (Denault *et al.*, 1995; Tostes *et al.*, 2008). No obstante, la síntesis de las endotelinas puede ser llevada a cabo por otras vías ECE-independientes, mediadas por enzimas del tipo cinasas, que rompen la big-ET en la unión Tyr<sup>31</sup>-Gly<sup>32</sup> dando lugar a las ETs de 31 Aa (ET-1<sup>1-31</sup>, ET-2<sup>1-31</sup>, ET-3<sup>1-31</sup>), 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 ECE 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.*, 2003).

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 presentan mayor afinidad por big-ET-1 que por big ET-2 o big ET-3.

Las endotelinas se sintetizan en diversos tejidos del organismo. ET-1 se sintetiza fundamentalmente en las células endoteliales, lo cual está estrechamente relacionado con la mayor expresión de mRNA para pre-proendotelina-1 y la presencia de ECE intracelulares en las células endoteliales (Plumpton *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1994). La ET-1 también se sintetiza en las CMLV, corazón, riñón, pituitaria posterior y sistema nervioso central (SNC), pero a una concentración mucho menor (Agapitov *et al.*, 2002). ET-2 se sintetiza en células endoteliales, corazón y riñón (Howard *et al.*, 1992). ET-3 se sintetiza 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<sub>B</sub>), 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 CMLV, 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- $\beta$ , *transforming growth factor*  $\beta$ ); factores de crecimiento de insulina (IGF, *insulin growth factor*)], factores metabólicos (glucosa, LDL, colesterol), hipoxia, cambios en las fuerzas de cizallamiento de la pared vascular, radicales libres, endotoxinas y ciclosporina (Gray *et al.*, 1995; Tamarisa *et al.*, 1995). Existe una implicación de la PKC Ca<sup>2+</sup>-dependiente en dicha estimulación, inhibiéndose la expresión de la ET-1 en presencia de inhibidores de PKC y quelantes de calcio (Emori *et al.*, 1991). Otros factores que también disminuyen la expresión del gen de la ET-1 son el NO derivado del endotelio (Boulanger y Luscher, 1990; Warner *et al.*, 1992), los péptidos natriuréticos (Kohn *et al.*, 1992; Emori *et al.*, 1993), que elevan el 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 (Miller y Burnett, 1992; Kuchan y Frangos, 1993).

El aclaramiento de ET-1 (vías por las que se degrada e inactiva) tiene lugar por diferentes mecanismos (internalización de receptores de ET<sub>B</sub> y degradación enzimática por endopeptidasas) que se producen principalmente en pulmones y en otros órganos como riñones, hígado y corazón (Dupuis *et al.*, 1996; 1999; Johnström *et al.*, 2005). El aclaramiento de ET-1 por internalización de receptores de ET<sub>B</sub>, 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, reflejan el incremento en la producción local de ET-1 (Tostes *et al.*, 2008).

### **1.3.2. Receptores de ET-1**

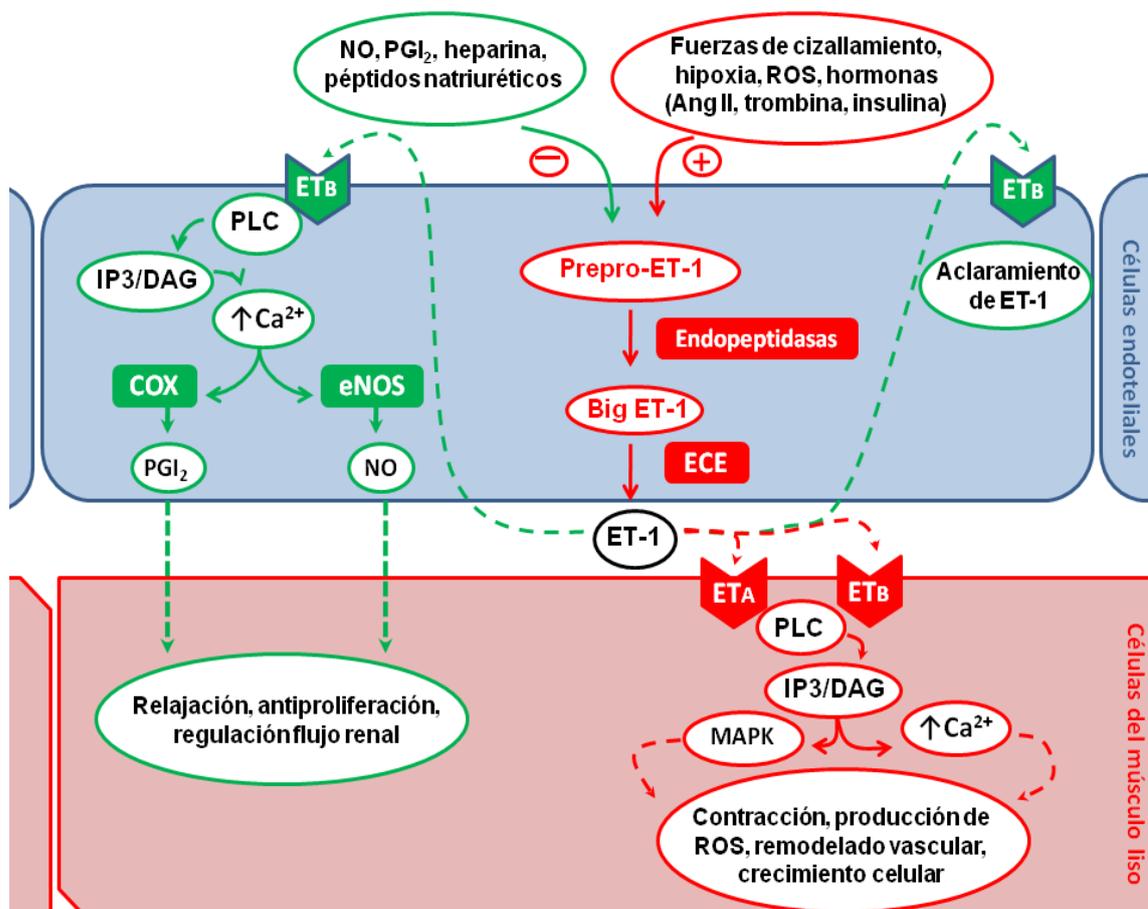
Como se ha mencionado anteriormente, la ET-1 ejerce sus acciones a través de la activación de dos tipos de receptores, el receptor de endotelina A (ET<sub>A</sub>) y el B (ET<sub>B</sub>). Ambos tipos de receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G y dan lugar a respuestas fisiológicas diferentes (Arai *et al.*, 1990; Pierce *et al.*, 2002).

Los receptores ET<sub>A</sub> están expresados fundamentalmente en las CMLV, donde median vasoconstricción y estimulan el crecimiento y proliferación de las CMLV. También se expresan en cardiomiocitos, fibroblastos, hepatocitos, adipocitos, osteoblastos y neuronas, donde median respuestas mitogénicas y pro-inflamatorias. La afinidad de las endotelinas por los receptores ET<sub>A</sub> 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<sub>B</sub>, con diferente localización y función. Los receptores ET<sub>B1</sub> están expresados principalmente en las células endoteliales, donde originan la liberación de NO y prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), dando lugar a respuestas vasodilatadoras y antiapoptóticas. Los receptores ET<sub>B2</sub> se localizan en las CMLV, 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<sub>B</sub> por las endotelinas es ET-1=ET-2=ET-3 (Sakurai *et al.*, 1993; Rosendorff, 1996).

El número de receptores de ET-1 está regulado por distintos factores, así la angiotensina y los ésteres 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<sub>B</sub> se puede ver alterada, disminuyendo en el endotelio y aumentando en 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 6. 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<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. Los receptores ET<sub>A</sub> se localizan en las CMLV donde median vasoconstricción, proliferación y remodelado vascular, debido a un aumento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular por activación de la fosfolipasa C (PLC) y liberación de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). Los receptores ET<sub>B</sub> 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 CMLV (ET<sub>B2</sub>), donde median vasoconstricción, proliferación y remodelado vascular.

⊕ :activación. ⊖ : inhibición.

### **1.4 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, tales 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 CMLV, la adhesión de monocitos, la expresión de diferentes moléculas de adhesión y la producción de ET-1 (Radomski *et al.*, 1987; 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). La ET-1 interacciona con varios sistemas biológicos como el sistema L-arginina/NO, el sistema renina-angiotensina-aldosterona (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 la alteración del balance 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 (Karaa *et al.*, 2005; Kamoun *et al.*, 2006). 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 BH<sub>4</sub> e inducir el desacoplamiento de la eNOS (apartado 2.2.b.). 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 BH<sub>4</sub>, aumento de la producción de ROS y aumento de los niveles plasmáticos de ET-1 (Iglarz *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2007). En este modelo animal de hipertensión, los niveles de BH<sub>4</sub> 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 sensibles a sal, 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 (Moreau y Schiffrin, 2003; Schiffrin, 2005; Tostes y Muscara, 2005; 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<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>), produce un aumento en la producción vascular de ROS por activación de la NAD(P)H oxidasa (Callera *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003c). 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, la 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).

#### **1.4.1. 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 (Daignon y Ganz, 2004), puede tener un valor pronóstico, siendo útil como predictor de sucesos cardiovasculares (Perticone *et al.*, 2001; Quyyumi, 2003).

La disfunción endotelial en arterias coronarias se ha asociado a sucesos cardiovasculares en pacientes con y sin enfermedad coronaria manifiesta (Schachinger *et al.*, 2000; Suwaidi *et al.*, 2000; Halcox *et al.*, 2002). 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 la relación entre la disfunción endotelial en la arteria braquial 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.

#### **1.4.2. 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  $\alpha$ - y  $\beta$ -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  $\beta$ -bloqueantes, inhibe el estrés oxidativo (Yasunari *et al.*, 2004). Los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), los antagonistas del receptor AT1 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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<sub>A</sub>, o bien, un antagonista no selectivo (ET<sub>A/B</sub>), no revierte el aumento en la presión arterial pero sí previene el daño vascular, la disfunción endotelial, la hipertrofia vascular y cardíaca, la progresión del daño renal y mejora la supervivencia en los modelos experimentales de hipertensión sensibles a sal (Moreau y Schiffrin, 2003; Schiffrin, 2005). 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 (Moreau y Schiffrin, 2003; Callera *et al.*, 2004; Schiffrin, 2005).

En estados de resistencia a la insulina y en la diabetes, los mecanismos de disfunción endotelial son complejos. Se ha demostrado que los agonistas de receptores para activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR)- $\gamma$  (p.ej. ciglitazona)

reducen la presión arterial y mejoran la función endotelial en ratas Zucker obesas (Pershad Singh *et al.*, 1993).

Otra posibilidad para el tratamiento de la disfunción endotelial es actuar sobre los mecanismos de la enfermedad que conducen a la disfunción del endotelio. De esta forma, la disminución de los niveles de homocisteína en la hiperhomocisteinemia mediante la suplementación con ácido fólico mejora la disfunción endotelial (Bennet-Richards *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). El tratamiento oral con L-arginina, precursor de NO, reduce la presión arterial y mejora la función endotelial (Pallosi *et al.*, 2004). La BH<sub>4</sub> y sus análogos (Hyndman *et al.*, 2002), pueden también mejorar la función endotelial incrementando la biodisponibilidad del NO. Recientemente, se ha sugerido que el ácido acetil salicílico podría reducir el estrés oxidativo y mejorar así la función endotelial (Wu *et al.*, 2002). Se ha demostrado también que las estatinas mejoran la disfunción endotelial en modelos animales de hipertensión (Zhou *et al.*, 2004) y en pacientes hipertensos con niveles normales de colesterol (Danaoglu *et al.*, 2003), facilitando la activación de la eNOS e inhibiendo el estrés oxidativo. El tratamiento a largo plazo con las vitaminas antioxidantes C y E también mejora la disfunción endotelial *in vivo* (Kinlay *et al.*, 2004).

## **2. Hipertensión DOCA-sal o hipertensión volumen dependiente.**

### **2.1. Generalidades de la hipertensión DOCA-sal.**

A pesar de la incidencia relativamente baja de una hipertensión humana secundaria a la hipersecreción de 11-deoxicorticosterona (DOC), la investigación de uno de los intermediarios en la biosíntesis de corticosteroides y de su derivado acetilado (DOCA) tiene un lugar prominente en el estudio de la hipertensión experimental.

DOC y DOCA, fueron los primeros corticosteroides sintéticos que se obtuvieron en grandes cantidades y fueron usados en numerosos estudios farmacológicos a finales de los años treinta del pasado siglo.

No sorprende que los primeros estudios clínicos sobre este tipo de hipertensión se realizaran en pacientes con enfermedad de Addison. Loeb *et al.*, (1939) describieron dos casos en los que la hipertensión era provocada por el tratamiento con DOCA, lo cual fue confirmado por otros autores (Thorn *et al.*, 1942). Los estudios se iniciaron en aquel laboratorio debido a que se encontró un número significativo de pacientes con enfermedad de Addison que desarrollaban insuficiencia cardíaca. Kuhlmann *et al.* (1939) describieron que el tratamiento con DOCA en perros inducía hipertensión, lo cual fue confirmado poco después por Swingle *et al.* (1941). En 1940, Grollman *et al.* pusieron de manifiesto que el tratamiento con DOCA en ratas aumentaba su presión arterial, mostrando en sus experimentos una clara implicación del riñón en la patogénesis de este tipo de hipertensión. Pero sus estudios también demostraban que la inyección de DOCA *per se* a las ratas no producía hipertensión. Selye *et al.* (1943) fueron los primeros en demostrar que tanto la nefrosclerosis como la hipertensión eran resultado de un tratamiento con DOCA y sal, hecho puesto de manifiesto en distintas especies animales como ratas, perros y monos (Selye y Hall, 1943). Aquel grupo se embarcó en un estudio para relacionar el potencial de cada esteroide para causar

hialinosis y nefroesclerosis (Selye, 1970). Establecieron la relación entre la actividad mineralocorticoide y su habilidad para producir daño renal e hipertensión, definiendo la hipertensión mineralocorticoide.

Así pues, la hipertensión DOCA-sal en rata es el modelo animal de hipertensión mineralocorticoide mejor conocido. En este modelo, la hipertensión es inducida por la inyección repetida de DOCA o por implantación subcutánea de dicho compuesto, que se va liberando de forma continuada. Seyle y Hall (1944) encontraron que las ratas eran más resistentes a una sobredosificación de DOCA que otras especies estudiadas. El procedimiento desarrollado para superar esta resistencia en estos animales de experimentación precisa realizar una uninefrectomía (Hall y Hall, 1969), probablemente porque de este modo aumenta el efecto de retención renal de Na<sup>+</sup> inducido por DOCA. También se requiere el uso de NaCl en el agua de bebida (Selye *et al.*, 1943). Aunque este suplemento de NaCl en el agua de bebida de las ratas tratadas con DOCA va a influir más en la inducción de hipertrofia renal y cardíaca que en la presión arterial (Green *et al.*, 1948).

## **2.2. Patogénesis de la hipertensión DOCA-sal.**

Uno de los factores que contribuyen a la instauración de la hipertensión puede ser la retención de Na<sup>+</sup> y agua. Otro factor que debe ser tenido en cuenta en este modelo experimental es la ausencia de sustancias antihipertensivas producidas por el riñón, tales como prostaglandinas o lípidos neutros. El contenido de renina en plasma y en tejido renal es menor en los animales tratados con DOCA, probablemente como consecuencia de la expansión de volumen del fluido extracelular. Así pues, el sistema renina-angiotensina (SRA) no va a participar en la patogénesis de la hipertensión inducida por DOCA.

La ET-1 juega un papel fundamental en la patogénesis de la hipertensión, en contraste con otros modelos en los que estos niveles no están modificados, como es el caso del modelo SHR (Lariviere *et al.*, 1993). Este péptido de 21 aminoácidos produce

una respuesta inflamatoria por aumento del estrés oxidativo a nivel de la pared vascular, lo cual conduce a un remodelado vascular y a disfunción endotelial y los antagonistas de receptores de ET-1 reducen el aumento de la presión arterial y la hipertrofia vascular presente en estos modelos experimentales de hipertensión, así como en pacientes hipertensos (Schiffrin, 2005).

### **2.3. Alteraciones anatomopatológicas de la hipertensión DOCA-sal.**

La hipertensión experimental va habitualmente acompañada de lesiones renales. El tipo de afectación varía según el modelo de hipertensión, sin embargo, en general, se producen cambios a nivel glomerular, tubular e intersticial.

Dworkin *et al.*, (1984) estudiaron la morfología renal en ratas uninefrectomizadas y con hipertensión inducida por la administración de DOCA-sal durante tres semanas, tras las cuales observaron un aumento difuso de la matriz mesangial así como áreas focales de trombosis y hemorragia intraglomerular. Además, ya antes de la aparición de las alteraciones histológicas, estos animales mostraron alteraciones en la hemodinámica renal y proteinuria, precediendo a las alteraciones estructurales.

Estos autores analizaron también el efecto del contenido proteico de la dieta sobre la progresión de la insuficiencia renal, observando que cuando las ratas uninefrectomizadas eran sometidas a una dieta hiperproteica se aceleraba la aparición de esclerosis glomerular. Estudios realizados en ratas con 90 % de ablación de masa renal demuestran que la restricción proteica ayuda a preservar la arquitectura del glomérulo y disminuye la proteinuria (Hostetter *et al.*, 1981). En humanos, los estudios realizados también sugieren un retraso en la progresión de la insuficiencia renal con la restricción proteica (Maschio *et al.*, 1982). Es probable que el efecto renoprotector de la restricción proteica en las ratas DOCA-sal se base en sus efectos sobre la hemodinámica renal, pero lo que sí está claro es que no se relaciona con alteraciones en el balance de Na<sup>+</sup> ni de K<sup>+</sup>.

Se ha descrito la presencia de atrofia del epitelio tubular, hipertrofia de la membrana basal y formación de cilindros hialinos en ratas con hipertensión DOCA-sal (Kim *et al.*, 1994). En el glomérulo se observa necrosis fibrinoide y atrofia de los capilares del ovillo glomerular. A nivel vascular las arteriolas muestran una hipertrofia prominente y necrosis fibrinoide. Asimismo, en el intersticio es patente una importante fibrosis.

El daño renal en este modelo resulta evidente por la proteinuria y los cambios morfológicos. Hay estudios que investigan el tratamiento y la prevención del daño renal como el que llevaron a cabo Seifi *et al.*, (2009). Estos autores observaron el efecto de una terapia antioxidante sobre el daño renal en el modelo DOCA-sal. Administraron vitamina C y/o vitamina E a dosis de 200 mg/Kg/día, con lo que disminuyeron los niveles de proteínas en orina y mejoró la histopatología renal. La coadministración de estas vitaminas no tuvo un efecto mayor que la administración de éstas por separado, pero queda clara la implicación del estrés oxidativo en el desarrollo del daño renal en este modelo de hipertensión. En otro estudio muy reciente de Bae *et al.*, (2010), diseñado para evaluar los posibles efectos renoprotectores de la rosiglitazona (un agonista de receptor activado por proliferadores de peroxisomas del subtipo gamma) en la hipertensión DOCA-sal y su papel en la producción de ET-1 y la fibrosis renal asociada a la inflamación, se ha observado que el tratamiento con rosiglitazona disminuye la presión arterial y es efectivo en la prevención de la progresión del daño renal en la hipertensión DOCA-sal. Estos efectos antiinflamatorios y antifibróticos están asociados con la reducción en la sobreexpresión de ET-1 y COX-2 entre otros factores.

#### **2.4. Reactividad vascular en la hipertensión DOCA-sal.**

Desde hace años se sabe que hay una menor respuesta a ACh en aortas de ratas con hipertensión DOCA-sal, así como en microvasos de la zona mesentérica, que se ha relacionado con un incremento en la producción de factores contractores derivados de endotelio (FCDE) y que es sensible a inhibidores de la COX (Cordellini *et al.*, 1990;

Katusic y Shepherd, 1991). El deterioro de la relajación dependiente de endotelio en la hipertensión está íntimamente relacionado con el grado de hipertensión alcanzado y puede ser recuperado tras el tratamiento con fármacos antihipertensivos como se ha visto en varios modelos de hipertensión genética (Lüscher *et al.*, 1987; Nigro *et al.*, 1989).

Otro estudio de Cordellini (1999) corrobora el hecho de que la respuesta a ACh en aortas de ratas con hipertensión DOCA-sal está disminuida y también lo atribuye a una mayor producción de FCDE, postulando que el efecto podría ser debido a un producto del metabolismo del ácido araquidónico. Para comprobar esta hipótesis evalúa la respuesta endotelio-dependiente a ACh en aortas de ratas DOCA-sal, en presencia de diferentes inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico, algunos de los cuales, como el piroxicam, fueron capaces de restablecer la respuesta a ACh hasta valores normales.

Nunes *et al.* (2000) realizaron curvas concentración-respuesta al donador de NO, nitroprusiato sódico (NPS), en aortas de ratas con hipertensión DOCA-sal. La relajación causada por esta molécula fue similar en los anillos de las ratas hipertensas a las de sus controles normotensos, sin observarse diferencias en presencia o ausencia de endotelio. Este hecho reafirma una posible disfunción endotelial en este modelo de hipertensión.

Hay tratamientos en los que se ha comparado la acción antihipertensiva del tempol con la triple terapia (reserpina, hidralazina e hidroclorotiazida) (Nakano *et al.* 2003). Se observó cómo la triple terapia mostró un potente efecto disminuyendo la presión arterial, pero fracasó a la hora de suprimir el incremento en la producción vascular de  $O_2^-$ , mientras que un análogo permeable de la SOD fue capaz de suprimirlo. En ambos casos se observó una mejora significativa en la respuesta a ACh en aorta, lo que sugiere que la mejora de la disfunción endotelial en ratas DOCA-sal resulta de la disminución en la presión arterial y no tanto por la normalización en la producción de radicales  $O_2^-$ .

Bockman *et al.* (1992), describieron el papel protector que ejerce el endotelio en arterias de resistencia, como las mesentéricas, de ratas DOCA-sal. Cuando el endotelio

era eliminado mecánicamente de la arteria, la respuesta contráctil a diversos agentes como el KCl o la arginina vasopresina era similar en animales hipertensos y normotensos. En cambio, cuando se conservaba el endotelio del vaso, la hipertensión DOCA-sal producía un incremento significativo de la sensibilidad del vaso a estos mismos agentes contractores. Por esta razón, estos autores concluyeron que el endotelio actúa como protector de este incremento de la respuesta contráctil.

En 2004 Galisteo *et al.* (2004) analizaron los efectos de la administración crónica de una dosis oral diaria de quercetina (10 mg/kg) sobre la función endotelial y la presión arterial y la compararon con los efectos del bloqueante de canales de calcio verapamilo (20 mg/kg). Ambos compuestos previnieron el incremento de presión arterial. Se vio que la relajación dependiente de endotelio a ACh estaba disminuida en anillos intactos de ratas DOCA-sal. La incubación de estos anillos con una mezcla antioxidante de SOD y CAT mejoró pero no restableció por completo dicha relajación (indicando posibles alteraciones en el proceso de biosíntesis de NO). El tratamiento crónico con quercetina normalizó la función endotelial y no se observaron diferencias en presencia o ausencia de la mezcla antioxidante. La administración crónica de verapamilo no tuvo efecto sobre la disfunción endotelial y sólo en presencia de SOD y catalasa se mejoró la relajación a ACh.

Nuestro grupo (Jiménez *et al.*, 2007) también demostró que el tratamiento crónico con polifenoles del vino tinto (RWPs, *red wine polyphenols*) previene el desarrollo de hipertensión y disfunción endotelial en ratas macho DOCA-sal, de manera similar que el inhibidor específico de NADPH oxidasa, apocinina. En este estudio, los anillos aórticos obtenidos de ratas DOCA-sal tratadas con RWPs y los tratados con apocinina mostraron un incremento significativo de la vasodilatación inducida por ACh comparado con los animales DOCA-sal. No se observaron efectos significativos en los anillos de las ratas control tratadas con RWPs y apocinina respecto a los controles no tratados, como tampoco se observaron diferencias en la respuesta vasodilatadora

independiente de endotelio al donador de NO, NPS, en arterias precontraídas con noradrenalina.

Zhao *et al.* (2000) analizaron la respuesta a ET1 en microvasos de ratas DOCA-sal en un estudio diseñado para determinar el papel de la ET-1 en la resistencia periférica elevada de estas ratas. La sensibilidad de los microvasos a ET-1 estaba disminuida en ratas DOCA-sal. Esto se debía, probablemente, a la elevada concentración de ET-1 a lo largo del desarrollo de la hipertensión, con la consiguiente regulación a la baja de sus receptores.

## **2.5. Estrés oxidativo e hipertensión DOCA-sal.**

Varios autores han observado incrementos en diversos marcadores de daño oxidativo en tejidos en diferentes modelos experimentales de hipertensión arterial. Estos efectos lesivos se deben a alteraciones en la producción de  $O_2^-$ , en la biodisponibilidad del NO y a cambios en la actividad NADPH oxidasa y de enzimas antioxidantes (Cediel *et al.*, 2003; Gomez-Amores *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 1992; Kitts *et al.*, 1998; Kumar y Das, 1993; Pedro-Botet *et al.*, 2000; Ulker *et al.*, 2003; Zhan *et al.*, 2004).

En el estudio ya mencionado en el apartado anterior, Galisteo *et al.* (2004) analizaron los efectos de la administración crónica del flavonoide quercetina y del verapamilo en la hipertensión y el estado oxidativo de ratas DOCA-sal en diferentes tejidos. En este estudio, el tratamiento DOCA-sal produjo una disminución significativa de la actividad de enzimas antioxidantes hepáticas, como la GPx y la glutación S-transferasa (GST). La producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) también se encontraba incrementada en el hígado y el corazón de las ratas DOCA-sal. Esta disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes es correlativa al incremento de la producción de TBARS, estando en una proporción similar. En cambio, se detectó un aumento en el contenido de glutación total (GSH) hepático, lo que está considerado por algunos autores como un mecanismo de adaptación para la defensa frente a una formación incrementada de radicales libres (Toth *et al.*, 1986). No se

detectaron cambios en la actividad de la glutatión reductasa en hígado en las ratas DOCA-sal, pero se observó una disminuida actividad renal de la GST, lo que sugiere una menor tasa de reacciones de detoxificación, dejando a los riñones más expuestos a sufrir daños. La quercetina fue capaz de incrementar los sistemas de defensa antioxidantes en hígado, corazón y riñón.

Consecuentemente, el estrés oxidativo está directamente relacionado con el desarrollo de la hipertensión en este modelo experimental. De hecho, en un estudio de los autores Nicod *et al.* (2000) se postuló el uso de antioxidantes, en concreto el ácido clofíbrico y el dietilmaleato, como coadyuvante a la terapia antihipertensiva. En el grupo de ratas hipertensas tratadas con los agentes antioxidantes citados, hubo un incremento en las actividades hepáticas SOD, GPx y CAT, acompañado de una disminución de la presión sanguínea elevada.

Somers *et al.* (2000) cuantificaron la producción de  $O_2^-$  vascular en aortas de ratas DOCA-sal mediante quimioluminiscencia, observando que ésta era significativamente mayor que en ratas normotensas. Hay evidencias de la contribución de la NADPH oxidasa a la producción de  $O_2^-$  en el modelo DOCA-sal, modelo de hipertensión dependiente de ET-1 y con bajos niveles de renina (Touyz *et al.*, 2004). Este modelo de hipertensión experimental se caracteriza por el aumento en la expresión de ET-1 en arterias de resistencia (Lariviere *et al.*, 1993) y la elevación de los niveles de  $O_2^-$  en la pared vascular (Touyz *et al.*, 2004). Aunque la relación entre los receptores  $ET_A$  y  $ET_B$  y la NADPH oxidasa ha sido destacada en varios estudios (Amiri *et al.*, 2004), la inhibición de la NADPH oxidasa afectó sólo parcialmente la generación de  $O_2^-$  en ratas DOCA-sal (Berry y Hare 2004), mientras que el tratamiento con antagonistas para  $ET_A$  abolió la generación de  $O_2^-$  (Li *et al.*, 2003), lo que sugiere una posible contribución de fuentes adicionales a la NADPH oxidasa como generadoras de  $O_2^-$  en este modelo.

El tratamiento crónico de las ratas DOCA-sal con RWPs (Jiménez *et al.*, 2007) redujo los niveles de ET-1 a valores similares a aquellos encontrados en el grupo control. Sin embargo, el tratamiento con apocinina no pudo prevenir la acumulación

plasmática de ET-1 en los animales DOCA-sal. Los niveles plasmáticos de MDA (un marcador de peroxidación lipídica producido por ROS), así como la excreción urinaria en 24h de iso-PGF<sub>2α</sub> (un marcador más específico de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en los grupos DOCA-sal tratados con RWPs o con apocinina, se vieron reducidos a niveles similares a los encontrados en ratas control. En este estudio concluimos que este efecto protector se debía, posiblemente, a la capacidad de los RWPs para prevenir el estrés oxidativo vascular por inhibir la actividad NADPH oxidasa y/o reducir la liberación de ET-1 en las ratas hipertensas.

Callera *et al.* (2006) sugieren que el estrés oxidativo inducido por ET-1 en la hipertensión DOCA-sal implica mecanismos independientes de NADPH oxidasa. La XO y la mitocondria son fuentes generadoras de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y podrían contribuir a la disfunción vascular en la hipertensión, siendo de este modo candidatos como fuente adicional en la generación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en ratas DOCA-sal (Viel *et al.*, 2008).

### **3. Hipertensión L-NAME o hipertensión inducida por inhibición crónica de la síntesis de NO.**

#### **3.1. Generalidades de la hipertensión L-NAME.**

La administración crónica de L-NAME en el agua de bebida provoca un incremento en la presión arterial que es atribuida a la reducción de la síntesis del vasodilatador NO y ha sido ampliamente utilizada como un modelo de hipertensión (Zatz y Baylis., 1998).

El descubrimiento en 1987 de la mediación del NO en la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio a ciertos agonistas (Palmer *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1987) inauguró el amplio campo de la biología de esta pequeña molécula gaseosa. Actualmente, se sabe que el NO es un agente esencial para muy diversos procesos fisiológicos y también en algunas situaciones patológicas. El desarrollo de estos conceptos ha sido posible gracias a los resultados obtenidos mediante la limitación de su biosíntesis.

En 1986, Rees *et al.*, demostraron que la interrupción de la biosíntesis de NO con un análogo N<sup>6</sup> sustituido de la L-arginina, L-NMNA (N<sup>6</sup>-monometil-L-arginina) producía una gran elevación de la presión arterial en conejos, efecto que se suprimía por la administración de L-arginina en exceso. Otros investigadores confirmaron este hallazgo en distintas especies, incluida la humana (Haynes *et al.*, 1997; Woltz *et al.*, 1997), lo cual confirmó la importancia del NO como modulador de la función circulatoria dadas sus propiedades vasodilatadoras.

También se ha investigado la participación del NO en la regulación de la función renal. La inhibición sistémica aguda de la NOS con varios análogos de la L-arginina produce una intensa vasoconstricción renal, con una marcada reducción del flujo sanguíneo renal y una pequeña disminución de la tasa de filtración glomerular. Estos efectos se observaron en diversas especies tanto en animales conscientes como anestesiados (Kone *et al.*, 1997). Debido al efecto presor resultante de la inhibición

sistémica aguda de la NOS, una parte del incremento de la resistencia vascular renal se atribuyó a un proceso de autorregulación. No obstante, la inhibición de la NOS intrarrenal local y la inhibición sistémica a dosis bajas produjeron vasoconstricción renal sin causar aumento de la presión arterial (Kone *et al.*, 1997; Granger *et al.*, 1997). Por lo tanto, el NO generado localmente en el riñón, disminuye la resistencia vascular renal.

Además, el NO regula la excreción renal de sodio (Kone *et al.*, 1997): actúa directamente sobre el epitelio tubular para inhibir la reabsorción de sodio (McKee *et al.*, 1997; Sotos *et al.*, 1993), que se estimula, al menos, en el SNC y el riñón (Deng *et al.*, 1994; Mattson y Higgins, 1996; Villar *et al.*, 1994) por la ingesta de sodio. A pesar de estas acciones natriuréticas del NO, la excreción de sodio aumenta de forma considerable al utilizar una dosis presora de inhibidor de la NOS (Baylis *et al.*, 1990), posiblemente en respuesta al incremento de la presión arterial aunque pueden estar implicados otros factores desconocidos hasta el momento (Kone *et al.*, 1997).

### **3.2. Patogénesis de la hipertensión L-NAME.**

El hecho de que la interrupción brusca de la síntesis de NO acarree hipertensión y vasoconstricción renal no implica necesariamente que el NO sea indispensable en el control crónico de la circulación, ya que se podrían poner en marcha otros sistemas de vasodilatación para compensar. Pronto se comprobó que el NO desempeña una función muy importante en la regulación a largo plazo de la presión arterial. En 1992 se demostró que la administración por vía oral de otro inhibidor de la síntesis de NO, el N<sup>G</sup>-nitro.L-arginina-métil-éster (L-NAME), producía hipertensión persistente y daño renal (Baylis *et al.*, 1992). Mediante el uso de una dosis mucho mayor de L-NAME se produjo una forma de hipertensión severa y progresiva, asociada a isquemia glomerular y glomeruloesclerosis (Ribeir *et al.*, 1992; Arnal *et al.*, 1992; Lahera *et al.*, 1992). Todos estos hallazgos, confirmados después por otros investigadores, indican que el NO

es un elemento fundamental e irremplazable en la regulación de presión arterial y fueron la base de un modelo nuevo de hipertensión.

Es de suponer que la administración exógena de L-arginina (sustrato de la NOS) en exceso revierta la inhibición de la NOS y, por ello, la hipertensión inducida por el L-NAME. Sin embargo, esto ocurre sólo cuando comienzan simultáneamente los tratamientos de L-arginina y L-NAME (Salazar *et al.*, 1992). Si la inhibición de la NOS se mantiene durante una semana, la administración de L-arginina sólo corrige de forma parcial la hipertensión (Ribeiro *et al.*, 1992) y este efecto es aún menor en ratas tratadas durante 40 semanas (Qiu *et al.*, 1995). Además, tras la administración de dosis altas de L-NAME, la hipertensión persistió 14 semanas después de la retirada del fármaco (Morton *et al.*, 1993). Todo esto sugiere que el desarrollo de este tipo de hipertensión, una vez que el NO ha sido inhibido durante un cierto tiempo, no ocurre exclusivamente por inhibición competitiva de la síntesis de NO, sino que deben intervenir otros mecanismos.

#### ***Sistema renina-angiotensina.***

Los diversos estudios realizados de inhibición aguda de la AII mediante antagonistas de los receptores tipo 1 (AT1) o con inhibidores del enzima de conversión de angiotensina (IECA), arrojan resultados poco concluyentes respecto a su efecto sobre la tensión arterial, desde descensos importantes de la misma (Zanchi *et al.*, 1995) hasta poco o ningún efecto sobre la presión arterial y la hemodinámica renal en ratas con HTA inducida por L-NAME (Bank *et al.*, 1994; Baylis *et al.*, 1994). Sin embargo, estos mismos estudios muestran cómo el bloqueo agudo y simultáneo de la AII junto con el bloqueo de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, revirtió la hipertensión inducida por L-NAME en ratas, lo que refuerza la posibilidad de que la vasoconstricción generalizada característica de este modelo pueda ser mantenida por la interacción entre el sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema renina-angiotensina (SRA).

Ribeiro *et al.*, 1992, demostraron que la administración crónica del antagonista del receptor AT1, losartán, a ratas tratadas crónicamente con L-NAME, prevenía la hipertensión y las lesiones renales asociadas a este modelo, lo cual sugería una participación clave del SRA. Estos hallazgos han sido corroborados en varios estudios que utilizan antagonistas de receptores de AII o IECA (Navarro-Cid *et al.*, 1996; Takase *et al.*, 1996; de Gracia *et al.*, 2000). Además, el bloqueo crónico de AII revertía la hipertensión establecida (Pollock *et al.*, 1993) y reducía la hipertensión persistente tras la interrupción de la inhibición de la NOS (Morton *et al.*, 1993), sugiriendo la posibilidad de que el SRA juega un papel causal o permisivo en la hipertensión L-NAME aunque se haya interrumpido la inhibición del NO.

La actividad plasmática de la renina parece ser poco relevante, ya que en este modelo de hipertensión se ha descrito tanto aumentada, como disminuida o sin cambios significativos (Arnal, 1992; Ribeiro *et al.*, 1992; Pollock y Jover, 1993). *In vitro*, el NO podría actuar como inhibidor de la liberación de renina (Vidal *et al.*, 1988; Greenberg *et al.*, 1995), aunque otros autores (Tharaux *et al.*, 1997) así como otros estudios realizados en riñón aislado y perfundido (Gardes *et al.*, 1994), sugieren un efecto estimulador sobre la síntesis y/o liberación de renina por parte del NO.

Varios investigadores observaron una disminución en la renina circulante en este modelo (Ribeiro *et al.*, 1992; Arnal *et al.*, 1992; Fujihara *et al.*, 1994; Yamada *et al.*, 1996; Knoblich *et al.*, 1996), incluso en animales en los que la actividad plasmática de la renina estaba elevada inicialmente por una ingesta restringida de sodio (Yamada *et al.*, 1996) o por reducción en la presión de perfusión renal (Knoblich *et al.*, 1996). Solamente cuando el tratamiento con L-NAME duraba lo suficiente para provocar lesiones estructurales renales significativas se elevaban los niveles de renina (Ribeiro *et al.*, 1992, Fujihara *et al.*, 1994, Yamada *et al.*, 1996), aunque esta elevación tardía puede ser transitoria (Qiu *et al.*, 1998; Baylis *et al.*, 1994). Probablemente, la relación entre la AII y la inhibición crónica en la síntesis de NO esté más en relación con un incremento en los niveles tisulares de AII (García *et al.*, 1997), aumento en la

sensibilidad a la AII (Conrad *et al.*, 1992; Vargas *et al.*, 1995), y/o una interacción entre AII y SNS (Qiu *et al.*, 1994).

### ***Volumen de líquido corporal.***

El NO funciona como una autacoide natriurético y es estimulado por una elevada ingesta salina crónica en ratas normales para producir vasodilatación a través de diversos mecanismos entre los que se incluye el bloqueo del balance glomérulo-tubular (Deng *et al.*, 1994; Ito 1995; McKee *et al.*, 1994; Raij y Baylis, 1995; Sotos *et al.*, 1995; Tolins y Shutz, 1994). Este estímulo para la producción de NO se encuentra aparentemente localizado en el riñón (Deng *et al.*, 1994). La deficiencia de NO está también relacionada con el desarrollo de la hipertensión sal-sensible de las ratas Dhal sometidas a una dieta rica en sodio (Chen y Sanders, 1993; Chen *et al.*, 1993) y la L-arginina ha demostrado tener un efecto protector acompañado de normalización del fenómeno presión-natriuresis y de los sistemas de transporte alterados de este modelo experimental (Kirchner *et al.*, 1995; Patel *et al.*, 1994). Varios estudios sugieren que la inhibición crónica de la biosíntesis de NO determina un tipo de hipertensión volumen-dependiente. Dosis bajas de L-NAME, que no producen alteración de la presión arterial en perros con una ingesta normal en sodio, producen elevaciones de la presión arterial con una dieta rica en sodio por un volumen efecto-dependiente (Salazar *et al.*, 1993). La inhibición de la biosíntesis de NO intrarrenal localmente durante 5 días en ratas, produce una caída del flujo sanguíneo medular renal, retención de sodio y aumento de la presión arterial (Mattson *et al.*, 1994). Sin embargo, otros estudios han encontrado que la dieta baja en sal no mejora el curso de la hipertensión (Jover *et al.*, 1993) y no se desarrolla un balance positivo de sodio en la inhibición crónica de NO en ratas (Hu *et al.*, 1994). Además, se ha observado el desarrollo de hipertensión a pesar de existir una depleción de volumen mantenida (Qui y Baylis 1994a). Vargas *et al.* (1996) estudiaron el efecto de la sobrecarga de sodio en ratas con hipertensión inducida por L-NAME, encontrando que dicha sobrecarga salina no afectó al desarrollo de la hipertensión

arterial inducida por la inhibición crónica de la síntesis de NO; sin embargo sí indujo el desarrollo de un síndrome poliuria-polidipsia en estos animales. Estos datos, aparentemente discrepantes, pueden ser reconciliados porque dosis altas de L-NAME bloquean el NO generado de múltiples células y de isoformas de NOS, siendo el efecto predominante una respuesta vasoconstrictora secundaria a la inhibición de la eNOS, induciendo una hipertensión de rápido desarrollo. Por el contrario a dosis bajas de L-NAME actúa más selectivamente sobre la función renal (Walder *et al.*, 1991), inhibiendo la NOS renal y por tanto las respuestas de presión-diuresis-natriuresis, induciendo así una forma de hipertensión volumen-dependiente de más lento desarrollo.

Respecto al papel de la **endotelina**, al contrario de los resultados obtenidos con la inhibición AII, la inhibición aguda o crónica con antagonistas específicos ET<sub>A</sub> o de ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> no tiene ningún efecto ni en la hipertensión ni en el daño renal en ratas tratadas crónicamente con L-NAME (Fujihara *et al.*, 1995). No obstante, el tratamiento crónico con L-NAME, da lugar a un incremento en la excreción urinaria de endotelina inmunorreactiva (Fernández-Rivas *et al.*, 1995), lo cual constituye una evidencia a favor de la hipótesis de que existe una interacción a nivel renal entre NO y endotelina que modula la hemodinámica renal y la excreción de sodio (King y Brenner, 1991, Raij, 1993). Álvarez *et al.* (2000), encontraron que los niveles urinarios de endotelina estaban significativamente elevados en todos los grupos de ratas tratados con desoxicorticosterona (DOCA) y con L-NAME a dosis presora y subpresora, y con NaCl al 1%, con respecto a aquellos que ingerían agua normal. Estos datos parecen indicar que la sal sensibiliza al riñón para producir endotelina en respuesta a los mineralcorticoides o a la inhibición del NO, probablemente para facilitar la natriuresis. Es probable que la endotelina urinaria sea principalmente de origen renal, ya que su aclaramiento plasmático es pequeño, y los niveles circulantes son bastante bajos (Lüscher *et al.*, 1992). La endotelina actúa sobre la hemodinámica renal disminuyendo el flujo sanguíneo renal y la velocidad de filtración glomerular (Goetz *et al.*, 1988), y

sobre la función tubular. Es posible que estos niveles renales elevados de endotelina puedan participar en las alteraciones renales presentes en este modelo de inhibición crónica de NO. Sin embargo, en un estudio de Verhagen *et al.* (1998) la administración del inhibidor N-nitro-L-arginina (L-NNA) a altas dosis durante 3 semanas concomitantes con el bloqueo del receptor ET<sub>A</sub> atenuó la hipertensión, el daño vascular, así como previno la isquemia glomerular y la proteinuria. La razón para esta diferencia entre L-NAME y L-NNA no es bien conocida y en la actualidad el papel de la endotelina en la patogénesis de la hipertensión por inhibición de la biosíntesis de NO permanece incierto.

En cuanto al papel de los *derivados del ácido araquidónico*, existen datos que apoyan la existencia de una estimulación de prostanoídes derivados de la isoforma ciclooxigenasa inducible (COX<sub>2</sub>) por el NO derivado de iNOS (Salvemini *et al.*, 1996), pero la relación entre el NO derivado de la NOS constitutiva y los productos de la ciclooxigenasa está menos clara. La prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) inhibe la liberación de NO en cultivos de células endoteliales, posiblemente por una acción mediada por AMP<sub>c</sub> (Marota *et al.*, 1992). En riñones de perro, la acción vasodilatadora renal del NO (o PGI<sub>2</sub>) es expresada solamente en presencia de inhibición de prostaglandinas (o NO), sugiriendo que estos autacoides son mutuamente antagónicos en cuanto a la síntesis y liberación del otro (Lahera *et al.*, 1990). Sin embargo, la inhibición aguda de ciclooxigenasa no agrava la hipertensión en ratas tratadas crónicamente con L-NAME, aunque aumenta la vasoconstricción renal (Baylis *et al.*, 1996). Otros estudios han demostrado que el NO inhibe la vía de la lipooxigenasa en algunos tejidos (Nakatsuma *et al.*, 1994). Todos estos datos sugieren que algunas de las respuestas vasoconstrictoras observadas en la inhibición de la biosíntesis del NO pueden ser el resultado de un aumento de las acciones de varios productos vasoconstrictores derivados del ácido araquidónico.

### **3.3. Alteraciones anatomopatológicas de la hipertensión L-NAME.**

El daño renal se ha descrito ampliamente como una de las principales alteraciones anatomopatológicas tras la inhibición crónica de la síntesis de NO; tanto es así que Zatz y Bayliss (1998) refirieron hasta cinco modalidades de daño renal tras la inhibición crónica de la NOS: *i*) glomerulosclerosis clásica, *ii*) isquemia glomerular, *iii*) necrosis segmentaria glomerular, *iv*) expansión intersticial y *v*) lesiones microvasculares. El modelo de hipertensión L-NAME se asocia con diferentes alteraciones histológicas en la microcirculación renal (Bayliss *et al.*, 1991; Ribeiro *et al.*, 1992), que podrían desempeñar un papel importante en la vasoconstricción renal que se observa en este modelo, incluso en el desarrollo de la propia hipertensión. Sin embargo esta posibilidad parece poco probable, pues al suspender la administración de L-NAME a ratas que habían recibido tratamiento con el mismo durante 6 meses, la presión arterial se normalizó (Bayliss *et al.*, 1992). También la infusión aguda de L-arginina revirtió la hipersensibilidad a los vasoconstrictores y el aumento de la pendiente de la curva flujo-presión de los riñones aislados y perfundidos de ratas L-NAME (Vargas *et al.*, 1996). Así pues, estos fenómenos parecen ser secundarios a la inhibición crónica de la síntesis de NO más que a las alteraciones morfológicas inducidas por la propia hipertensión, de lo que se deduce que las alteraciones funcionales juegan un papel preponderante en la patogenia de este modelo de hipertensión.

En el estudio de Duarte *et al.* (2002), las ratas tratadas con L-NAME durante 6 semanas presentaron un incremento significativo en el índice de peso renal, además de lesiones renales en la zona vascular, glomerular y tubulointersticial. La arteriopatía hialina y proliferativa fueron las principales y más intensas lesiones, y observaron también engrosamiento de la pared vascular con ligera disminución del lumen en todas las ratas tratadas con L-NAME, generalmente en las arterias de calibre medio. Estas ratas presentaron, además, glomerulosclerosis con un aumento marcado de la matriz mesangial en unos pocos glomérulos, muchos depósitos hialinos, necrosis tubular y una ligera atrofia tubular. Todos estos hallazgos histológicos estaban asociados con

proteinuria, lo que indicaba un deterioro funcional de la pared glomerular. En este mismo estudio, el tratamiento concomitante con quercetina previno la hipertrofia renal y redujo las lesiones del parénquima renal, las lesiones vasculares y la proteinuria.

Tsuchiya *et al.* (2010) administraron 3mg/Kg de peso de Na<sub>15</sub>NO<sub>2</sub> a ratas con hipertensión L-NAME, y demostraron que la ingesta oral de nitritos puede ser una fuente de NO *in vivo*. A partir de los datos que obtuvieron, propusieron que la suplementación dietética de nitritos es una estrategia no farmacológicas potencialmente útil para el mantenimiento de los niveles de NO circulantes con el fin de prevenir o retardar la progresión de la enfermedad renal.

En este modelo de hipertensión también se ha descrito hipertrofia del ventrículo izquierdo (Bernátová *et al.*, 1999; Duarte *et al.*, 2002; Pechánová *et al.*, 2004), remodelación cardíaca y vascular (Pechánová *et al.*, 1997; Babal *et al.*, 1997), presencia de fibrosis en el miocardio (Babál *et al.*, 1997; Pechánová *et al.*, 1997; 2004), engrosamiento de la pared vascular en la aorta (Pechánová *et al.*, 2004) y un fenotipo vascular pro-oxidante y pro-inflamatorio (Luvarà *et al.*, 1998). El tratamiento con RWP's previno la extensión de la fibrosis producida por L-NAME y redujo el engrosamiento de la pared aórtica (Pechánová *et al.*, 2004). El tratamiento con quercetina, por otro lado, redujo los índices de peso del corazón y del ventrículo izquierdo en comparación con el grupo L-NAME control (Duarte *et al.*, 2002).

### **3.4. Reactividad vascular en la hipertensión L-NAME.**

La administración de L-NAME está estrechamente asociada a la aparición de disfunción endotelial (Bryant *et al.*, 1995; Moreau *et al.*, 1997; Zatz y Baylis, 1998).

Además de la reducción de la vasodilatación dependiente de endotelio, la hipertensión inducida por L-NAME se acompaña de un aumento en la sensibilidad a los agentes vasoconstrictores, tales como la fenilefrina y cloruro de bario, y un aumento de la pendiente de la curva flujo-presión en la vasculatura renal aislada. Todas estas alteraciones contribuyen a aumentar el tono vascular y, por tanto, juegan un papel

importante en el desarrollo de este modelo de hipertensión (Vargas *et al.*, 1996). La hipersensibilidad a los vasoconstrictores así como el ascenso de la pendiente de la curva flujo-presión observados en riñones aislados y perfundidos de ratas con hipertensión inducida por L-NAME, contrasta con la respuesta normal a los vasoconstrictores obtenida tanto en ratas como en perros conscientes a los que se indujo este tipo de hipertensión (Jover *et al.*, 1993; Manning *et al.*, 1993), discrepancias que probablemente están en relación con las diferencias en los protocolos experimentales empleados.

Ratas tratadas con L-NAME mostraron una fuerte reducción en la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio inducida por ACh (Duarte *et al.*, 2002). Los autores de este trabajo describieron que el inhibidor de la COX, la indometacina, produjo un efecto débil preventivo. También observaron un incremento de la vasoconstricción dependiente de endotelio inducida por ACh en las ratas tratadas con L-NAME. Este efecto fue abolido por la quercetina y por el antagonista del receptor tromboxano-endoperoxido SQ-29, 548, lo que indica que se puede atribuir al aumento de la liberación endotelial de prostanoïdes vasoconstrictores, como se describió anteriormente en este modelo (Auch-Schwelk *et al.*, 1990; Zanchi *et al.*, 1995; Moreau *et al.*, 1997). De hecho, la producción TXB2 estimulados por la ACh se incrementó en los anillos aórticos con endotelio intacto de los animales L-NAME y este efecto fue prevenido en los de las ratas tratadas con quercetina. Sin embargo, no observaron cambios en la expresión de COX-1 ni la de COX-2 entre los diferentes grupos de tratamiento. Tomados en conjunto, estos resultados indicaban que: i) la reducción de la vasodilatación dependiente de endotelio inducida por ACh provocada por el tratamiento con L-NAME, no sólo se debía a una reducción en la síntesis de NO a través de la inhibición de la actividad de la NOS, sino también a la vasoconstricción secundaria por un incremento en la liberación de TXA2, y ii) la quercetina sólo impidió que este último efecto. Por lo tanto, una reducción en la liberación de factores vasoconstrictores

dependientes de endotelio (como TXA<sub>2</sub>) podría también contribuir al efecto hipotensor de quercetina en este modelo.

Pechánová *et al.* (2004) demostraron que el tratamiento con RWPs revertía la contracción incrementada a noradrenalina del grupo tratado con L-NAME. Además, esa mezcla de RWPs fue capaz de aumentar la vasodilatación dependiente de endotelio y mejoró la disfunción endotelial inducida por L-NAME.

### **3.5. Estrés oxidativo e hipertensión L-NAME.**

En general, el incremento en el estrés oxidativo es característico de diferentes modelos experimentales de hipertensión, incluyendo el producido por inhibición crónica de la síntesis de NO (Usui *et al.*, 1999).

El L-NAME inhibe las isoformas constitutivas Ca<sup>2+</sup> dependientes de la NOS (eNOS y nNOS) y la isoforma independientes de Ca<sup>2+</sup> inducible (iNOS) (Mitchell *et al.*, 1993). En el estudio de Duarte *et al.* (2002), la actividad total de NOS se redujo en homogenados de aorta de ratas tratadas con L-NAME de manera crónica. Los datos de disfunción endotelial *ex vivo* confirmaban, además, que la relajación dependiente de eNOS estaba claramente reducida. Por otra parte, los animales con hipertensión L-NAME muestran concentraciones plasmáticas reducidas de NO<sub>x</sub> (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> junto con NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que son los metabolitos plasmáticos principales de NO) (Bauersachs *et al.*, 1998; Usui *et al.*, 1999; Duarte *et al.*, 2002). Sin embargo, estos efectos inhibidores sobre la actividad de la NOS no se asociaron con cambios en la expresión de la enzima en los tejidos de aorta (Duarte *et al.*, 2002).

Uno de los principales sistemas protectores contra el estrés oxidativo es el ciclo redox del glutatión (GSH). El GSH tiene múltiples funciones como agente antioxidante. Funciona como un captador de ROS, incluyendo los radicales OH<sup>·</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO y peroxinitrito. Además, el GSH es un co-sustrato para la detoxificación de peróxidos por parte de la glutatión peroxidasa (GPx), evitando la peroxidación lipídica, así como la degradación de fosfolípidos de membrana y la posterior formación de MDA. Como

resultado de la acción de la GPx, GSH se oxida a GSSG, cuya acumulación en los tejidos provoca una serie de efectos nocivos. La glutatión reductasa (GRed) reduce GSSG de nuevo a GSH a través del poder reductor del NADPH (Reed *et al.*, 1995). La GPx plasmática es sintetizada y secretada por el hígado. Por tanto, la GPx hepática, junto con los valores plasmáticos de MDA no sólo reflejan el estado oxidativo hepático, sino que suponen un índice más general del estado oxidativo y la peroxidación lipídica (Vericel *et al.*, 1994; Kitts *et al.*, 1998).

Duarte *et al.* (2002) encontraron disminución de la actividad hepática de GPx y niveles elevados de MDA en el plasma e hígado de los animales tratados con L-NAME. Estos resultados indicaban que este modelo de hipertensión se asocia con alteraciones del ciclo redox del glutatión y que, como acabamos de explicar, este hecho está relacionado con un aumento del estrés oxidativo (Bauersachs *et al.*, 1998; Usui *et al.*, 1999).

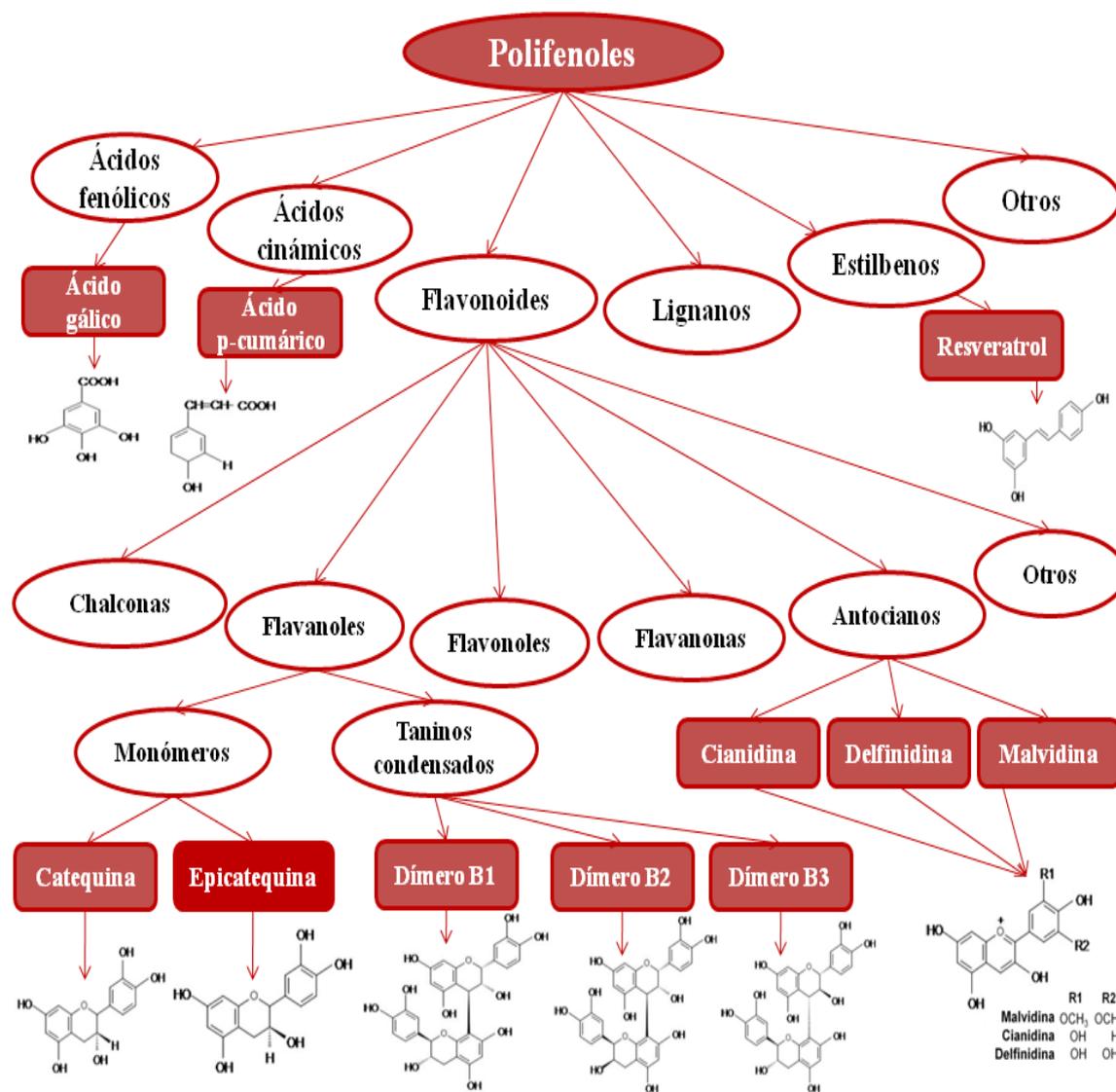
#### **4. Polifenoles del vino tinto (RWPs, *red wine polyphenols*).**

El vino, además del agua (que supone entre el 73 y el 92% del total) y del alcohol (que representa entre un 8 y un 16%), está constituido por más de 800 sustancias diferentes, unas procedentes de la uva y otras del proceso fermentativo. De entre todas ellas, podemos destacar los polifenoles, un enorme grupo de sustancias, en su mayoría de origen vegetal, que están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Abundan en frutas y verduras, así como en el té verde y, por supuesto, el vino (Kinsella *et al.*, 1993). Varios estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo habitual y moderado de vino, concretamente de vino tinto, presenta efectos beneficiosos sobre la morbilidad y mortalidad cardiovascular (Frankel *et al.*, 1993; Maxwell *et al.*, 1994; Aviram *et al.*, 2002). Y son los polifenoles contenidos en él (flavonoides, antocianos, estilbenos y ácidos hidroxicinámicos) los principales candidatos para explicar su efecto cardioprotector. Se ha sugerido que los compuestos polifenólicos presentes en el vino podrían ser los responsables de la paradoja francesa, es decir, de la menor tasa de mortalidad por cardiopatía isquémica que se observa en Francia, a pesar de su elevado consumo de grasas saturadas (St Leger *et al.*, 1979; Truelsen *et al.*, 1998).

La concentración total de compuestos polifenólicos en el vino varía entre 1,80 y 4,06 g/L (Frankel *et al.*, 1993), siendo la concentración de polifenoles en los vinos tintos de 6 a 20 veces mayor que en los blancos (Singleton *et al.*, 1980). Los polifenoles están localizados en las pepitas (60% a 80%), los hollejos (15% a 33%), la pulpa de la uva (3,5% a 5%) y el raspón (4,5% a 5,5%). La presencia de los polifenoles depende del tipo de varietal, la clase de fermentación y los factores ambientales durante la maduración (Infante, 1997).

Los compuestos fenólicos o polifenoles son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilos, incluyendo derivados funcionales ésteres, metil ésteres y glucósidos, entre otros. La naturaleza de los fenoles varía desde moléculas simples (como los ácidos fenólicos), hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos, por lo que se agrupan en diferentes clases (Fig. 7). La

forma más común de encontrarlos en las frutas y vegetales es como glucósidos, es decir, el compuesto de tipo fenólico (aglicona o genina) conjugado con uno o más residuos de azúcar (glicona).



**Figura 7. Clasificación y estructuras de los polifenoles.** Con fondo coloreado se destacan los polifenoles del vino tinto (RWPs) contenidos en la mezcla utilizada en los experimentos de esta Tesis Doctoral, así como sus estructuras. La epicatequina se resalta por la importancia que tiene en este trabajo.

#### 4.1. Flavan-3-oles.

Debido a la importancia de este grupo de polifenoles (y de la epicatequina en concreto) en el contexto global de este trabajo, debemos resaltar los flavanoles, una destacada clase de flavonoides presentes en la mayoría de las plantas superiores y considerados como elementos funcionales de diferentes bebidas y alimentos (Haslam, 1998). Su presencia en los mismos afecta a parámetros de calidad como la astringencia, amargor, acidez, dulzura, aroma y color (Aron y Kennedy, 2008).

Estructuralmente, los flavanoles están formados por un esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> con un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C (Fig. 8). Constituyen, además, la subclase de flavonoides más compleja, ya que incluye monómeros simples, dímeros, oligómeros (unión desde 3 hasta 10 moléculas de flavan-3-oles) y polímeros o taninos condensados (unión de más de 10 moléculas de flavan-3-oles). La (+)-catequina, la (-)-epicatequina, la (+)-galocatequina y la (-)-epigalocatequina son los flavanoles más comunes y suelen ser denominados como catequinas. Éstas constituyen la base de los principales grupos de taninos condensados (de las procianidinas las dos primeras catequinas y de los prodelfinidoles las dos últimas) (Escribano-Bailón, 1993). Al contrario de lo dicho anteriormente para la mayoría de los polifenoles, los flavanoles, raramente se encuentran glicosilados; aunque sí es común encontrarlos en sus formas polimerizadas.

Cuantitativamente, los flavanoles representan el grupo más importante dentro de los flavonoides en la dieta occidental (Gu *et al.*, 2004). Entre sus principales fuentes podemos citar la uva de vinificación (*Vitis vinifera*), la mora (*Rubus spp.*), el té (*Camellia sinensis*) y el cacao (*Theobroma cacao*). Sin embargo, no debemos olvidar que la concentración de flavanoles en estos alimentos varía considerablemente y que ésta puede verse afectada como consecuencia del procesamiento tecnológico (Gotti *et al.*, 2009). En el caso concreto de los mostos y vinos, están presentes sobre todo la (+)-catequina y la (-)-epicatequina (González, 1989; Carando *et al.*, 1999) y en el cacao y chocolate, la (-)-epicatequina (a la que nos referiremos a partir de ahora simplemente como epicatequina) (Schroeter *et al.*, 2006).

La ingesta media diaria de flavanoles en un adulto se ha calculado en torno a los 50 mg (Mink *et al.*, 2007). En el caso concreto de España, se ha estimado entre 18 y 50 mg al día (de Pascual Teresa *et al.*, 2002). Si analizamos más estudios, las diferencias son mayores; y es que, entre otras limitaciones, en la literatura hay una notable confusión al respecto, ya que muchos autores no hacen distinción ente los flavanoles monoméricos y las procianidinas (Mink *et al.*, 2007).

Los flavanoles han demostrado poseer efectos beneficiosos para la salud, ya que se comportan como agentes antioxidantes, anticancerígenos, cardioprotectores, antimicrobianos, antivirales y neuroprotectores (Aron y Kennedy, 2008).

De los diferentes flavanoles, la epicatequina se considera el principal componente bioactivo del cacao y otros alimentos y bebidas ricos en flavanoles (Schroeter *et al.*, 2006).

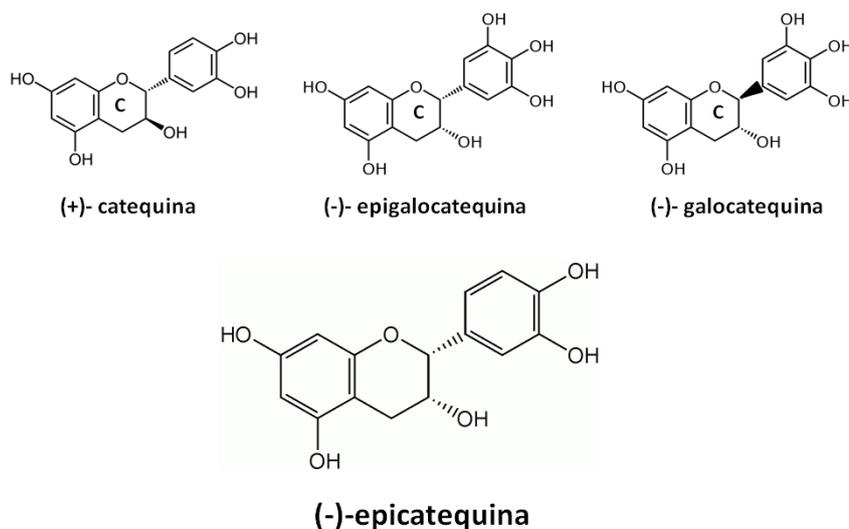


Figura 8. Estructuras de los principales estereoisómeros de los flavanoles.

## **4.2. Biodisponibilidad y metabolismo de los RWPs.**

La habilidad de un componente de la dieta para influenciar la función vascular y prevenir enfermedades cardiovasculares depende de cuánta de la dosis oral sea absorbida y en qué concentración llega al lugar de acción. La vida media plasmática depende de la influencia del metabolismo de primer paso (intestino delgado e hígado, sobre todo) y de la tasa de excreción. Por tanto, la absorción intestinal y el metabolismo de los polifenoles de plantas son un paso limitante para los efectos de esta clase de compuestos. Una ingesta de 100 mL de vino tinto por parte de voluntarios sanos causó un incremento de unos 3 mg/L en el contenido total de fenoles en plasma (Duthie *et al.*, 1998).

Los polifenoles se absorben parcialmente y sólo una fracción se excreta por orina en humanos. Las concentraciones que se alcanzan en plasma y la cantidad que se elimina por orina se da en función de la dosis oral, pero también dependen de otros factores, siendo el más importante la estructura del polifenol. Casi todos los fenoles de origen vegetal están glicosilados, y esto se reproduce en los alimentos y bebidas derivados de plantas. La glicosilación puede determinar en gran medida la eficiencia y la zona de absorción. Los derivados monoglucósidos se absorben preferentemente en el intestino delgado y se absorben mejor que otros glicósidos, como los rhamnoglucósidos, que se absorben en menor medida y más tarde (probablemente desde el colon). La absorción incrementada de monoglucósidos desde el intestino delgado se debe a la lactasa, enzima que tiene la capacidad de hidrolizar los glucósidos de flavonoides y que se requiere para la absorción y el metabolismo de estos compuestos (Németh *et al.*, 2003). Algunos polifenoles se absorben bien y una proporción significativa es excretada por orina; como ejemplos tenemos el ácido gálico, las isoflavonas genisteína y daidzeína, y las flavanonas de cítricos, hesperetina y naringenina (Manach *et al.*, 2005). Sin embargo, para otros como las antocianinas, mucho menos de un 1% de la dosis oral se recupera en orina y las concentraciones más altas en plasma se encuentran en el rango nanomolar (Manach *et al.*, 2005). Hasta la fecha, la concentración más alta de

polifenoles que se ha observado en plasma por ingestión oral en humanos se encuentra alrededor de 1-10  $\mu\text{M}$ . Estas concentraciones se observan únicamente tras la ingesta de grandes dosis de polifenoles en suplementos alimenticios, de comidas ricas en polifenoles, o de bebidas que contienen más flavonoides biodisponibles, como monómeros flavan-3-oles, isoflavonas y flavanonas.

Los flavonoides y otros polifenoles se metabolizan extensamente durante la absorción desde el intestino, y los productos típicos son conjugados en fase 2 formando, por ejemplo, derivados glucoronizados, sulfatados y metilados del polifenol original (Kroon *et al.*, 2004). Además, para muchos polifenoles, el proceso de conjugación es tan eficiente que la aglicona no es detectable en plasma ni orina (Donovan *et al.*, 2006). El metabolismo de primer paso incluye el intestino delgado y el hígado, y ambos son capaces de metabolizar polifenoles (Manach *et al.*, 2005). El riñón también tiene una capacidad significativa para modificar polifenoles pero hay pocas evidencias que apoyen un papel más importante de este órgano, probablemente porque se lo impida el hecho de que el intestino delgado y el hígado son muy eficientes en estas actividades. Muchos RWP (flavonoles, catequina/epicatequina, resveratrol, ácidos fenólicos) se conjugan eficientemente y están presentes en plasma predominantemente como metabolitos conjugados en fase 2. Por ejemplo, siguiendo a la ingestión oral, el 100 % de la quercetina y virtualmente todo el resveratrol están presentes como conjugados glucoronizados y sulfatados de la aglicona o de un derivado metilado (Day *et al.*, 2001; Vitaglione *et al.*, 2005).

Los antocianos, habitualmente no se conjugan durante la absorción, y a este respecto, son bastante peculiares. Aunque los mecanismos de absorción para los antocianos no se conozcan bien, el hecho de que aparezcan en el plasma sin metabolizar y a concentraciones extremadamente bajas (Manach *et al.*, 2005), parece indicar que estos compuestos escapan del metabolismo intestinal pasando entre los enterocitos más que a través de ellos.

***Farmacocinética de los flavanoles.***

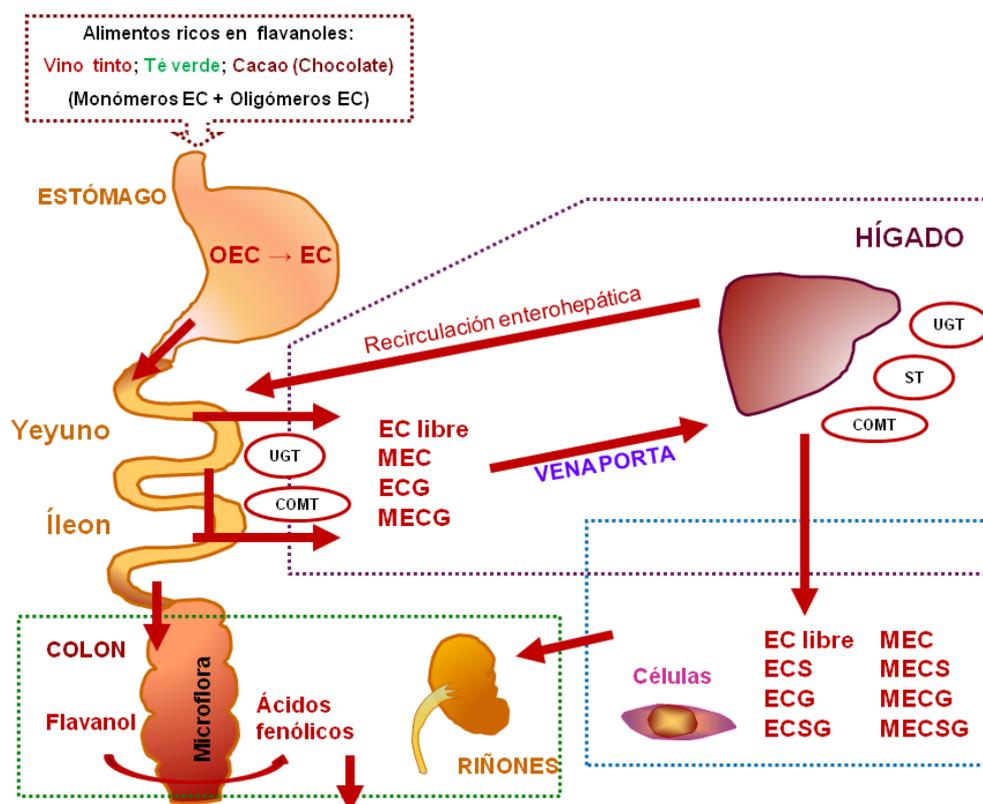
El proceso ADME de los flavanoles ha sido ampliamente investigado (Baba *et al.*, 2001; Natsume *et al.*, 2003; Spencer *et al.*, 2003; Schroeter *et al.* 2006; Auger *et al.*, 2008; Mullen *et al.*, 2009; Stalmach *et al.*, 2010), pero fueron Piskula y Terao (1998) los que estudiaron la absorción de la epicatequina e identificaron los metabolitos formados. Okushio *et al.* demostraron (1996) la presencia de epicatequina no conjugada en el plasma de rata. Piskula y Terao (1998) sugirieron que la absorción de altas dosis de este flavanol no es dosis dependiente y que, aunque las ratas poseen una alta capacidad de conjugación con el ácido glucurónico, ésta es limitada. Demostraron, además, la mayor actividad de la UDP-glucuronosiltransferasa (UGT) en la mucosa intestinal y la presencia simultánea, desde el principio, de la fracción glucurónido en casi el 90% de los metabolitos de epicatequina en el plasma. Esto sugiere firmemente que la epicatequina es absorbida e inmediatamente conjugada con ácido glucurónico en la mucosa intestinal. Estos dos autores evaluaron también la reacción de sulfatación enzimática de la epicatequina por parte de las sulfotransferasas (ST). Dicha actividad tan sólo la encontraron en el hígado de la rata, aunque se han descrito otros tejidos en los que ocurre esta reacción (Shirkey *et al.* 1979). La tercera y última ruta metabólica que exploraron fue la metilación por la catecol-O-metiltransferasa (COMT). Este proceso parece suceder más lentamente que la glucuronidación, pero sus productos permanecen en la circulación sanguínea la mayor parte del tiempo, lo que indica que es probable que sean los productos finales formados de la epicatequina absorbida. Los estudios posteriores de Spencer (2003) demostraron que en el intestino delgado se produce también dicha metilación. Asumiendo la ingesta de cantidades iguales de catequinas, la epicatequina y sus metabolitos son los flavanoles más abundantes en plasma y en orina en comparación con los demás estereoisómeros (Baba *et al.*, 2001; Donovan *et al.*, 2006; Ottaviani *et al.*, 2011). Como han demostrado diferentes estudios, casi todos los metabolitos están presentes en la circulación sanguínea como glucurónido de epicatequina y / o sulfato de epicatequina, con y sin grupo metilo (Tabla 1).

**Tabla 1. Estudios en los que se analizó la concentración de epicatequina y sus metabolitos en el plasma de ratas tras una única administración intragástrica del flavanol.**

Concentración de EC administrada	Concentraciones de metabolitos detectados				T <sub>max</sub> (h)	Autor, (año)
	EC libre	Glucuronidos	Sulfatos	Sulfoglucuronidos		
50 mg/Kg peso corporal	EC 3 µM 3'-O-MEC ND	ECG 25,2 µM 3'-O-MECG 7,4 µM	ECS 1 µM 3'-O-MECS 1,3 µM	ECSG ND 3'-O-MECS G 4,4 µM	1	Da Silva et al. (1998)
250 mg/Kg peso corporal	EC 13,3 µM 3'-O-MEC 0,9 µM	ECG 52,1 µM 3'-O-MECG 5,9 µM	ECS ND 3'-O-MECS 7,6 µM	ECSG ND 3'-O-MECS G 23,2 µM	1	Da Silva et al. (1998)
500 mg/Kg peso corporal	EC 20 µM 3'-O-MEC 5 µM 4'-O-MEC	ECG 21,6 µM 3'-O-MECG 175 µM 4'-O-MECG			2	Okushio et al. (1999)
100 mg/Kg peso corporal	EC 3 µM 3'-O-MEC ND	ECG 15,56 µM 3'-O-MECG 3,7 µM	ND	ND	2	Harada et al. (1999)
50 mg/Kg peso corporal	EC 3 µM 3'-O-MEC ND	ECG 12 µM 3'-O-MECG 3 µM	ECS ND 3'-O-MECS 10 µM	ECSG 18 µM 3'-O-MECS G 10 µM	1	Baba et al. (2001)
100 mg/Kg peso corporal	EC 4,5 µM 3'-O-MEC 1,2 µM	ECG 44,64 µM 3'-O-MECG 14,4 µM 4'-O-MECG 1,2 µM	ND	ND	2	Abd el Mohsen et al. (2002)

*EC*, epicatequina; *3'-O-MEC*, 3'-O-metilepicatequina; *4'-O-MEC*, 4'-O-metilepicatequina; *ECG*, glucurónido de epicatequina; *3'-O-MECG*, glucurónido de 3'-O-metilepicatequina; *4'-O-MECG*, glucurónido de 4'-O-metilepicatequina; *ECS*, sulfoepicatequina; *3'-O-MECS*, sulfo-3'-O-metilepicatequina; *ECSG*, glucurónido de sulfoepicatequina; *3'-O-MECSG*, glucurónido de sulfo-3'-O-metilepicatequina; *ND*, no detectable. Tabla extraída y modificada de Abd el Mohsen et al., 2002.

En el caso de los humanos, la concentración de 1 µM de epicatequina es equivalente al pico de los niveles en sangre observados a las 2 horas en voluntarios que consumieron alimentos ricos en flavanoles (Richelle et al., 1999; Rein et al., 2000; Cienfuegos-Jovellanos et al., 2009). Otros autores han establecido los niveles de epicatequina en suero humano entre 0,2 y 0,4 µM tras la ingesta de 80 g de chocolate (Rein et al., 2000) y de 25 g de chocolate semidulce (Holt et al., 2002). De esta manera, tras la absorción, la epicatequina libre representa una porción menor del total de flavanoles en el plasma; sin embargo, sus principales metabolitos, los compuestos metilados, glucuronizados y sulfatados se encuentran en una considerable proporción (Natsume et al., 2003; Kroon et al., 2004; Schroeter et al., 2006; Stalmach et al., 2010).



**Figura 9. Esquema del proceso ADME de la epicatequina.** Representación esquemática de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción propuestos por Piskula y Terao (1998), posteriormente confirmados por Baba et al (2001) y ampliados con los estudios de Spencer (2003). La epicatequina se ingiere en forma de monómeros o formando oligómeros. La escisión de las procianidinas puede ocurrir en el estómago, por ser un ambiente de bajo pH. Los monómeros y los dímeros se absorben en el intestino delgado, mientras que los oligómeros no se absorberán. Además de dicha absorción, en el yeyuno y el íleon tiene lugar la glucuronidación de flavanoles por la acción de las enzimas UGT y una amplia metilación por la acción de la COMT. Los metabolitos resultantes entran en la vena porta y se someten a un posterior metabolismo en el hígado y/o el riñón. Los flavanoles no absorbidos y que alcanzan el colon serán degradados por la microflora allí presente en pequeños ácidos fenólicos, que también pueden ser absorbidos (Roowi et al., 2010). La medida en la que estos ácidos fenólicos son absorbidos en el colon no está claro en la actualidad. Sin embargo, se detectan en el plasma y son, a menudo, más conjugados y metabolizados en el hígado. El destino final de los metabolitos de EC será la excreción renal, en la mayoría de los casos, o a través de la bilis. **COMT**, catecol-O-metiltransferasa; **EC**, epicatequina monomérica; **MEC**, metilepicatequina; **ECG**, glucurónido de epicatequina; **MECC**, glucurónido de metilepicatequina; **ECS**, sulfoepicatequina; **MECS**, sulfometilepicatequina; **ECSG**, glucurónido de sulfoepicatequina; **MECSG**, glucurónido de sulfometilepicatequina; **UGT**, UDP-glucuronosiltransferasa; **ST**, sulfotransferasas; **OEC**, oligómeros de epicatequina.

### **4.3. Evidencias epidemiológicas de la protección cardiovascular.**

Estudios epidemiológicos nos indican que el consumo bajo o moderado de bebidas alcohólicas reduce la mortalidad (de Lorimier, 2000) y posee un efecto protector contra varias enfermedades cardiovasculares (Athiros *et al.*, 2008). En un reciente estudio de cohortes se ha observado un incremento significativo del riesgo de hipertensión sólo con el consumo de cerveza, licores y vino blanco, mientras que el consumo de vino tinto no mostró ningún efecto significativo (Sesso *et al.*, 2008). Este estudio está en la misma línea que otro llevado a cabo en nuestro país (Núñez-Córdoba *et al.*, 2009), donde se evaluó la relación entre el tipo, la cantidad y la frecuencia de bebida alcohólica y la incidencia de hipertensión. Los resultados obtenidos sostienen la hipótesis de que hay un efecto beneficioso del vino tinto en comparación con otras bebidas alcohólicas. En particular, el consumo de vino tinto está inversamente asociado con la mortalidad por enfermedad cardiovascular (Gronbaek, 2002) y los efectos protectores se observan a partir de un consumo de 300 mL vino al día (Rotondo *et al.*, 2001).

Este fenómeno se observó ya en 1819, cuando Samuel Black atribuyó efectos beneficiosos al hábito francés de consumir vino tinto con las comidas, mientras que el primer estudio científico lo publicó Cabot en 1904. La primera comparación sobre la mortalidad por enfermedad coronaria en países donde preferentemente se consumía vino frente a aquéllos donde se consumía cerveza tuvo lugar 75 años después. St. Leger *et al.*, (1979) fueron los primeros en demostrar una destacada relación inversa entre el consumo del vino y la mortalidad por la enfermedad cardíaca isquémica. Sus resultados fueron confirmados por análisis retrospectivos posteriores (Criqui y Ringel 1994). Renaud *et al.* (1992) introdujeron el término “paradoja francesa” para subrayar la baja tasa de mortalidad por enfermedad isquémica cardíaca en Francia a pesar de la alta cantidad de grasas saturadas en su dieta, lo que usualmente se asocia con un incremento en la mortalidad por enfermedad cardíaca coronaria (Renaud *et al.*, 1992, Howard *et al.*, 2002, Saucier *et al.*, 1999, Araim *et al.*, 2002). Atribuyeron este hecho inusual al consumo de vino tinto basándose en los descubrimientos del proyecto MONICA

(*MONItoring system for CArdiovascular disease*), un programa organizado por la Organización Mundial de la Salud. Investigadores de 21 países estudiaron a más de 7 millones de hombres y mujeres (entre 35 y 64 años de edad) de 37 poblaciones mayoritariamente europeas durante un periodo de 10 años, desde mediados de los 80 hasta mediados de los 90. Los investigadores observaron una tasa de mortalidad por enfermedad cardíaca coronaria menor en Francia comparado con el Reino Unido y los Estados Unidos, a pesar del alto consumo de grasas saturadas y de unos niveles de colesterol en plasma similares.

Podríamos pensar en atribuir estos efectos beneficiosos encontrados a factores de confusión relacionados con los hábitos dietéticos u otros estilos de vida, sin embargo, en el estudio SUN (Seguimiento Universidad de Navarra) se observó que había un patrón dietético similar entre los bebedores de vino tinto y el resto de participantes (Alcacer *et al.*, 2008), lo que sugiere que el efecto cardioprotector de esta bebida se debe a la implicación de componentes propios del vino tinto distintos del alcohol como son los polifenoles.

Diferentes estudios de cohortes prospectivos [*Zutphen Elderly Study* (Hertog *et al.*, 1993; Arts *et al.*, 2001a), *Iowa Women's Health Study* (Mink *et al.*, 2007; Arts *et al.*, 2001b) y *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (Buijsse *et al.*, 2010)] y un estudio retrospectivo antropológico (Bayard *et al.*, 2007) proporcionan diversas evidencias de efectos primarios de protección cardiovascular de los flavanoles y procianidinas. En el primero de ellos, el *Zutphen Elderly Study*, se concluyó que la ingesta diaria de flavanoles poseía una asociación con la reducción en la mortalidad por isquemia cardíaca. En el análisis prospectivo denominado *Iowa Women's Health Study*, los resultados publicados después de 13 (Arts *et al.*, 2001b) y 16 años (Mink *et al.*, 2007) de seguimiento difieren ligeramente en su clasificación de los alimentos y análisis, pero ambos ofrecen perspectivas interesantes sobre los tipos de alimentos a los que se pueden deber los resultados epidemiológicos beneficiosos. Se determinó, de tal manera, una asociación inversa entre la mortalidad por cardiopatía coronaria y el

consumo de catequina y epicatequina, tal como se define por la ingesta de té, manzanas y peras, así como de chocolate. Recientemente, Buijsse *et al.* (2010) han confirmado dichos efectos beneficiosos en el estudio *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. Los autores establecieron con este gran estudio de cohortes, una relación inversa entre el consumo de chocolate y el riesgo de enfermedad cardiovascular. Por otro lado, los estudios que investigaron el menor desarrollo de la hipertensión y la disminuida mortalidad debida a causas cardiovasculares en los indios Kuna, confirman la idea de que una alta ingesta en la dieta de flavanoles y procianidinas se asocia con efectos beneficiosos vasculares (Hollenberg *et al.*, 1997; 2005; 2006; McCullough *et al.*, 2006). Estos trabajos demostraron cómo los indios que vivían en las islas cercanas a Panamá e ingerían altas cantidades de flavanoles (debido a una dieta rica en cacao) poseían un menor riesgo de desarrollar hipertensión, y cómo esta protección desaparecía cuando migraban a la ciudad y disminuían la ingesta de cacao. Además, un estudio prospectivo recientemente publicado (*Stockholm Heart Epidemiology Program*, Janszky *et al.*, 2009) asoció la alta ingesta de chocolate con una reducción de la mortalidad por causas cardíacas.

Este resumen de diferentes estudios epidemiológicos nos da idea de la implicación en los efectos beneficiosos a nivel cardiovascular de los polifenoles del vino tinto y de los flavanoles en concreto; sin embargo, debemos ser cautos debido a las diferentes lagunas, limitaciones y dudas (revisadas en Schroeter *et al.*, 2010) que se plantean cuando analizamos detenidamente todos estos trabajos.

#### 4.4. Efectos cardioprotectores de los RWPs.

De las numerosas acciones que presentan los compuestos polifenólicos del vino tinto, se ha propuesto que son sus efectos antioxidantes, antiagregantes, vasodilatadores y antiangiogénicos (Stoclet *et al.*, 2004) los que podrían explicar el efecto beneficioso del consumo moderado de vino tinto en la patología cardiovascular. Muchos estudios han intentado determinar cuál de los compuestos polifenólicos (Álvarez-Sala *et al.*, 2000) es el responsable de estos efectos, aunque también cabe la posibilidad de que se necesite el espectro total de fenoles en el vino tinto.

##### 4.4.1. Efectos antioxidantes

La hipótesis más popular sobre el mecanismo por el que se dan los efectos beneficiosos de los polifenoles implica el efecto antioxidante directo, a través de su interacción con el  $O_2^-$  y otras especies reactivas de oxígeno como los radicales hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) y peroxilo (Hu *et al.*, 1995, Nijveldt *et al.*, 2001).

Una mezcla de RWPs fue capaz de restablecer la relajación en arteria femoral a ACh tras ser abolida por peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Zenebe *et al.*, 2002). Este descubrimiento claramente demostró que los RWPs tienen efectos antioxidantes *in vitro*. Además, los RWPs afectaron parcialmente la curva concentración respuesta del donador de NO, nitroprusiato sódico (NPS), en anillos sin endotelio. Ambos efectos mostraron la capacidad de los RWPs para proteger al NO de la destrucción por radicales libres, lo que da como resultado la mejora de las respuestas vasorrelajantes.

De acuerdo con estos resultados, Diebolt *et al.* (2001) demostraron que el efecto relajante de los compuestos polifenólicos del vino tinto implican un mecanismo sensible a captadores de anión  $O_2^-$  y Schuldt *et al.* (2000) expusieron que los polifenoles eran capaces de captar radicales libres del oxígeno dentro de un límite, lo que llevaba a un incremento en los niveles de NO.

Nigdikar *et al.* (1998) demostraron que el vino blanco podía tener efectos prooxidantes. Esto nos hace suponer que es el vino tinto, y no el blanco, el que tiene una

importante actividad antioxidante por el alto contenido en polifenoles. Por ello, aunque el alcohol pueda contribuir al efecto cardioprotector, el principal efecto protector viene de los polifenoles. Todo esto demostraría por qué un extracto fenólico sin alcohol obtenido de vino tinto puede tener efectos similares al vino tinto en sí.

La capacidad antioxidante de los alimentos ricos en flavanoles como el cacao y el chocolate ha sido ampliamente demostrada (Baba et al., 2000; Serafini et al., 2003; Ramiro-Puig y Castell, 2009). La epicatequina *per se* también ha mostrado esta facultad tanto *in vitro* (Natsume et al., 2004; Steffen et al., 2007; Martin et al., 2009) como en animales (Da Silva et al., 1998; Terao, 1999) y en humanos (Rein et al., 2000; Wang et al., 2000). En el estudio de Steffen et al. (2007) se demostró que la epicatequina era capaz de captar ROS; pero las concentraciones a las que tanto la epicatequina como otros flavonoides poseen esta capacidad, es poco probable que se consiga *in vivo* debido a la biodisponibilidad limitada de todos ellos. Sin embargo, los hallazgos más recientes han sugerido que ciertos flavonoides son capaces de estimular vías de señalización citoprotectoras (Schroeter et al., 2001; 2007; Mandel et al., 2004; Williams et al., 2004), y lo hacen en concentraciones fisiológicamente relevantes, que son inferiores a los que tienen importantes efectos antioxidantes (Schroeter et al., 2007; Vauzour et al., 2007). Una vía de protección que es particularmente interesante respecto al estrés oxidativo implica la activación del elemento de respuesta antioxidante (ARE, *antioxidant response element*), que son secuencias específicas de DNA que codifican la expresión de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes (Friling et al 1990; Rushmore et al 1991). Estos incluyen enzimas de fase II detoxificantes como la flavoproteína NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) y hemo-oxigenasa-1 (Hmox-1), y enzimas antioxidantes como la glutatión-S-transferasa (GST) (Nguyen et al. 2003). Se sabe que la expresión de la mayoría de ellos se regula por unión al ARE por el factor de transcripción Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor*) (Itoh et al, 1999). Hay evidencias de que diferentes flavonoides son capaces de regular la expresión mediada por ARE (Valerio et al., 2001, Maher y Hanneken, 2005; Kweon et al., 2006)

y estudios en los que se ha demostrado específicamente con epicatequina (Bahía *et al.*, 2008; Granado *et al.*, 2009). Además, existen diversos estudios *in vitro* en los que se han observado incrementos en los niveles de GSH tras el tratamiento con epicatequina (Rizvi *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2010).

### ***Efectos sobre las subunidades de la NADPH oxidasa.***

En modelos animales de hipertensión inducida por angiotensina II (Ang II) se ha descrito que los polifenoles contenidos en el vino tinto previenen la sobreexpresión de las subunidades de la NADPH oxidasa: p22<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup> (Sarr *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2007). En el trabajo de Jiménez *et al.* (2007), los RWPs disminuyeron la actividad de la NADPH oxidasa de manera concentración dependiente. Además, este extracto de polifenoles disminuyó la expresión de la subunidad p22<sup>phox</sup> que estaba incrementada en las ratas con hipertensión DOCA-sal. López-Sepúlveda *et al.* (2008) describieron cómo el tratamiento crónico con RWPs fue capaz de reducir la expresión génica y proteica de las subunidades p47<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> en ratas SHR y SHR ovariectomizadas. Además de los dos trabajos anteriores, nuestro grupo (Romero *et al.*, 2009) ha demostrado que la ET-1 activa la NADPH oxidasa mediante la sobreexpresión de la subunidad p47<sup>phox</sup> en anillos aórticos de rata, lo que contribuía a una mayor producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La quercetina, uno de los polifenoles presentes en el vino tinto, era capaz de prevenir dicho aumento en la producción vascular de O<sub>2</sub><sup>-</sup> reduciendo la sobreexpresión de esa subunidad.

La proteína cinasa C (PKC) es una enzima fundamental para la activación de la NADPH oxidasa (el Benna *et al.*, 1994) ya que es la responsable de fosforilar la p47<sup>phox</sup>, paso limitante para que la NADPH oxidasa se active. Otra posible vía para disminuir la actividad de la NADPH oxidasa consistiría pues en inhibir la actividad PKC y son varios los autores que haciendo estudios en plaquetas han descrito polifenoles con esta capacidad (Pignatelli *et al.*, 2006, Nardini *et al.*, 2000). La ET-1 es un potente estimulador de la PKC (Takenaka *et al.*, 1993); en el mismo estudio ya mencionado de Romero *et al.* (2009), vimos cómo la quercetina reducía de manera significativa el

incremento en la actividad PKC producido por ET-1, previniendo de este modo el aumento en la producción de  $O_2^-$ .

Steffen *et al.* (2008) comprobaron cómo al administrar epicatequina a cultivos celulares de HUVEC, éstas eran capaces de convertirla en un compuesto metilado, adquiriendo la epicatequina la capacidad de inhibir a la NADPH oxidasa de manera similar a la apocinina.

### ***Efectos sobre las lipoproteínas de baja densidad.***

Se ha visto que el consumo de vino (Fuhrman *et al.*, 1995), de RWPs (Nigdikar *et al.*, 1998) o mosto de uva tinta (Stein *et al.*, 1999) incrementa la capacidad antioxidante del plasma y reduce la oxidabilidad de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low Density Lipoproteins*) circulantes. La oxidación de las LDL es un proceso clave en la aterogénesis (Sumpio *et al.*, 2004), con lo que resulta de gran importancia cómo los polifenoles reducen la sensibilidad de las LDL a la peroxidación.

En hámsters, 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 (Stein *et al.*, 1999). Sin embargo, la reducción de la oxidabilidad de las LDL tras la suplementación dietética con polifenoles del vino no se ha visto en todos los estudios realizados, a pesar del aumento de la capacidad antioxidante del plasma (Carbonneau *et al.*, 1997).

Se han publicado numerosos trabajos en los que se concluye que la ingesta de alimentos ricos en flavanoles provoca una reducción en las LDL tanto *in vitro* (Waterhouse *et al.*, 1996; Osakabe *et al.*, 2002) como en animales (Baba *et al.*, 2000; Vinson *et al.*, 2006) y en humanos (Kondo *et al.*, 1996; Osakabe *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2001; Grassi *et al.*, 2005; 2008).

***Efecto prooxidante.***

De manera sorprendente, en células endoteliales coronarias porcinas, se ha observado que las relajaciones mediadas por factores hiperpolarizantes derivados de endotelio (FHDE) y la hiperpolarización generada por los RWPs son dependientes de un mecanismo sensible a reacciones de oxido-reducción que implica la formación de aniones  $O_2^-$  por una enzima flavín dependiente (Ndiaye *et al.*, 2003; 2005).

Lo mismo ocurre con la epicatequina, que aunque posee potentes efectos antioxidantes, a elevadas dosis de este compuesto se ha demostrado que también puede actuar como pro-oxidante (Lapido *et al.*, 2002; Azam *et al.*, 2004). Tanto es así, que algunos de los efectos anticancerígenos que presenta este flavanol, es muy posible que se deban más a sus efectos pro-oxidantes que a los antioxidantes (Azam *et al.*, 2004; Federico *et al.*, 2007).

**4.4.2. Efectos sobre las lipoproteínas de alta densidad.**

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High Density Lipoproteins*) previenen la acumulación de colesterol en células periféricas y protegen frente a aterosclerosis transportando el colesterol de las arterias al hígado para su posterior metabolismo y excreción. El consumo de alcohol incrementa los niveles de HDL y podría explicar, al menos en parte, el efecto protector del vino (Renaud *et al.*, 1992; Nigdikar *et al.*, 1998; Perret *et al.*, 2002; Araya *et al.*, 2001). Informes previos (Fuhrman *et al.*, 1995), en los cuales hombres sanos recibieron 400 mL/día de vino durante 2 semanas, mostraron un incremento de las HDL con la ingesta de vino tinto, pero no con la de vino blanco, indicando una posible implicación de los RWPs en este efecto.

Aunque algunos estudios en animales han demostrado efectos positivos tras la suplementación con polifenoles derivados de uva libres de alcohol (Martín-Carrón *et al.*, 1999; 2000; Araya *et al.*, 2001), en estudios en humanos no se ha observado un incremento claro en las HDL (Avellone *et al.*, 2006; Naissides *et al.*, 2006). Sin embargo, Castilla *et al.* (2006) sí describieron una mejora del perfil lipídico en respuesta

al zumo de uva tinta con disminución de los niveles de LDL y un incremento en los niveles de HDL. Por lo tanto, aunque el etanol tiene un claro efecto incrementando las HDL, el incremento visto en estas lipoproteínas por el consumo de vino tinto puede deberse también al componente polifenólico.

#### **4.4.3. Efectos sobre las células del músculo liso vascular.**

La inhibición de la proliferación y la migración de las células del músculo liso vascular (CMLV) debería, en teoría, retardar o inhibir la aparición de aterosclerosis porque constituye un componente importante en la aterogénesis (Araim *et al.*, 2002; Rivard y Andres, 2000). La proliferación anormal de CMLV en la capa íntima de la arteria se piensa que pueda ser un paso fundamental en la formación de la placa de ateroma. Hay investigaciones (Araim *et al.*, 2002) en las que CMLV de aorta bovina estuvieron tratadas con medio de crecimiento suplementado con vino tinto desalcoholizado, extracto polifenólico de vino tinto, o resveratrol durante 48 horas. Valorando la síntesis de ácido desoxirribonucleico (DNA, *deoxyribonucleic acid*), observaron que el vino tinto y los RWPs inhibían la proliferación de CMLV de manera dosis-dependiente.

El resveratrol inhibe la expresión de moléculas de adhesión intracelular (ICAM)-1 y de moléculas de adhesión de las células vasculares (VCAM)-1, reduciendo la adhesión de monocitos y granulocitos (Carluccio *et al.*, 2003). La inhibición de la expresión de ICAM en células endoteliales se observa junto con una reducción de la actividad del factor nuclear  $\kappa$ B, sugiriendo que los RWPs tienen un papel en el mantenimiento de la integridad de la estructura vascular y en la restauración funcional de células endoteliales dañadas (Iijima *et al.*, 2002).

También se ha descrito cómo un extracto de proantocianidinas extraído de semillas de uva disminuyó la expresión de VCAM-1 inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF, *Tumor Necrosis Factor*)- $\alpha$  en células primarias endoteliales umbilicales humanas, lo que llevó a reducir la adherencia de leucocitos y células T (Sen y Bagchi,

2001; Bagchi *et al.*, 2002). Se obtuvieron resultados similares en un estudio en humanos (Kalin *et al.*, 2002); en pacientes con esclerosis sistémica se vio que los niveles plasmáticos de VCAM-1, ICAM-1 y selectina P eran mayores que en voluntarios sanos. La administración de 100 mg/día de proantocianidinas derivadas de semillas de uva durante un mes disminuyó los niveles elevados de estas moléculas de adhesión.

#### **4.4.4. Efectos sobre el proceso regenerativo: impacto sobre la circulación de células progenitoras endoteliales.**

Las células progenitoras endoteliales (CPE), derivadas de la médula ósea, parecen contribuir en la reparación del endotelio dañado y también en la formación de nuevos vasos. El número y función de CPE circulantes está influido por diferentes factores fisiológicos, patológicos y también por la acción de determinados fármacos y citocinas (Oliveras *et al.*, 2008).

Diferentes autores han descrito cómo la ingesta durante 2-4 semanas de alimentos ricos en flavanoles, pueden movilizar CPE en pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC), fumadores sanos y no fumadores (Kim *et al.*, 2006; Heiss *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010). En un estudio aleatorio a doble ciego en pacientes con enfermedad arterial coronaria, la administración de cacao enriquecido en flavanoles (durante 30 días) se relacionó con un aumento de la vasodilatación mediada por flujo (FMD, *flow-mediated vasodilation*), la disminución de la presión arterial y un aumento significativo de CPE (Heiss *et al.*, 2010). Del mismo modo, en fumadores sanos, la ingesta de té verde (8 g / día) durante 2 semanas provocó un aumento significativo de la FMD y de CPE. Curiosamente, una menor cantidad de este té verde (5 g / día) durante 4 semanas no aumentó las CPE de pacientes en hemodiálisis, a pesar de que incrementó la FMD de manera significativa (Park *et al.*, 2009). Huang *et al.* (2010) han demostrado recientemente que el consumo de 300 mL de vino tinto durante 3 semanas en sujetos sanos dio lugar a un incremento significativo de CPE, que fue acompañado por el aumento de FMD.

#### **4.4.5. Efectos sobre la agregación plaquetaria.**

Las sustancias que pueden atenuar la agregación de las plaquetas, como la aspirina, las prostaciclina o el nitroprusiato, son protectores para la enfermedad isquémica cardíaca (Demrow *et al.*, 1995). Es conocida la capacidad del alcohol para actuar mediante mecanismos antitrombóticos (Wannamethee *et al.*, 2003), pero los polifenoles también parecen inhibir la agregación plaquetaria, lo que podría formar parte de los efectos cardioprotectores del vino tinto (Demrow *et al.*, 1995; Keevil *et al.*, 2000; Freedman *et al.*, 2001).

Experimentos *in vitro* demostraron que la quercetina incrementa los niveles plaquetarios de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc) provocando una disminución en los niveles de calcio citosólico y en la actividad plaquetaria. También se sabe que la quercetina potencia la acción de la prostaglandina (PG) I<sub>2</sub> y que esto incrementa los niveles de AMPc (Pace-Asciak *et al.*, 1995). Se ha visto que el resveratrol también es capaz de inhibir en un 41,9% la agregación plaquetaria a partir de una concentración de 1,2 µg/L (Bertelli *et al.*, 1995).

Numerosos estudios sugieren que el consumo agudo de bebidas y alimentos ricos en flavanoles pueden provocar inhibición en la agregación plaquetaria (Freedman *et al.*, 2001; Holt *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2003; Ostertag *et al.*, 2010).

#### **4.4.6. Efectos sobre la función endotelial.**

Fitzpatrick *et al.*, (1995) describieron por primera vez que el vino tinto y las uvas producen un efecto vasodilatador dependiente de endotelio, que parece estar mediado por el incremento de la síntesis de NO y/o aumento de su actividad biológica. Estudios posteriores han confirmado la participación del NO en los efectos vasodilatadores de los polifenoles del vino (Andriambelison *et al.*, 1997, Andriambelison *et al.*, 1999, Duarte *et al.*, 2004). También se ha descrito que estos compuestos incrementan la producción de otros agentes vasodilatadores como el FHDE (Ndiaye *et al.*, 2003, Duarte *et al.*, 2004) y las prostaciclina (Schramm *et al.*, 1997) e inhiben la síntesis del péptido

vasoconstrictor, ET-1, en células endoteliales aórticas bovinas por supresión de la transcripción del gen de la ET-1.

Jiménez *et al.* demostraron en 2007 que los anillos aórticos obtenidos de ratas DOCA-sal tratadas con RWPs mostraban un incremento significativo de la vasodilatación inducida por ACh comparado con los animales DOCA-sal. El tratamiento con RWPs (López-Sepúlveda *et al.*, 2008) aumentó de manera significativa la relajación inducida por ACh en anillos aórticos de ratas SHR y SHR ovariectomizadas.

Diferentes estudios de intervención clínica han comprobado los efectos de alimentos ricos en flavanoles (cacao, chocolate negro, té, zumo de uva y vino tinto) sobre la respuesta vasodilatadora endotelial (Hooper *et al.*, 2008). En general, estos estudios demuestran que la ingesta de productos ricos y/o enriquecidos con flavanoles inducen un incremento agudo y sostenido o restablecimiento de la vasodilatación dependiente de endotelio en sujetos sanos (Agewall *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2003; Engler *et al.*, 2004; Vlachopoulos *et al.*, 2005; Grassi *et al.*, 2005; Hermann *et al.*, 2006), en individuos con factores cardiovasculares de riesgo (fumadores, diabetes mellitus, hipertensión, hipercolesterolemia) (Hermann *et al.*, 2006; Wang-Polagruto *et al.*, 2006; Grassi *et al.*, 2005; 2008; Balzer *et al.*, 2008), en pacientes con trasplante de corazón (Flammer *et al.*, 2005), en pacientes con hemodiálisis (Park *et al.*, 2009) o en pacientes con enfermedad arterial coronaria manifiesta (Tabla 2, pag. 84).

La relación causal entre la ingesta de flavanoles y una mejora de la función vascular ha sido corroborada en estudios con flavanoles monoméricos puros. La epicatequina y el galato de epigallocatequina, administrados por vía oral, demostraron un incremento en la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio medida en la arteria braquial como FMV o determinada con tonometría arterial periférica (PAT, *peripheral artery tonometry*) en la punta de los dedos (Schroeter *et al.*, 2006; Widlansky *et al.*, 2007).

***Los polifenoles inducen incremento de la expresión de eNOS.***

La incubación prolongada de células endoteliales con vino tinto incrementa la expresión de NO sintasa endotelial (eNOS, *endothelial Nitric Oxide Synthase*) (Wallerath *et al.*, 2002; 2003). Sin embargo, este efecto se alcanzó con grandes volúmenes de vino tinto (1% v/v en medio de cultivo durante 10 días, 3% v/v en exposiciones de 24 horas y 10% v/v durante 12 horas). El efecto estimulador se atribuyó a los polifenoles, ya que dando sólo etanol a las células no se observó efecto en la expresión de eNOS (Wallerath *et al.*, 2003), mientras que usando un extracto desalcoholizado de vino tinto sí se observó un incremento (Leikert *et al.*, 2002). Ha de tenerse en cuenta que esto último se obtuvo también con una concentración relativamente alta del extracto (400 mg/L).

El resveratrol también estimuló la expresión de la eNOS en concentraciones que van de 10 a 100  $\mu$ M (Hsieh *et al.*, 1999; Wallerath *et al.*, 2002). La sobreexpresión del ácido ribonucleico (RNA, *Ribonucleic Acid*) mensajero (mRNA) se asoció a un aumento en la expresión proteica de eNOS y a una mayor actividad enzimática. El resveratrol incrementa la actividad del promotor de la eNOS (efecto transcripcional) y estabiliza el mRNA de la eNOS (efecto posttranscripcional) (Wallerath *et al.*, 2002). Cuando células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) se expusieron a 7,4  $\mu$ mol/L de resveratrol, la expresión del mRNA de la eNOS se incrementó en un 150 % comparado con los controles; el vino tinto produjo un incremento del 230 %. Por ello, podemos concluir que el resveratrol no es el único agente responsable de la relajación vascular que ejercen los RWPs.

En un estudio reciente de Appeldoorn *et al.*, (2009) en células EA.hy926 se comprobó el potencial de 33 polifenoles diferentes para incrementar los niveles de NO. Se usaron polifenoles que podían tener un potencial vasoactivo por estar contenidos en el chocolate y en el vino tinto, esto incluye catequina, epicatequina y proantocianidinas. De los 33 compuestos polifenólicos que se probaron a una concentración de 100  $\mu$ M, sólo el resveratrol, la quercetina y los galatos de epigallocatequina y de epicatequina

tenían la habilidad de incrementar los niveles de NO. Además, se vio que había una correlación dosis dependiente entre la estimulación de NO y la sobrerregulación de la eNOS para estos compuestos, lo que sugiere que la estimulación de la expresión de la eNOS contribuye a los niveles incrementados de NO.

***Los polifenoles inducen un incremento en la actividad de la eNOS.***

Un estudio de Zenebe *et al.*, (2002) mostró evidencias de que una mezcla de polifenoles contenidos en el vino tinto ejerce relajación dependiente de endotelio en arteria femoral de rata. El hecho de que la relajación que produce este compuesto en dicha arteria fuera abolida por L-NAME y restablecida por L-arginina nos confirma la implicación del NO en la vasorrelajación que produce esta mezcla. Demostraron que la administración de estos RWPs en concentraciones de  $10^{-4}$  a  $10^{-9}$  mg/mL incrementaba la actividad NOS de manera dosis-dependiente. La máxima activación de la NOS se alcanzó a una concentración de  $10^{-4}$  mg/mL, lo que está en consonancia con la máxima relajación producida por este compuesto en la arteria femoral a  $10^{-5}$  mg/mL.

Fitzpatrick *et al.*, (1993) y Cishek *et al.*, (1997) también observaron que el extracto de piel de uva tinta y los polifenoles del vino respectivamente producían relajación de anillos aórticos con endotelio, estando implicado el NO en las respuestas relajantes. Ambos autores documentaron que las respuestas relajantes estaban asociadas a un incremento de GMPC y que estaban abolidas por L-NAME. Flesh *et al.*, (1998) también documentaron un incremento en la concentración de GMPC en anillos aórticos de rata tras exponerlos a ingredientes fenólicos de la uva y a vinos tintos de barrica. Como la guanilato ciclasa actúa como un receptor intracelular de NO (Lancaster 1992), es posible que el aumento en la concentración de NO fuera la responsable del aumento en los niveles de GMPC, lo que está en consonancia con el hecho de que la actividad de la eNOS aumenta tras la administración del compuesto utilizado por Zenebe *et al.*, (2002).

Aunque los mecanismos por los cuales los flavanoles median sus efectos vasculares no se conocen totalmente, basándonos en datos clínicos, en estudios en animales e *in*

*vitro*, los efectos a corto plazo pueden estar relacionado con un aumento en la actividad de la NOS (Schewe et al., 2008). El mecanismo preciso y la(s) estructura (s) biológica (s) o receptor (es) sobre los que actúan los flavanoles no se han identificado *in vivo*. Además de los efectos directos sobre la eNOS, se han propuesto efectos inhibitorios sobre las vías que puedan afectar negativamente a su actividad, como la NADPH oxidasa, la enzima convertidora de angiotensina (ECA), el inhibidor endógeno de la síntesis de NO dimetilarginina asimétrica (ADMA), y la ET-1, por parte de este grupo de flavonoides (Schewe et al., 2008). La administración oral de alimentos ricos en flavanoles (extracto de polifenoles de vino tinto durante 7-10 días) o de catequina pura a ratas, provocó un aumento de la vasodilatación a acetilcolina dependiente de NOS, un incremento en la producción de NO, y la disminución en la producción de  $O_2^-$  en anillos aórticos aislados de estos animales, además de una significativa disminución de la presión sanguínea (Diebolt et al., 2001; Benito et al., 2002; Jiménez et al., 2007; López-Sepúlveda et al., 2008)). Estos resultados han sido corroborados por los resultados de Ramírez-Sánchez et al. (2010) que demuestran que concentraciones nano-micromolares de epicatequina estimulan de manera aguda la actividad de la eNOS en las células endoteliales coronarias y han propuesto un posible lugar de unión membranal.

Schnorr et al. publicaron en 2008 que la epicatequina inhibe la expresión de arginasa-II en cultivos de células endoteliales. El efecto de los flavonoles sobre la arginasa también ha sido descrito *in vivo*, proporcionando evidencias de que una intervención nutricional con alimentos ricos en flavanoles puede dar lugar a una inhibición de la actividad arginasa en los glóbulos rojos y en riñón de rata *ex vivo* (Schnorr et al, 2008). Estos datos sugieren que los flavanoles tienen el potencial para aumentar la actividad de la NOS aumentando la disponibilidad del sustrato L-arginina. En particular, metabolitos metilados de diferentes flavonoides provocaron una mejora en la bioactividad del NO disminuyendo su degradación a través de  $O_2^-$ . En un modelo de cultivo celular, Steffen et al. (2008) observaron que la 3'-O-metil-epicatequina se comportaba como un metabolito bioactivo de la epicatequina capaz de inhibir a la

NADPH oxidasa, reduciendo, por tanto, los niveles de  $O_2^-$ . Estos autores concluyeron que era necesaria la metilación de la epicatequina en las células endoteliales para inhibir la acción estimulante de la angiotensina II sobre la NADPH oxidasa. Sin embargo, este mecanismo aún no se ha demostrado *in vivo*.

Ensayos con intervenciones dietéticas en los que se administraba epicatequina pura han demostrado un aumento en el plasma de formas de almacenamiento de NO, nitritos y RXNO [especies de NO S- y N-nitros(il)adas (RX indica que el NO está unido a diferentes residuos “R” a través de diferentes uniones “X”)] (Schroeter *et al.*, 2006; Balzer *et al.*, 2008; Loke *et al.*, 2008; Heiss *et al.*, 2010). En el caso del ensayo randomizado y controlado por placebo llevado a cabo por Locke *et al.* (2008) en 12 voluntarios sanos, la administración de epicatequina (200mg/300mL de agua) fue capaz de incrementar los niveles de NO.

### ***Papel del $Ca^{2+}$ intracelular***

En el estudio anterior de Zenebe *et al.*, (2002) la presencia del verapamilo abolió la relajación inducida por una mezcla de polifenoles presentes en el vino tinto, lo que nos sugiere que la entrada de  $Ca^{2+}$  en las células endoteliales es un paso crucial en la respuesta relajante inducida por este compuesto, siendo el incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) el paso crítico para la activación de la eNOS y por tanto para la producción de NO y la subsecuente vasorrelajación dependiente de endotelio (Lückhoff *et al.*, 1988). Sin embargo, no podemos excluir el hecho de que la liberación de  $Ca^{2+}$  de los depósitos intracelulares cumpla un papel en el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y por tanto en la relajación dependiente de NO que generan los compuestos polifenólicos del vino tinto. Martin *et al.*, (2002) documentaron un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  por movilización de los depósitos intracelulares tras la administración de compuestos polifenólicos de vino tinto a un cultivo de células endoteliales.

***Papel de la vía PI3K/AKT***

En células endoteliales de aorta bovina un extracto de vino tinto produjo un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  que llevó a relajaciones mediadas por NO. En arterias coronarias porcinas se vieron reducidas dichas relajaciones por inhibidores de la PI3 cinasa (wortmannin) (Ndiaye *et al.*, 2003, 2005). Estos polifenoles indujeron una fosforilación sustancial de la proteína cinasa B (AKT) y de la eNOS en la Ser1177 en células endoteliales, cosa que no sucedió en presencia de los inhibidores de la cinasa PI3 (Ndiaye *et al.*, 2003, 2005). En conjunto, estos datos demuestran que, en células endoteliales de arteria coronaria porcina, los RWPs inducen la activación de la vía PI3cinasa/AKT causando fosforilación de la eNOS y resultando en un incremento en la formación de NO. Una característica de este mecanismo alternativo para activar la eNOS es que lleva a una activación rápida y duradera del enzima (Ndiaye *et al.*, 2003, 2005).

***Los RWPs inducen relajación mediada por FHDE.***

La primera demostración de una participación del FHDE en los mecanismos de relajación vascular inducida por polifenoles tuvo lugar en arterias coronarias aisladas porcinas (Ndiaye *et al.*, 2003, 2005). Estas relajaciones eran resistentes a los inhibidores de la NOS y la ciclooxigenasa (COX), y se asociaron a hiperpolarizaciones dependientes de endotelio de CMLV, ya que eran abolidas por la combinación de dos toxinas, charibdotoxina y apamina. De hecho, estas dos toxinas abolen la hiperpolarización endotelial que normalmente se transmite a través de las CMLV, suprimiendo de este modo la relajación mediada por FHDE en CMLV (Busse *et al.*, 2002; Griffith, 2004).

***Los RWP's inducen una mayor liberación de prostaciclina de células endoteliales.***

Las procianidinas, oligómeros de 3-flavanoles, de semillas de *Vitis vinífera* provocaron una relajación concentración y endotelio-dependiente en arteria interna mamaria humana aislada, con un efecto vasorrelajante máximo a 50  $\mu$ M. Este efecto se redujo de manera significativa (casi el 50 %) incubando los anillos con indometacina, un inhibidor de la COX, indicando la implicación de algún prostanoides. Además, en estos vasos, las procianidinas estimularon, de manera concentración dependiente con un efecto máximo entre 25 y 50  $\mu$ M, la liberación de prostaciclina medida mediante la evaluación de la concentración de 6-keto-prostaglandin- $F_{1\alpha}$  en el medio del baño de órganos (Aldini *et al.*, 2003).

Parece que los flavanoles podrían, mediante la alteración de la síntesis de eicosanoides, inhibir la activación de plaquetas y los procesos inflamatorios que contribuyen a estados patológicos. Puesto que las relajaciones dependientes de endotelio producidas por las procianidinas fueron totalmente suprimidas por la inhibición de la vía NO-GMPc, se piensa que el NO podría estar involucrado en la activación de la COX (Aldini *et al.*, 2003).

***Los RWP's inducen inhibición de la síntesis endotelial de ET-1.***

Los extractos de vino tinto inhiben a bajas concentraciones la liberación de ET-1 y la transcripción de pre-pro-endotelina-1 en células endoteliales aórticas bovinas, aunque ninguno de los compuestos aislados (como quercetina o resveratrol) tuvo esa capacidad a esas concentraciones (Corder *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2002). Este efecto parece deberse a modificaciones en las señalizaciones por tirosina cinasa (Khan *et al.*, 2002). La administración intragástrica de resveratrol (3 mg/kg/día), vino tinto (4 mL/kg/día) o incluso vino tinto desalcoholizado (4 mL/kg/día) durante 12 semanas a conejos hipercolesterolémicos mejoró la función endotelial y redujo los niveles de endotelina-1 (Zou *et al.*, 2003).

El resveratrol disminuye fuertemente la secreción de ET-1 por fuerzas de cizallamiento, es capaz de disminuir sus niveles de mRNA y la actividad del promotor de ET-1 en HUVEC, en parte, interfiriendo con la vía de la ERK 1/2 mediante la disminución de la formación de ROS (Liu *et al.*, 2003). Se ha visto que resveratrol y quercetina, a concentraciones de 0,1-50  $\mu$ M, son capaces de inhibir la liberación de ET-1 en cultivos de células endoteliales umbilicales humanas (Zhao *et al.*, 1999).

El tratamiento crónico de las ratas DOCA-sal con RWP redujo los niveles de ET-1 a valores similares a los encontrados en el grupo control (Jiménez *et al.*, 2007). Broncel *et al.* (2010) han demostrado recientemente que la administración crónica de antocianidinas disminuye los niveles plasmáticos de ET-1 en pacientes con síndrome metabólico.

Ensayos *in vitro* con epicatequina no inhibieron la síntesis de ET-1, mientras que la administración oral de dicho flavanol sí que disminuyó los niveles de ET-1 en sujetos sanos (Khan *et al.*, 2002; Loke *et al.*, 2008). En el estudio de Loke *et al.* (2008), el tratamiento con 200 mg de quercetina originó una reducción significativa en la producción sistémica de ET-1, mientras que la administración de 200 mg de epicatequina provocó una disminución significativa en plasma pero no en orina. En estudios previos, la quercetina había mostrado una disminución en la producción de ET-1 en HUVEC estimuladas con trombina de manera dosis dependiente con una  $IC_{50}$  de 1,54 mol/L (Zhao *et al.*, 1999).

#### ***Efectos de los RWPs sobre la producción de tromboxano $A_2$ ( $TXA_2$ ).***

La ACh puede generar contracciones dependientes de endotelio en aorta de rata; éstas se asocian a un incremento en los factores contractores derivados de endotelio (FCDE). Los FCDE son metabolitos del ácido araquidónico generados a través de la vía de la COX, como el  $TXA_2$ , que activa los receptores TP en CMLV (Vanhoutte *et al.*, 2005) y provoca vasoconstricción. Descubrimientos recientes demuestran que los RWPs son capaces de prevenir la disfunción endotelial en modelos de hipertensión

inducida por Ang II, sobre todo por prevenir la expresión vascular de COX-1 y COX-2 y de este modo disminuir la consecuente formación de TXA<sub>2</sub> (Kane *et al.*, 2009).

***Efectos de los RWP sobre el receptor estrogénico (ER, Estrogenic Receptor)  $\alpha$  en el endotelio.***

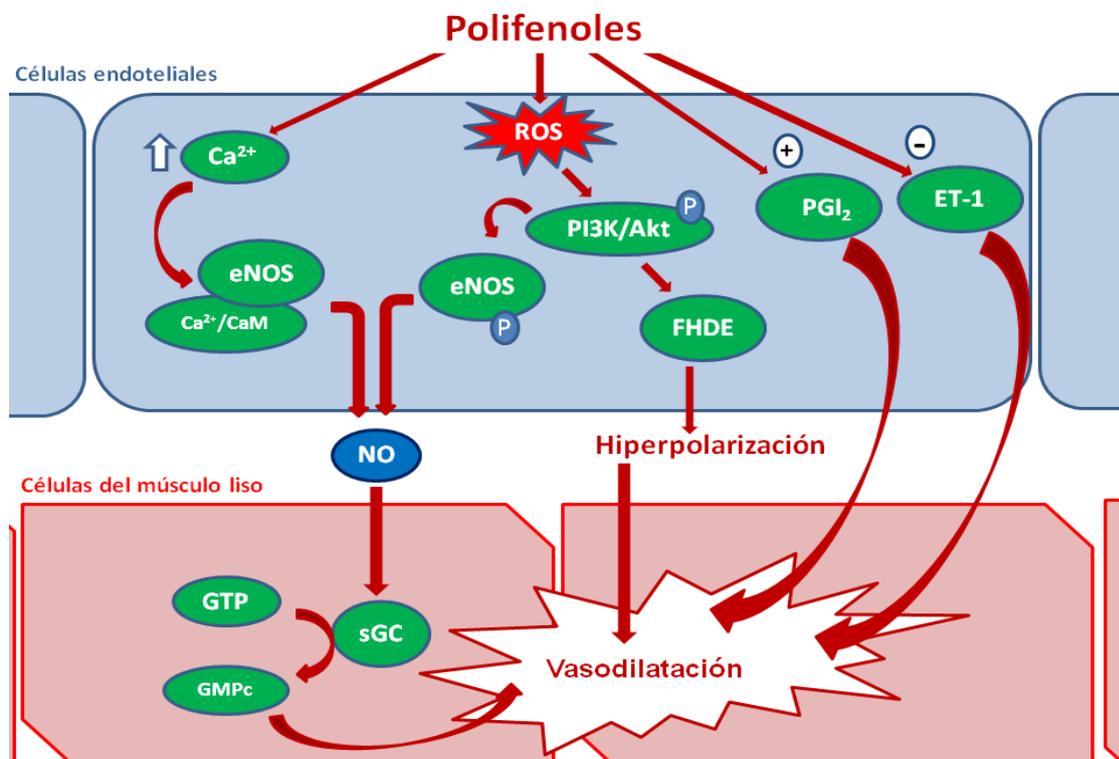
El vino tinto no contiene genisteína (polifenol reconocido por su efecto sobre el receptor estrogénico), pero muy recientemente, en un trabajo de Chalopin *et al.*, 2010, se ha demostrado la hipótesis de que el ER $\alpha$  es una de las dianas involucradas en los efectos vasculares de una mezcla de RWPs. Es sabido que los polifenoles del vino inducen relajación dependiente de endotelio en aorta de ratón. Este efecto se observa claramente en aortas de ratones de cepa salvaje para ER $\alpha$ ; sin embargo, este grupo observó que la relajación desaparecía por completo en ratones deficientes de ER $\alpha$ . Lo mismo sucede con la producción de NO en células endoteliales de aorta de ratón; los RWPs inducen producción de NO, pero este efecto desaparece por completo en células extraídas de ratones knockout para ER $\alpha$  y en células de ratones de cepas salvajes en presencia de Fulvestrant (antagonista de ER $\alpha$ ), con lo que podemos deducir que los mecanismos moleculares por los que los RWPs inducen incremento del NO y vasodilatación están asociados a ER $\alpha$ . En este trabajo vieron que los RWPs incrementan la fosforilación de Src, ERK 1/2 y eNOS Ser 1177, así como de caveolina-1 en células endoteliales humanas, pero cuando los ER $\alpha$  están bloqueados o silenciados, la activación de esta vía está claramente disminuida, lo que sugiere un mecanismo dependiente de ER $\alpha$  en la capacidad de los RWPs para estimular la producción endotelial de NO.

#### **4.4.7. Efectos antihipertensivos.**

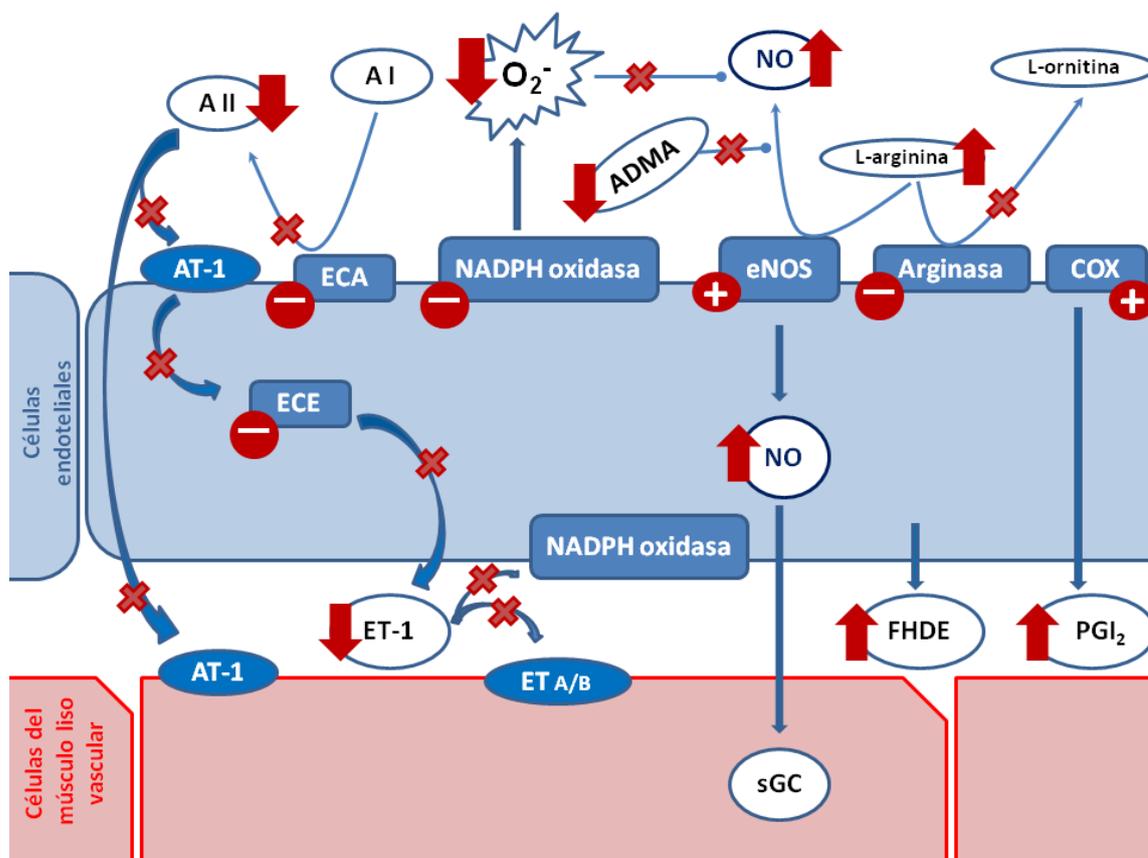
Se sabe que la administración oral de un extracto de piel de uva (*Vitis labrusca*) reduce significativamente la presión sistólica, media y diastólica en el modelo DOCA-sal (Soares De Moura *et al.*, 2002). En estudios previos de nuestro grupo comprobamos que la quercetina era capaz de prevenir el incremento en la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR, *spontaneously hypertensive rats*) (Sánchez *et al.*, 2006). Pecháňová *et al.* (2004) aportaron evidencias de que la administración oral de RWPs prevenía el incremento en la presión sanguínea así como los cambios estructurales y funcionales en ventrículo izquierdo y aorta de ratas sujetas a inhibición crónica de la síntesis de NO. Además, en el último estudio mencionado, estos polifenoles fueron capaces de prevenir el engrosamiento de la aorta, atenuaron el incremento de la reactividad aórtica a noradrenalina y previnieron la disminución en la relajación a ACh dependiente de endotelio. La administración oral de RWPs produce incluso una disminución de la presión sanguínea en ratas normotensas, y este efecto hemodinámico se asoció con un aumento en la relajación dependiente de endotelio y aumentó la expresión de los genes de NOS inducible y de COX 2 en la pared arterial (Diebolt *et al.* 2001). Nuestro grupo ha descrito, además, cómo el tratamiento crónico con RWPs es capaz de reducir la presión arterial incrementada tanto en ratas DOCA-sal (Jiménez *et al.*, 2007) como en SHR y SHR ovariectomizadas (López-Sepúlveda *et al.*, 2008).

Aparte de los efectos de los flavanoles asociados a la vasodilatación arterial, varios estudios han demostrado que pueden ejercer efectos sobre la presión arterial. Los estudios realizados por Taubert *et al.* (2007a; 2007b), Grassi *et al.* (2005; 2008), y Desch *et al.* (2010) sugieren que en sujetos sanos, en pacientes con hipertensión esencial no tratada y en pre-hipertensión, la presión sanguínea puede ser reducida tras el consumo de chocolate negro en comparación con chocolate blanco. En el estudio de Taubert *et al.* (2007), participantes con hipertensión leve no tratada recibieron 6,3 g de chocolate negro por día durante 18 semanas, y se observó una caída significativa en la

presión sistólica y en la presión arterial diastólica. Si bien estos resultados son interesantes, una de las limitaciones que se le puede achacar al trabajo es que el chocolate blanco se usó como un producto de control de alimentos, lo que impide que el estudio fuera ciego. Por otra parte, las diferentes composiciones del chocolate blanco y del negro hacen que sea difícil identificar los componentes específicos bioactivos, como los flavanoles, en la disminución de la presión arterial. Por ello, no tenemos suficientes datos concluyentes para afirmar a ciencia cierta la teoría de que los flavanoles poseen propiedades antihipertensivas en humanos.



**Figura 9. Efectos agudos dependientes de endotelio de los polifenoles.** Los polifenoles inducen relajaciones dependientes de endotelio inducidas por óxido nítrico (NO) en arterias aisladas. La activación de la NO sintasa endotelial (eNOS) se debe principalmente a: (a) un incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  y (b) una fosforilación de la eNOS mediante la vía PI3-cinasa/AKT. Además, los polifenoles causan relajaciones dependientes de endotelio de arterias aisladas mediadas por el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (FHDE) de manera consecutiva a una formación controlada y localizada de aniones superóxido ( $O_2^-$ ) que llevan a la activación de la vía PI3-cinasa/AKT. Los polifenoles también incrementan la liberación de prostaciclina endotelial ( $PGI_2$ ) e inhiben la síntesis y los efectos de la endotelina (ET)-1. Todos estos mecanismos contribuyen a explicar los efectos vasodilatadores, vasoprotectores y antihipertensivos de los polifenoles in vivo. El tratamiento a largo plazo de células endoteliales con polifenoles puede incrementar la expresión de eNOS.  $Ca^{2+}/CaM$ : complejo  $Ca^{2+}$ /calmodulina; sGC: guanilato ciclasa soluble. Figura modificada de Stoclet et al., 2004.



**Figura 10.** Esquema de los potenciales lugares de acción de la epicatequina para ejercer los efectos vasculares descritos. A I, angiotensina I; A II, angiotensina II; ADMA, dimetilarginina asimétrica; AT-1, receptor de angiotensina; COX, ciclooxigenasa; ECA, enzima convertidora de angiotensina; ECE, enzima convertidora de endotelina; eNOS, óxido nítrico sintetasa endotelial; ET-1, endotelina-1;  $ET_{A/B}$ , receptor de endotelina A/B; FHDE, factor hiperpolarizante derivado de endotelio; NO, óxido nítrico;  $O_2^-$ , anión superóxido;  $PGI_2$ , prostaciclina; sGC, guanilato ciclasa soluble.

⊕ : activación. ⊖ : inhibición. ↑ : incremento de niveles. ↓ : disminución de niveles.  
 ✕ : interrupción de la vía.

**Tabla 2: Ensayos clínicos de intervención con flavanoles sobre la función vascular.**  
 Tabla traducida, modificada y completada del artículo de Heiss et al., 2010.

Autor	Año	Grupo estudiado	Período de estudio	Diseño del estudio	Forma de administración y dosificación	Dosis (total) de flavanoles	Efectos vasculares
Agewall et al.	2000	Voluntarios sanos (n = 12)	1 h	Cruzado	Vino tinto vs vino tinto desalcoholizado (250 mL)	1950 vs 1110 mg total de polifenoles	↑ FMD (en el vino tinto desalcoholizado)
Alexopoulos et al.	2008	Voluntarios sanos (n = 14; 50% fumadores)	2 h	Cruzado	Té verde (6g) vs cafeína vs agua	ND	↑ FMD (sólo en té verde)
Balzer et al.	2008	Diabéticos (n = 10; 100% EAC) Diabéticos (n = 41; 71-80% EAC)	6 h 30 días	Cruzado Grupos paralelos	Cacao de alta concentración en flavanoles vs cacao de baja concentración (polvo en agua)	963, 371, 75 mg 963 vs 75 mg/día	↑ FMD, GTN nv, PS nv ↑ FMD, GTN nv, PS nv
Berry et al.	2010	Voluntarios sanos obesos (n = 21)	2 h	Cruzado	Cacao de alta concentración en flavanoles vs cacao de baja concentración (polvo en agua)	701 vs 22 mg	+ FMD, ↓ PS
Davison et al.	2010	Hipertensión leve sin tratar (n = 52)	42 días	Grupos paralelos	Bebida de cacao de alta concentración en flavanoles	33, 372, 712, 1052 mg/día	↓ PS (no dosis dependiente)
Duffy et al.	2001	EAC (n = 66)	28 días	Cruzado	Té negro vs agua (900 mL/día)	118 vs 0 mg/día	↑ FMD, GTN nv, ARO nv, FRAP nv, 8-isoprostano nv
Engler et al.	2004	Voluntarios sanos (n = 21)	14 días	Grupos paralelos	Chocolate negro de alta concentración en flavanoles vs chocolate negro de baja concentración (46 g/día)	213 vs 0 mg	↑ FMD, LDL nv, ARO nv, 8-isoprostano nv
Farouque et al.	2006	EAC (n = 40)	42 días	Grupos paralelos	Chocolate de alta concentración en flavanoles (48g) bebida de cacao vs productos de baja concentración (46 g/día)	440 vs 20 mg	FMD nv, GTN nv, DMF nv, PS nv
Fisher et al.	2003	Voluntarios sanos (n = 27)	4 días	1 grupo de estudio	Cacao de alta concentración en flavanoles vs cacao de baja concentración (4 x 230 mL/día)	821 mg/día	↑ PAT, PS nv

Continuación (I) tabla 2.

Autor	Año	Grupo estudiado	Periodo de estudio	Diseño del estudio	Forma de administración y dosificación	Dosis (total) de flavanoles	Efectos vasculares
Flammer <i>et al.</i>	2007	Beneficiarios transplantados de corazón (n = 22)	2 h	Grupos paralelos	Chocolate negro vs chocolate sin flavanoides (40 g)	47 mg (epicatequina + catequina) vs 0 mg	↑ diámetro AC, ↑ vasodilatación AC, ↓ adhesión plaquetaria, ↓ 8-isoprostano, TRAP nv
Grassi <i>et al.</i>	2005	Hipertensión esencial sin tratar (n = 20)	15 días	Cruzado	Chocolate negro (100 g/día) vs chocolate blanco (90 g/día)	88 mg (epicatequina + catequina) vs 0 mg	↑ FMD, ↓ PS, ↓ HOMA-IR, ↑ QUICKI, ↑ ISI, ↓ LDL
Grassi <i>et al.</i>	2008	Hipertensión con intolerancia a la glucosa (n = 19)	15 días	Cruzado	Chocolate negro (100 g/día) vs chocolate blanco (90 g/día)	88 mg (epicatequina + catequina) vs 0 mg	↑ FMD, ↓ PS, ↓ HOMA-IR, ↑ QUICKI, ↑ ISI, ↓ LDL, ↑ CIR
Grassi <i>et al.</i>	2009	Varones sanos (n = 19)	7 días	Cruzado	Té negro (3 veces/día, 5 dosis)	0, 100, 200, 400 y 800 mg flavanoides/día	↑ FMD dosis dependiente ↓ PS no dosis dependiente
Hampton <i>et al.</i>	2010	Voluntarios sanos (n = 10)	1 h	Cruzado	Zumo de uva tinta vs Zumo de uva tinta + vodka vs agua, postprandial	ND	↑ FMD, Glucosa nv, Triglicéridos nv
Heiss <i>et al.</i>	2003	EAC o FRC (n = 6)	6 h	Cruzado	Cacao de alta concentración en flavanoles vs cacao de baja concentración (100 mL)	176 vs < 10 mg	↑ FMD
Heiss <i>et al.</i>	2003	EAC o FRC (n = 20)	2 h	Cruzado	Cacao de alta concentración en flavanoles vs cacao de baja concentración (100 mL)	176 vs < 10 mg	↑ FMD, GTN nv, ↑ RXNO, Nitritos nv, Nitratos nv, PA nv
Heiss <i>et al.</i>	2005	Fumadores sanos (n = 4)	2 h	Cruzado	Cacao de alta concentración en flavanoles (50, 100, 200 mL) vs agua (100 mL)	88, 176, 352 mg vs 0 mg	↑ FMD, GTN nv, ↑ RXNO,
Heiss <i>et al.</i>	2005	Fumadores sanos (n = 11)	2 h	Cruzado	Cacao de alta concentración en flavanoles vs cacao de baja concentración (100 mL)	176 vs < 10 mg	↑ FMD, GTN nv, ↑ RXNO

Continuación (II) tabla 2.

Autor	Año	Grupo estudiado	Período de estudio	Diseño del estudio	Forma de administración y dosificación	Dosis (total) de flavanoles	Efectos vasculares
Heiss <i>et al.</i>	2007	Fumadores sanos (n = 6)	6 h	Cruzado	Cacao de alta concentración en flavanoles vs cacao de baja concentración (polvo en 300 mL de agua)	36-987 mg dosis-respuesta	↑ FMD, ↑RXNO, ↑Nitritos, MDA nv, Ascorbato nv, Urato nv, TEAC nv.
		Fumadores sanos (n = 6)	7 días	1 grupo de estudio	Cacao de alta concentración en flavanoles vs cacao de baja concentración (polvo en agua 3 veces al día)	918 mg/día	↑ FMD, ↑RXNO, ↑Nitritos
Heiss <i>et al.</i>	2010	EAC o FRC (n = 6)	28 días	Cruzado	Cacao de alta concentración en flavanoles vs cacao de baja concentración (polvo en agua 3 veces al día)	750 vs 18 mg/día	↑ FMD, ↑CPE, ↑RXNO, Nitritos nv, Nitratos nv, PS nv
Hermann <i>et al.</i>	2006	Fumadores sanos (n = 4)	24 h	1 grupo de estudio	Chocolate negro (40 g)	ND	↑ FMD
		Fumadores sanos (n = 11)	2 h	Grupos paralelos	Chocolate negro vs chocolate blanco(40g)	ND	↑ FMD, ↑TEAC ↓ agregación plaquetaria
Hodgson <i>et al.</i>	2002	Colesterol leve en plasma o triglicéridos elevados (n = 21)	28 días	Grupos paralelos	Té verde vs agua (5 x 250 mL)	ND	↑ FMD, ↑GTN, PA nv, excreción de F2-Isoprostano nv.
Huang <i>et al.</i>	2010	Voluntarios sanos (n = 80)	21 días	Grupos paralelos	Vino tinto (100mL /día), cerveza (250mL /día), vodka (80mL /día), agua (100mL / día)	ND	↑ FMD, ↑ CPE
Jochmann <i>et al.</i>	2008	Mujeres postmenopáusicas sanas (n = 21)	2 h	Cruzado	Té negro vs té verde vs agua	1012 mg (negro) 560 mg (verde) 0mg (agua)	↑ FMD (té negro y verde por igual), GTN nv
Kim <i>et al.</i>	2006	Fumadores sanos (n = 20)	14 días	1 grupo de estudio	Té verde (8 g/día)	744 mg	↑ FMD, ↑ CPE
Locke <i>et al.</i>	2008	Voluntarios sanos (n = 6)	6 h	Cruzado	(-)-epicatequina (3mL agua/kg)	0,1, 2 mg/kg	↑ FMD, ↑ PAT
		Voluntarios sanos (n = 12)	2 h	Cruzado	(-)-epicatequina vs quercetina vs EGCG vs agua	200 mg vs 0 mg	↑ RXNO, ↑Nitritos, ↓ ET-1 (sólo EC y O), excreción de F2-Isoprostano nv.

Continuación (III) tabla 2.

Autor	Año	Grupo estudiado	Período de estudio	Diseño del estudio	Forma de administración y dosificación	Dosis (total) de flavanoles	Efectos vasculares
Park <i>et al.</i>	2009	Pacientes con daño renal crónico, diálisis (n = 40)	28 días	Grupos paralelos	Té verde (5g/día) vs agua	465 mg vs 0 mg	↑ FMD, CPE nv, HOMA-IR nv, QUICKI nv, fibrinógeno nv
Schroeter <i>et al.</i>	2006	Voluntarios sanos (n = 20) Voluntarios sanos (n = 20)	4 h 6 h	Cruzado	Cacao de alta concentración en flavanoles vs cacao de baja concentración (polvo en 300 mL de agua) (-)-epicatequina (3 mL agua/kg)	917 mg vs 35 mg 0,1, 2 mg/kg	↑ FMD, ↑PAT, GTN nv, ↑RXNO ↑ FMD, ↑PAT
Stein <i>et al.</i>	1999	EAC (n = 15)	14 días	1 grupo de estudio	Zumo de uva tinta (7,8 mL/kg/día)	ND	↑ FMD, ↑GTN, ↓ oxidación LDL
Taubert <i>et al.</i>	2003	Hipertensión leve sin tratar (n = 13)	14 días	Cruzado	Chocolate negro (100 g/día) vs chocolate blanco (90 g/día)	500 mg vs 0 mg de polifenoles	↓ PS
Taubert <i>et al.</i>	2007	Hipertensión leve sin tratar (n = 44)	126 días	Grupos paralelos	Chocolate negro vs chocolate blanco (6,3 g/día)	30 mg vs 0 mg de polifenoles	↓ PS, 8-isoprostano nv
Vlachopoulos <i>et al.</i>	2005	Voluntarios sanos (n = 17)	3 h	Cruzado	Chocolate negro (100g) vs agua	2620 mg	↑ FMD, PS nv, ↑RC, MDA nv, TEAC nv
Wang-Polagruto <i>et al.</i>	2006	Mujeres postmenopáusicas con hipercolesterolemia (n = 32)	42 días	Grupos paralelos	Cacao de alta concentración en flavanoles vs cacao de baja concentración	446 mg/día vs 43 mg/día	↑ FMD
Westphal y Luley	2011	Sujetos sanos (n = 18)	2, 3, 4 y 6 h	Cruzado	Chocolate de alta concentración en flavanoles vs chocolate de baja conc. (ambos, + comida rica en grasas)	918 mg vs 0 mg de flavanoles	↑ FMD, triglicéridos nv, ácidos grasos libres nv
Widlansky <i>et al.</i>	2007	EAC (n = 44)	14 días	Cruzado	ECCG vs cápsulas de placebo	300 mg vs 0 mg al día	↑ FMD agudo FMD crónico nv

AC: arteria coronaria; ARO, absorbanza de radicales de oxígeno; CPE, células progenitoras endoteliales; EC, epicatequina; ET-1, Endotelina-1; FMD, (Flow-mediated dilation) Dilatación mediada por flujo; FRAP, (ferric-reducing ability of plasma) capacidad del plasma de reducir hierro; GTN, dilatación mediada por Trinitrato de Glicerol; HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance) resistencia a la insulina-HOMA; ISI, índice de sensibilidad a la insulina; LDL, lipoproteínas de baja densidad; MDA, Malonaldehído; ND, no determinado; nv, no varía; PAT, (peripheral artery tonometry) tonometría arterial periférica; PS, Presión sanguínea; Q, quercetina; QUICKI, (quantitative insulin sensitivity check index) índice de sensibilidad cuantitativa a la insulina; RC, ratio del corazón; RXNO, aductos NO-nitroso en plasma; TEAC, (Trolox equivalent antioxidant capacity) capacidad antioxidante equivalente a Trolox; ↑, incremento; ↓, disminución.



**Justificación y objetivos.**

---



El consumo de dietas ricas en frutas y verduras ha demostrado, tanto en estudios epidemiológicos como de intervención, que presenta efectos beneficiosos sobre la morbilidad y mortalidad cardiovascular (Lorgeril *et al.*, 1999; Broekmans *et al.*, 2001). El efecto beneficioso de estas dietas se ha atribuido, al menos en parte, a la presencia de polifenoles. El vino tinto es rico en estos compuestos polifenólicos (flavonoides, antocianos, estilbenos y ácidos hidroxicinámicos), principales candidatos para explicar su efecto cardioprotector. Se ha sugerido que los compuestos polifenólicos presentes en el vino podrían ser los responsables de la paradoja francesa, es decir, de la menor tasa de mortalidad por cardiopatía isquémica que se observa en Francia, a pesar de su elevado consumo de grasas saturadas (St Leger *et al.*, 1979; Truelsen *et al.*, 1998).

Varios estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo habitual y moderado de vino, concretamente de vino tinto, presenta efectos beneficiosos sobre la morbilidad y mortalidad cardiovascular (Frankel *et al.*, 1993; Maxwell *et al.*, 1994; Aviram *et al.*, 2002).

Estudios *in vivo* han descrito que los componentes polifenólicos del vino tinto disminuyen la presión arterial en ratas normotensas, lo que se acompaña con un aumento de la relajación dependiente de endotelio e inducción de la expresión de ciertos genes en la pared arterial (Diebolt *et al.*, 2001). Además, el tratamiento oral con estos compuestos polifenólicos acelera la regresión de la hipertensión arterial y previene el desarrollo de remodelado cardiovascular y fibrosis miocárdica en la hipertensión producida por la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico (NO) con L-NAME (Bernátová *et al.*, 2002; Pechánová *et al.*, 2004). Se ha observado, además, cómo extractos de piel de uva y los polifenoles del vino tinto contenidos en ellos reducen la presión arterial en otros modelos de experimentación animal como en la hipertensión DOCA-sal (Soares de Moura *et al.*, 2002) y se han descrito sus propiedades antihipertensivas y protectoras de la función vascular en modelos de hipertensión caracterizados por niveles normales/altos de renina plasmática, tales como la hipertensión genética SHR (Shimizu *et al.*, 2009) y la hipertensión inducida por infusión

de angiotensina II (Sarr *et al.*, 2006). Los resultados publicados por López-Sepúlveda *et al.* en 2008 sugieren que el tratamiento crónico con una mezcla de polifenoles del vino tinto reduce la hipertensión y la disfunción vascular a través de la reducción del estrés oxidativo vascular de una manera independiente a la función ovárica en ratas ovariectomizadas genéticamente hipertensas. De modo similar, en ratas Zucker los RWPs reducen la producción vascular de  $O_2^-$  (Agouni *et al.*, 2009). El tratamiento crónico con dicha mezcla de polifenoles del vino tinto atenuó el desarrollo de hipertensión, de disfunción endotelial y de estrés oxidativo vascular en ratas DOCA-sal (Jiménez *et al.*, 2007), un modelo de hipertensión asociado a niveles plasmáticos de renina y angiotensina II disminuidos e incremento de ET-1. Estos efectos inducidos por los polifenoles del vino están relacionados con la inhibición de la actividad NADPH oxidasa y/o con la reducción de los niveles plasmáticos de ET-1.

La ET-1 es un péptido vasoconstrictor muy potente derivado de endotelio que juega un papel crucial en la fisiología cardiovascular y cuyas alteraciones se asocian con la mayoría de las formas de enfermedad cardiovascular. Los modelos experimentales de hipertensión como el modelo DOCA-sal o el modelo por infusión de angiotensina II, la aterosclerosis y la diabetes muestran altos niveles de ET-1 circulante y están asociados a disfunción endotelial (Bousette y Giaid, 2003; Cernacek *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2003; Schiffrin 2005). La disfunción endotelial, definida como un desequilibrio en los factores vasoactivos que lleva a la vasoconstricción y a cambios estructurales en la pared vascular, es un evento previo en la fisiopatología de la aterosclerosis y la hipertensión, y es un marcador temprano e independiente de mal pronóstico (Schachinger *et al.*, 2000). Los datos obtenidos hasta la fecha indican que la ET-1, a través de la activación de receptores  $ET_A/ET_B$ , incrementa la producción de ROS en la vasculatura (por ejemplo el anión  $O_2^-$ ) dando como resultando disfunción endotelial (Wedgwood *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003a; Loomis *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2009; 2010).

La mayor fuente de ROS intracelulares en las células vasculares es la NADPH oxidasa, un complejo multienzimático que comprende dos subunidades ancladas a la

membrana, Nox (Nox-1, Nox-2 o gp91<sup>phox</sup>, Nox-4 o Nox-5) y p22<sup>phox</sup>, que son reguladas por subunidades citoplasmáticas como la p47<sup>phox</sup>, la p67<sup>phox</sup> y una proteína G de bajo peso molecular (rac 1 o rac 2) (Lyle y Griendling, 2006). La ET-1 incrementa la producción vascular de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a través de la activación de la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa y la mitocondria. Esta vía se ve ampliada porque el O<sub>2</sub><sup>-</sup> induce el desacoplamiento de la eNOS favoreciendo una mayor producción de ROS que a su vez conduce a la disfunción endotelial (Loomis *et al.*, 2005; Munzel *et al.*, 2005, Romero *et al.*, 2009). Además, recientemente hemos visto en este laboratorio que la ET-1 induce generación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a través de la NADPH oxidasa por el incremento en la expresión proteica de p47<sup>phox</sup> (Romero *et al.*, 2009). La vía de señalización para este efecto implica la activación secuencial de PKC, c-Src y ERK1/2 (Romero *et al.*, 2010).

Ya hemos enunciado cómo la administración crónica de RWP reduce la presión arterial y mejora la disfunción endotelial en ratas DOCA-sal, un modelo de hipertensión con bajos niveles de renina en el que la ET-1 juega un papel predominante (Soares de Moura *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2007) y cómo en ratas Zucker los RWP reducen la liberación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por medio de la disminución en la expresión de la subunidad de membrana de la NADPH oxidasa Nox-1 (Agouni *et al.*, 2009). Sin embargo, se desconoce si estos efectos protectores de los RWP son resultado de una disminución en la síntesis de ET-1 y/o de una interferencia con las vías de señalización de la ET-1 que llevan al estrés oxidativo en la pared vascular. También es desconocido qué polifenoles de la mezcla son los responsables de estas acciones inhibitorias.

Por todo ello, ***el primer objetivo de esta Tesis Doctoral es analizar los mecanismos implicados en los efectos protectores de una mezcla de RWP en la disfunción endotelial y el estrés oxidativo vascular inducidos por ET-1 en anillos aórticos aislados de rata. Además, estudiaremos los efectos de tres de los principales polifenoles monoméricos aislados contenidos en la mezcla (catequina, epicatequina y resveratrol) sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1 en anillos aórticos aislados.***

Dentro de los polifenoles, los flavonoides comprenden un amplio grupo de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal, estando presentes en frutas y verduras, formando parte de nuestra dieta habitual (Middleton *et al.*, 2000). Los flavanoles, como epicatequina y catequina, y sus oligómeros, las procianidinas, representan una clase importante de flavonoides. Su presencia es común en la mayoría de las plantas superiores y podemos encontrar un alto contenido en ciertos alimentos como la *Vitis vinifera* (uva), *Camellia sinensis* (té) y *Theobroma cacao* (cacao). Varios estudios epidemiológicos y de intervención dietética en humanos utilizando flavonoides presentes en los alimentos indican una relación inversa entre la ingesta de estos polifenoles y el riesgo de enfermedad cardiovascular (Buijsse *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2006; Nagao *et al.*, 2007). Una gran variedad de acciones biológicas de la dieta rica en flavonoides apoyan estos posibles efectos protectores cardiovasculares, incluyendo la mejora de la vasodilatación dependiente de endotelio (Stein *et al.*, 1999; Heiss *et al.*, 2003; Fisher *et al.*, 2003; Hirata *et al.*, 2004; Janszky *et al.*, 2005; Schroeter *et al.*, 2006), la reducción de la presión arterial (Stensvold *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2004; Hodgson *et al.*, 2003; Taubert *et al.*, 2003; 2007; Matsuyama *et al.*, 2008), resistencia a la insulina y tolerancia a la glucosa (Grassi *et al.*, 2005), la atenuación de la reactividad de las plaquetas (Holt *et al.*, 2002) y la mejora de la respuesta inmune y el sistema de defensa antioxidante (Sies *et al.*, 2005; Keen *et al.*, 2005). Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares de los flavanoles implicados en dichas actividades biológicas, tanto en humanos como en animales. Las razones de estas deficiencias son, al menos en parte, debidas a que los alimentos contienen una multitud de componentes fitoquímicos de los cuales se desconoce cuáles pueden ejercer efectos fisiológicos. Los efectos beneficiosos obtenidos en humanos en el tratamiento con cacao enriquecido con flavanoles (Fisher *et al.*, 2003) también se obtuvieron cuando lo que se administró por ingesta oral fue epicatequina pura aislada del cacao, y el máximo efecto sobre la función endotelial coincidió con el pico de los niveles plasmáticos de los metabolitos de epicatequina (Schroeter *et al.*, 2006). De esta manera, la epicatequina

parece ser uno de los componentes biológicamente activos más importantes del cacao y de otros alimentos y bebidas ricos en flavanoles.

En la hipertensión DOCA-sal se ha encontrado un exceso en la producción vascular de  $O_2^-$  (Somers *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001; Beswick *et al.*, 2001). Este modelo se caracteriza por una baja actividad renina plasmática debido a la retención de sodio (Gavras *et al.*, 1975). Se ha visto que la ET-1 contribuye a la patogénesis de la hipertensión sensible a la sal en animales y humanos (Schiffrin *et al.*, 2001), secundaria a un estado de bajos niveles de renina (Letizia *et al.*, 1997; Elijovich *et al.*, 2001). La ET-1 es uno de los vasoconstrictores más potentes producidos en la pared de los vasos sanguíneos (Lariviere *et al.*, 1993) y, además, aumenta la producción vascular de  $O_2^-$ , al menos en parte, debido a la actividad NADPH oxidasa (Li *et al.*, 2003), lo que lleva a disfunción endotelial e hipertensión. Un extracto de vino tinto (Corder *et al.*, 2001) y los componentes polifenólicos del mismo (Khan *et al.*, 2002) disminuyeron la síntesis de ET-1 en cultivos de células endoteliales de aorta bovina, mediante la supresión de la transcripción del gen de ET-1. Y como ya hemos dicho, nuestro grupo demostró que el tratamiento crónico con RWPs atenuó el desarrollo de hipertensión, de disfunción endotelial y de estrés oxidativo vascular en ratas DOCA-sal (Jiménez *et al.*, 2007). Todo ello justifica el ***segundo objetivo de esta Tesis Doctoral: estudiar los efectos sobre la presión arterial, la función endotelial y la producción de ET-1 del tratamiento crónico con epicatequina (principal componente de la mezcla de polifenoles del vino tinto) en ratas con hipertensión inducida por la administración de mineralocorticoides y sal.***

La epicatequina, además, controla el tono vascular provocando vasodilatación dependiente de endotelio inducido por NO en las arterias de resistencia (Huang *et al.*, 1998; 1999; Chen *et al.*, 2002) y mejora la disfunción endotelial característica de condiciones patológicas tales como la diabetes y la hipertensión (Ihm *et al.*, 2009). Un modulador clave de la actividad de las células endoteliales es el NO, que en condiciones

fisiológicas se produce principalmente por la isoforma eNOS. El NO regula el tono vascular, la proliferación de células musculares lisas vasculares y la hemostasia, entre otras funciones importantes. La interrupción en la producción fisiológica de NO provoca disfunción de las células endoteliales, lo que se traduce en un aumento en la susceptibilidad a las enfermedades cardiovasculares (Napoli e Ignarro, 2009). La epicatequina *in vitro* indujo la activación de la eNOS a través de dos mecanismos: i) fosforilación de la eNOS por participación de la vía de la PI3K, y ii) activación mediada por el  $\text{Ca}^{2+}$  / calmodulina dependiente de cinasa II (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2010). Por otra parte, la epicatequina incrementa el NO en las células endoteliales a través de la inhibición de  $\text{O}_2^-$  que genera el sistema NADPH oxidasa, principal fuente de este radical (Steffen *et al.*, 2007.). Además, se ha descrito que en células endoteliales la epicatequina ejerce una serie de medidas protectoras, entre las que se incluyen la protección contra la citotoxicidad, las alteraciones en proteínas y DNA relacionadas con el estrés oxidativo, la rotura proteasomal de la eNOS (revisado en Steffen *et al.*, 2008). En varias enfermedades vasculares a menudo se observan alteraciones endoteliales con reducción de la actividad de la NOS que dan lugar a cambios estructurales y funcionales del sistema cardiovascular. En el modelo de la inhibición crónica de la síntesis de NO por la administración de L-NAME, el desarrollo de la hipertensión arterial se produce y se asocia con hipertrofia ventricular izquierda, remodelación cardíaca y vascular (Babal *et al.*, 1997) y un fenotipo vascular pro-oxidante y pro-inflamatorio (Luvarà *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta la relevancia de los efectos terapéuticos *in vitro* de la epicatequina en la generación de NO en el sistema cardiovascular, sugerimos que el tratamiento crónico con epicatequina puede prevenir el desarrollo de los cambios patológicos inducidos por la inhibición crónica de la síntesis de NO en el modelo de hipertensión inducida con L-NAME en ratas. Y es éste, precisamente, el **tercer objetivo propuesto en esta Tesis Doctoral: estudiar los efectos sobre la presión arterial y la función endotelial del tratamiento crónico con epicatequina en ratas con hipertensión provocada por inhibición crónica de la síntesis de NO.**

**Justification and aims.**

---



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 y Giaid, 2003; Cernacek *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2003; Schiffrin 2005). Endothelial dysfunction, defined as an imbalance of endothelial derived vasoactive factors leading to vasoconstriction and structural changes in the vessel wall, is an early event in the pathophysiology of atherosclerosis and hypertension, and it is an independent predictor of poor prognosis (Schachinger *et al.*, 2000). A significant body of evidence indicates that ET-1, through ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptor activation, increases reactive oxygen species (ROS) production in the vasculature (e.g. superoxide anion, O<sub>2</sub><sup>-</sup>), resulting in endothelial dysfunction (Wedgwood *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003a; Loomis *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2009; 2010).

The major source of intracellular ROS in vascular cells is nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, a multi-subunit enzymatic complex which comprises two membrane-bound subunits, Nox (Nox-1, Nox-2 or gp91<sup>phox</sup>, Nox-4 or Nox-5) and p22<sup>phox</sup> which are regulated by cytoplasmic subunits such as p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> and a low-molecular-weight G protein (rac 1 or rac 2) (Lyle y Griendling, 2006). ET-1 mediates vascular O<sub>2</sub><sup>-</sup> production via activation of NADPH oxidase, xanthine oxidase and mitochondria. The oxidative pathway is amplified by O<sub>2</sub><sup>-</sup>-induced eNOS uncoupling leading to further ROS generation which ultimately leads to endothelial dysfunction (Loomis *et al.*, 2005; Munzel *et al.*, 2005, Romero *et al.*, 2009). Moreover, we recently found that ET-1 induces NADPH oxidase-driven O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation through increase of p47<sup>phox</sup> protein expression (Romero *et al.*, 2009). The signaling pathway for this effect involves sequential activation of PKC, c-Src and ERK1/2 (Romero *et al.*, 2010).

Moderate alcohol consumption is associated with a significant reduction of cardiovascular mortality in humans (Flesch *et al.*, 2001). Some studies indicate that

wine may be more protective than other liquors such as beer or spirits (Klatsky *et al.*, 1997; Gronbaek *et al.*, 2000). A meta-analysis of 26 studies on more than 200,000 individuals revealed that when compared with abstainers, cardiovascular risk was reduced by 22% in beer drinkers, and by 32% in wine drinkers (Di Castelnuovo *et al.*, 2002). This and other studies suggest that wine may contain non-alcoholic compounds which, in addition to ethanol, that protect against atherosclerotic vascular disease. Consistent with this idea the relatively high wine intake in France is thought to account for the lower mortality from coronary heart disease (CHD), which is reduced by 50% compared with other European countries and the USA, despite similar intakes of saturated fats (Renaud *et al.*, 1992, Tunstall-Pedoe *et al.*, 1999). However, the molecular basis of this phenomenon, commonly known as the ‘French paradox’, remains unknown.

Red wine polyphenols (RWPs) reduced cardiovascular risk factors such as hypertension and endothelial dysfunction. In fact, chronic administration of RWPs reduces blood pressure and improves endothelial function in DOCA-salt rats, a low renin model of hypertension in which ET-1 plays a predominant role (Soares de Moura *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2007). In these hypertensive rats, RWPs prevent vascular oxidative stress and inhibit NADPH oxidase activity (Jiménez *et al.*, 2007). Similarly, in Zucker rats RWPs reduced  $O_2^-$  release via decreased expression of NADPH oxidase membrane sub-unit Nox-1 (Agouni *et al.*, 2009). However, it is not clear if these protective effects of RWPs are a result of decreased ET-1 synthesis (Jiménez *et al.*, 2007) and/or interference with ET-1 signaling pathways to lead oxidative stress in the vascular wall. Furthermore, the main compounds of RWPs extract responsible for these protective effects are unknown.

**Therefore, the first aim of this Doctoral Thesis is to analyze the mechanism involved in the protective effects of a dietary mixture of RWPs in ET-1-induced vascular oxidative response and endothelial dysfunction in isolated rat aortic**

**segments, and to test the effects of the three main monomeric polyphenols (catechin, epicatechin and resveratrol) included in this RWP's extract.**

Flavonoids comprise a large group of secondary metabolites occurring widely throughout the plant kingdom including food plants (St Leger *et al.*, 1979). Flavanols, such as epicatechin and catechin, and their oligomers, the procyanidins, represent a major class of flavonoids, that are commonly present in higher plants, and their high content in certain food plants, such as *Vitis vinifera* (grape wine), *Camellia sinensis* (tea), and *Theobroma cacao* (cocoa). Several epidemiological investigations and dietary intervention in humans using flavanols-containing foods indicate an inverse relationship between flavanols intake and the risk of cardiovascular disease (Buijsse *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2006; Nagao *et al.*, 2007). A very wide range of biological actions of flavanols-rich diet support these potential cardiovascular protective effects including the improvement of vasodilation (Fisher *et al.*, 2003; Hirata *et al.*, 2004; Janszky *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 1999; Heiss *et al.*, 2003; Schroeter *et al.*, 2006), blood pressure (Stensvoll *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2004; Hodgson *et al.*, 2003; Taubert *et al.*, 2003; 2007; Matsuyama *et al.*, 2008), insulin resistance, and glucose tolerance (Grassi *et al.*, 2005), the attenuation of platelet reactivity (Holt *et al.*, 2002), and the improvement of immune responses and antioxidant defense system (Sies *et al.*, 2005; Keen *et al.*, 2005). However, little is known about the molecular mechanisms for flavanol-mediated bioactivities in both human and animal. The reasons for these shortcomings are, at least in part, based on the fact that food matrices contain a multitude of phytochemical constituents, of which an unknown number may exert physiological effects. The effect of high-flavanol cocoa was mimicked by oral intake of pure epicatechin isolated from cocoa, and the maximum effect on endothelial function coincided with the peak of the plasma level of epicatechin metabolites (Schroeter *et al.*, 2006). Therefore, epicatechin appears to be a major bioactive constituent of cocoa and other flavanol-rich food and beverages. Epicatechin controls vascular tone inducing endothelium-dependent nitric

oxide (NO)-mediated vasodilation in resistance arteries (Huang *et al.*, 1998; 1999; Chen *et al.*, 2002) and improving endothelial dysfunction found in pathological conditions such as diabetes and hypertension (Ihm *et al.*, 2009). Epicatechin induced eNOS activation through two mechanisms: *i*) eNOS phosphorylation by the participation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, and, *ii*) activation mediated via the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II pathway (Ramirez-Sanchez *et al.*, 2010).

Hypertension is a well-established risk factor for the development and acceleration of atherosclerosis. Oxidative stress and the inactivation of nitric oxide (NO) by vascular superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) play a critical role in the pathogenesis of vascular disease, including hypertension (Griendling and Alexander, 1997; Landmesser and Harrison, 2001). Arterial O<sub>2</sub><sup>-</sup> is elevated in Ang II-induced hypertension (Oskarsson and Heistad, 1997), attributable to a large extent to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activation by Ang II (Rajagolapan *et al.*, 1996; Pagano *et al.*, 1997). However, an excess of vascular O<sub>2</sub><sup>-</sup> production has also been found in deoxycorticosterone acetate (DOCA) salt hypertension (Somers *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001; Beswick *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2007), a model with a markedly depressed plasma renin activity because of sodium retention (Gavras *et al.*, 1975). Endothelin-1 (ET-1) has been shown to contribute to the pathogenesis of salt-sensitive hypertension in animals and humans (Schiffrin, 2001), secondary to a low-renin state (Letizia *et al.*, 2001; Elijovich *et al.*, 2001). ET-1 may be one of the most potent vasoconstrictors produced in the blood vessel wall to date (Lariviere *et al.*, 1993) and also augments vascular O<sub>2</sub><sup>-</sup> production, at least in part, via ET<sub>A</sub>/NADPH oxidase pathway (Li *et al.*, 2003) leading to endothelial dysfunction and hypertension. Since flavanols (Kan *et al.*, 2002; Reiter *et al.*, 2010) decreased ET-1 synthesis in cultured bovine and human aortic endothelial cells by suppressing transcription of the ET-1 gene, we hypothesized if *in vivo* epicatechin would affect the development of DOCA-salt hypertension and its vascular features by interfering with ET-1 production.

***The second aim of this Doctoral Thesis is to examine whether chronic intake of epicatechin prevents the DOCA-salt-induced hypertension and endothelial dysfunction and, if so, to determine the underlying mechanism, focusing in the involvement of ET-1 and oxidative stress.***

Moreover, (-)-epicatechin elevates NO in endothelial cells via inhibition of the main superoxide generating system NADPH oxidase (Steffen *et al.*, 2008). Furthermore, a number of endothelial cell-protective actions of (-)-epicatechin were described, including protection against cytotoxicity, oxidative stress-related modifications of proteins and DNA, and proteasomal breakdown of eNOS (reviewed in Steffen *et al.*, 2008).

The model of chronic inhibition of NO synthase (NOS) using the NOS inhibitor N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) develops arterial hypertension and is associated with a vascular pro-oxidant, pro-atherogenic and proinflammatory phenotype (Zatz and Baylis, 1998; Luvara *et al.*, 1998).

We hypothesized that chronic (-)-epicatechin treatment might prevent the development of pathological changes associated to hypertension independently on its protective effects on NO.

***Therefore, the third aim of this Doctoral Thesis is to analyze the effects of (-)-epicatechin, at doses equivalent to those achieved in the human diet, in a model of chronic inhibition of NO synthase (NOS) using L-NAME.***



## **Material y métodos.**

---



## 1. Estudios *in vitro*. Efectos de los RWPs sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1.

### 1.1. Polifenoles objeto de estudio.

1.1.1. La mezcla de RWPs (Provinol®) fue proporcionada por Mr. D. Ageron (Société Francaise de Distillerie, Vallont Pont d'Arc, Francia) (Fig. 11).

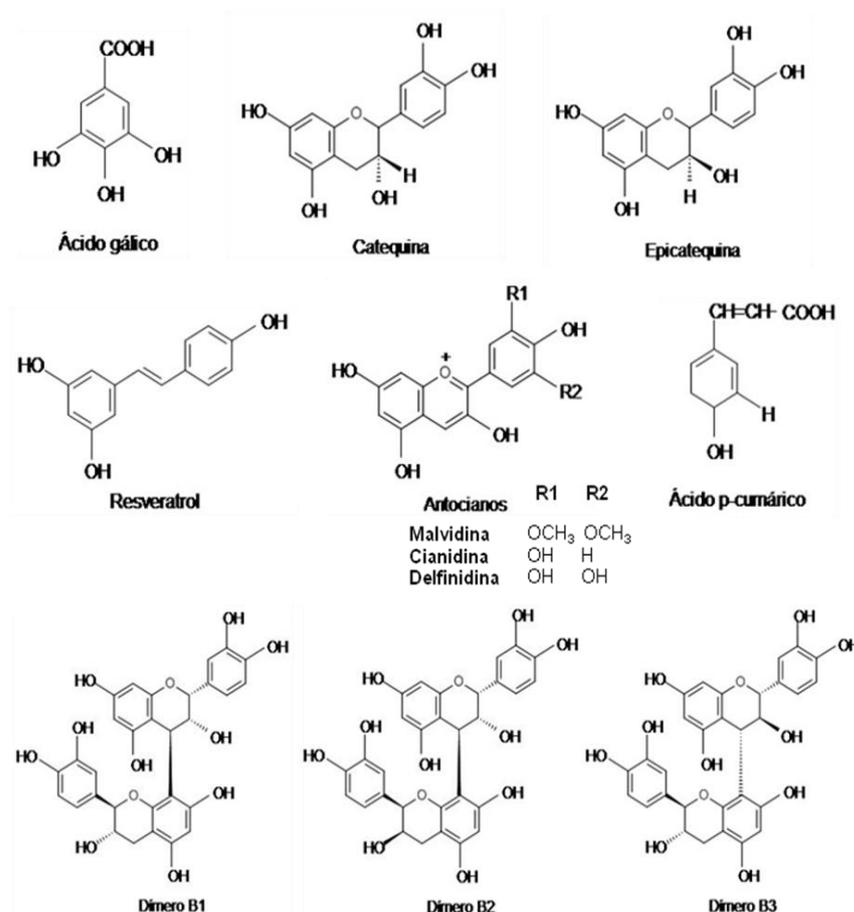


Figura 11. Componentes de la mezcla polifenólica.

El contenido en polifenoles es el siguiente (en mg/g de polvo seco): 5,3 catequina, 222,0 epicatequina, dímeros (1,9 B1; 21,1 B2; 7,4 B3), 176,3 antocianos, 4,7 ácido gálico, 15,1 ácido p-cumárico y 1,5 resveratrol.

1.1.2. Los monómeros utilizados para llevar a cabo estos experimentos, **catequina** [(+)-catechin hydrate], **epicatequina** [(-)-epicatechin] y **resveratrol**, se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Las concentraciones de dichos polifenoles [catequina (0,2  $\mu$ M), epicatequina (10  $\mu$ M) y resveratrol (0,1  $\mu$ M)] utilizadas en este trabajo son las que produjeron la máxima relajación dependiente de endotelio en los tejidos vasculares de rata (Andriambelosom *et al.*, 1997) y eran comparables a la concentración de polifenoles presentes en el plasma con la dosis de RWP de 20 mg/Kg utilizada en los experimentos *in vivo* (Agouni *et al.*, 2009).

La mezcla de polifenoles del vino tinto se disolvió en agua, mientras que los tres monómeros contenidos en la misma (catequina, epicatequina y resveratrol) fueron disueltos inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO).

## **1.2. Animales de experimentación.**

Se utilizaron ratas macho Wistar de 200 - 250 gramos (Laboratorios Harlam, Barcelona, España). Fueron mantenidas en el animalario cinco ratas por batea, con libre acceso a una dieta estándar y agua, a una temperatura constante de  $24 \pm 1$  °C y con un ciclo de luz- oscuridad de 12 horas. Todos los experimentos se realizaron conforme a la Guía para el Cuidado y el Uso de los Animales de Laboratorio (*National Institutes of Health*, NIH; publicación n°85-23, revisada en 1996) y fueron aprobados por nuestro Comité Institucional para el cuidado ético de los animales.

### 1.3. Aislamiento e incubación de los anillos aórticos de rata.

Para la realización de los experimentos, las ratas fueron sacrificadas mediante la administración de una dosis letal de pentobarbital sódico (120 mg/Kg intraperitoneal).

La aorta torácica fue cuidadosamente extraída desde el diafragma hasta el cayado aórtico y depositada en una placa Petri que contenía solución de Krebs (con una composición en mM de: NaCl 118, KCl 4,75, NaHCO<sub>3</sub> 25, MgSO<sub>4</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 y glucosa 11; pH 7,5). 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. A continuación, estos anillos fueron incubados en solución de Krebs que contenía, además, una mezcla antibiótica/antimicótica (penicilina, gentamicina y anfotericina B) durante 4 horas en un incubador de células en ausencia o presencia de ET-1 (10<sup>-9</sup> M) y en presencia de vehículo (DMSO 0,1%), RWP (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-2</sup> g/L), apocinina (10<sup>-4</sup> M), catequina (0,2 μM), epicatequina (10 μM) o resveratrol (0,1 μM).

En experimentos previos se comprobó que la ET-1 induce disfunción endotelial a partir de las 2 horas de incubación. Una vez finalizada la incubación, los anillos aórticos fueron inmediatamente usados para las pruebas de reactividad vascular o para la medida de la producción vascular de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. En otras ocasiones los anillos eran congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C para analizar la expresión proteica por western blots o génica por PCR, o incluidos en OCT (*optimal cutting temperature; Tissue-Teck*<sup>®</sup> 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 O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

### 1.4. Estudios de reactividad vascular.

Tras el periodo de incubación mencionado en el punto 1.3., 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 podía

desplazarse paralelo al anterior hacia arriba y abajo, conectando este último a un transductor isométrico de fuerza-desplazamiento (Letigraph 2000, Cibertec S.A., Madrid). Los cambios en la tensión del vaso fueron registrados y grabados [PowerLab 800 (AD Instruments, Cibertec)] (Sánchez *et al.* 2007). Los baños de órganos contenían 5 mL de la solución de Krebs, mantenida a 37 °C y constantemente burbujeada con O<sub>2</sub> al 95% y CO<sub>2</sub> 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 este periodo, la solución de Krebs se cambiaba cada 30 minutos y los anillos eran 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.**

**1.4.1.** Para estudiar el posible efecto como promotor de disfunción endotelial de ET-1, se evaluó la capacidad vasodilatadora dependiente de endotelio inducida por ACh. Para ello, después del período de 4 horas de incubación, los anillos aórticos fueron estimulados con fenilefrina ( $10^{-7}$  M -  $10^{-6}$  M) obteniendo una contracción sostenida y estable y posteriormente se realizó una curva concentración-respuesta mediante la adición acumulativa al baño de ACh ( $10^{-9}$  M -  $10^{-4}$  M).

**1.4.2.** Para investigar el posible papel de los RWPs en la mejora de la disfunción endotelial inducida por ET-1, incubamos durante 4 horas, en las condiciones ya descritas, los anillos aórticos con el endotelio intacto más ET-1 ( $10^{-9}$  M) o ET-1 más RWPs ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  g/L), para posteriormente montarlos en baños de órganos y llevar a cabo la correspondiente precontracción con fenilefrina ( $10^{-7}$  M -  $10^{-6}$  M) y curva concentración-respuesta de relajación a ACh ( $10^{-9}$  M -  $10^{-4}$  M).

**1.4.3.** Para estudiar los posibles efectos de los radicales libres, principalmente anión superóxido, generado por NADPH oxidasa en la disfunción endotelial inducida por ET-1, los anillos aórticos fueron incubados con el inhibidor de NADPH oxidasa, apocinina ( $10^{-4}$  M) en presencia o ausencia de ET-1 ( $10^{-9}$  M) durante 4 horas. Posteriormente se llevó a cabo la correspondiente precontracción con fenilefrina ( $10^{-7}$  M -  $10^{-6}$  M) y curva concentración-respuesta de relajación a ACh ( $10^{-9}$  M -  $10^{-4}$  M).

**1.4.4.** Con el fin de estudiar la respuesta vasodilatadora no dependiente de endotelio, se llevaron a cabo curvas concentración-respuesta de relajación a NPS ( $10^{-9}$  M -  $10^{-5}$  M) añadido a los baños de forma acumulativa. Este experimento se realizó en oscuridad en anillos a los que se les eliminó previamente el endotelio y que fueron precontraídos con fenilefrina ( $10^{-7}$  M -  $10^{-6}$  M).

**1.4.5.** Para evaluar la participación del óxido nítrico endotelial en la disfunción endotelial inducida por ET-1, diferentes anillos aórtico se incubaron con o sin inhibidor de la eNOS, L-NAME (100 mM), en baño de órganos durante 30 minutos antes de la adición de fenilefrina ( $10^{-9}$  M -  $10^{-4}$  M).

**1.4.6.** Para establecer la implicación del ER- $\alpha$  en la mejora que producen los RWPs en la disfunción endotelial inducida por ET-1, co-incubamos los anillos en presencia del antagonista de ER no selectivo ICI-182780 (1 $\mu$ M) (Wakeling *et al.*, 1991), de ET-1 ( $10^{-9}$  M) y de RWPs (10<sup>-2</sup> g/L) durante 4 horas. Después llevamos a cabo la correspondiente precontracción con fenilefrina ( $10^{-7}$  M -  $10^{-6}$  M) y curva concentración-respuesta de relajación a ACh ( $10^{-9}$  M -  $10^{-4}$  M).

**1.4.7.** Para determinar si la activación de receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR, *peroxisome proliferator activator receptor*)  $\gamma$  está implicada en el efecto protector que ejercen los RWPs en la disfunción endotelial inducida por ET-1, los

anillos aórticos se co-incubaron con el antagonista de PPAR $\gamma$  GW9662 (1  $\mu$ M) (Fu *et al.*, 2001) en presencia de ET-1 ( $10^{-9}$  M) y de RWPs ( $10^{-2}$  g/L) durante 4 horas. Para después llevar a cabo la correspondiente precontracción con fenilefrina ( $10^{-7}$  M- $10^{-6}$  M) y curva concentración-respuesta de relajación a ACh ( $10^{-9}$  M -  $10^{-4}$  M).

**1.4.8.** Para analizar cuál de los componentes de la mezcla polifenólica podía ser el responsable del efecto protector frente a la disfunción endotelial inducida por ET-1, los anillos aórticos se incubaron en presencia de ET-1 ( $10^{-9}$  M) y epicatequina (10  $\mu$ M) o catequina (0,2  $\mu$ M) o resveratrol (0,1  $\mu$ M) durante 4 horas. Después se llevó a cabo la correspondiente precontracción con fenilefrina ( $10^{-7}$  M- $10^{-6}$  M) y curva concentración-respuesta de relajación a Ach ( $10^{-9}$  M- $10^{-4}$  M).

### **1.5. Detección *in situ* de la producción vascular de O $_2^-$ .**

La detección *in situ* de la producción vascular de radicales O $_2^-$  se realizó mediante la técnica del dihidroetidido (DHE) (Lodi *et al.*, 2006). El DHE es un compuesto que entra en las células y es oxidado por los radicales O $_2^-$  a etidio, el cual se une al DNA dando lugar a una fluorescencia de color rojo.

Los anillos de la aorta torácica fueron incluidos en OCT (Tissue-Tek® *OCT Compound*, Sakura) y congelados ( $-80^\circ$  C). Posteriormente se realizaron cortes histológicos de cada anillo de 10  $\mu$ m en un criostato (Microm International Model HM500 OM), que se fijaron en portas con polilisina. Los cortes histológicos se llevaron a una cámara húmeda donde se incubaron en una solución de ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperacínil]- etanosulfónico (HEPES) tamponada (en mM: NaCl 130, KCl 5, MgCl $_2$  1,2, glucosa 10 y HEPES 10, ajustado a pH 7,3 con NaOH) durante 30 minutos a 37  $^\circ$ C. Transcurrido este tiempo, se procedió a una nueva incubación con solución HEPES que contenía DHE ( $10^{-5}$  M) durante 30 minutos y en oscuridad. A continuación, las preparaciones se tiñeron con el marcador nuclear, dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol [DAPI ( $3 \times 10^{-7}$  M)], durante 5 minutos en cámara húmeda, a 37  $^\circ$ C y en

oscuridad. 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 del microscopio y de la 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 mediante la relación entre la fluorescencia de etidio/DAPI. En experimentos preliminares, la fluorescencia del DHE fue prácticamente abolida por el captador de  $O_2^-$  tirón, indicando la especificidad de la reacción.

### **1.6. Actividad NADPH oxidasa.**

La medida de la actividad NADPH oxidasa en anillos de aorta se realizó mediante quimioluminiscencia con lucigenina (Lodi *et al.*, 2006). La técnica consiste en colocar los anillos en tubos con solución salina fisiológica, cuya composición es la siguiente (en mM): 119 NaCl, 20 HEPES, 4,6 KCl, 1  $MgSO_4$ , 0,15  $Na_2HPO_4$ , 0,4  $KH_2PO_4$ , 1  $NaHCO_3$ , 1,2  $CaCl_2$ , y 5,5 glucosa (pH 7,4). La producción de radicales  $O_2^-$  fue estimulada mediante la adición de NADPH (100 $\mu$ M) a los anillos a la hora de realizar la medida. La lucigenina fue inyectada automáticamente por el luminómetro a una concentración final de 5 $\mu$ M. La producción de  $O_2^-$  fue medida mediante los cambios de luminiscencia registrados durante 200 segundos en el luminómetro (Lumat LB 9507, Berthold, Alemania) a intervalos de 5 segundos. Posteriormente los anillos fueron desecados y pesados. La medida de la producción de  $O_2^-$  se expresa como unidades relativas de luminiscencia (RLU)/minuto/miligramo de tejido aórtico seco.

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  $\mu$ M) (Romero *et al.*, 2010).

## **1.7. Western Blot.**

**1.7.1.** Para analizar la expresión proteica de p47<sup>phox</sup> 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 p47<sup>phox</sup> 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  $\mu$ g/ml, leupeptina 4  $\mu$ g/ml, N- $\alpha$ -para-tosil-L-lisina clorometilamina 4  $\mu$ g/ml, NaF 5 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 10 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, PMSF 0,5 mM, ácido okadaico 10 nM e igepal al 1%. La expresión proteica 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 50  $\mu$ g de proteína. 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.

Para electroforesis se utilizó un gel de dodecilsulfato sódico (SDS, *sodium dodecyl sulfate*)-poliacrilamida al 15% 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 el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-p47<sup>phox</sup> (dilución 1:1000, Santa

Cruz Biotechnology) durante toda la 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-conejo conjugado con peroxidasa (1:5000, Sigma-Aldrich), diluido en TBS-T al 5% de leche en polvo desnatada. Las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras lavar de nuevo las membranas de la forma anteriormente descrita, la unión del anticuerpo a la proteína se detectó mediante su incubación durante un minuto con un sistema ECL (Amersham Pharmacy 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](http://www.scioncorp.com)). Las membranas fueron recicladas para determinar la expresión de la  $\alpha$ -actina de cada muestra. Se calculó la relación entre la intensidad de banda para p47<sup>phox</sup> y su correspondiente  $\alpha$ -actina de cada muestra. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de dicha relación de cada grupo con respecto al grupo control.

**1.7.2.** Para la determinación de la expresión proteica de **eNOS y fosfo-eNOS** (p-eNOS) la composición del tampón de homogeneización utilizado fue: HEPES 10 mM, sacarosa 320 mM, EDTA 100  $\mu$ M, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM y leupeptina 4  $\mu$ g/mL (pH 7,4).

Los western blots se llevaron a cabo con 40  $\mu$ g de proteína y se procedió de la misma manera a la expuesta en el apartado anterior, con la diferencia de que los geles de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida se prepararon al 8 %. Las membranas fueron incubadas, en primer lugar, con el anticuerpo anti-fosfo-eNOS (Ser<sup>1177</sup>) (dilución 1:1000, Cell Signaling Technology) y posteriormente con el anticuerpo policlonal de ratón anti-eNOS (dilución 1:1000, Cell Signalling Technology) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo secundario caprino anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:5000, Sigma-Aldrich) para determinar p-eNOS, y con

anticuerpo secundario caprino anti-ratón conjugado con peroxidasa (1:5000, Sigma-Aldrich) para determinar eNOS. De nuevo, la detección y la medida de las bandas se realizaron de manera similar a la descrita en el apartado anterior. Se calculó la relación entre la intensidad de banda para p-eNOS y su correspondiente eNOS de cada muestra. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de dicha relación de cada grupo con respecto al grupo control.

**1.7.3.** Para analizar la expresión proteica del **receptor ET<sub>A</sub>** (ETAR) mediante el análisis por western blot, los anillos aórticos de los diferentes grupos fueron homogeneizados en frío utilizando el siguiente tampón (pH 7,4): Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 20 mM, NaF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, SDS 0,1%, deoxicolato sódico 0,5%, Triton X-100 1%, glicerol 10%, PMSF 1 mM, aprotinina 60 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml y pepstatina 1 µg/ml. Siguiendo el mismo procedimiento explicado en el apartado 1.7.1. los western blots se llevaron a cabo con 50 µg de proteína. La electroforesis se realizó en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario monoclonal de ratón ETAR (dilución 1:500, Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente, se incubaron con anticuerpo secundario caprino anti-ratón conjugado con peroxidasa (1:4000, Sigma-Aldrich). Las membranas fueron recicladas para determinar la expresión de la  $\alpha$ -actina. Se calculó la relación entre la intensidad de banda para ETAR y su correspondiente  $\alpha$ -actina de cada muestra. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de dicha relación de cada grupo con respecto al grupo control.

**1.7.4.** Para evaluar la participación de las principales proteína cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) en la vía de señalización implicada en el aumento de la producción vascular de O<sub>2</sub><sup>-</sup> inducida por ET-1, determinamos la expresión proteica de **fosfo-ERK1/2** y **ERK1/2** en anillos aórticos incubados con ET-1 (10<sup>-9</sup> M) en presencia o ausencia de RWPs (10<sup>-3</sup> g/L) o epicatequina (10µM) durante 1 hora. 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,  $\beta$ -glicerol fosfato 40 mM,  $MgCl_2$  2,5 mM, DTT 1 mM, aprotinina 40  $\mu$ g/mL, leupeptina 4  $\mu$ g/mL, iodometamida 1 mM,  $Na_3VO_4$  2 mM, PMSF 0,5 mM e igepal 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  $\mu$ 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 1.7.1.). 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 (1:5000, Sigma-Aldrich) para determinar ERK1/2, y con anticuerpo secundario caprino anti-ratón conjugado con peroxidasa (1:5000, 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 1.7.1. Se calculó 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.

### 1.8. Reacción en cadena de la polimerasa.

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR, *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) se extrajo el RNA total de cada aorta por homogenización y se convirtió a DNA complementario (cDNA) por métodos estándar. La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo con un termociclador Techne Techgene (Techne, Cambridge, Reino Unido). La desnaturalización inicial se hizo a 95°C durante 3 minutos y le siguieron de 30 a 40 ciclos de amplificación (30 para caveolina-1, p22<sup>phox</sup> y eNOS y 40 para p47<sup>phox</sup>). Cada ciclo consta de un minuto de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de unión del cebador a la cadena de cDNA a 60°C para p47<sup>phox</sup>, 55°C para p22<sup>phox</sup> y caveolina-1 ó 63°C para eNOS y un minuto para la amplificación del gen a 72°C. Tras el ciclo final la temperatura se mantuvo a 72°C durante 10 minutos para permitir la hibridación de los productos amplificados. Los productos de la RT-PCR fueron fraccionados por tamaño en un gel de agarosa al 1,5%, y las bandas se visualizaron con bromuro de etidio y se cuantificaron por análisis densitométrico sobre las imágenes escaneadas con el programa Scion Image Release Beta 4.02 software (<http://www.scioncorp.com>).

Las secuencias para los cebadores se seleccionaron de acuerdo a las secuencias publicadas en el Banco de Genes. En el caso de p47<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> son las siguientes: p47<sup>phox</sup> (191 pares de bases) sentido, 5'-CCCAGCGACAGATTAGAAGC-3' y antisentido, 5'-TGGATTGTCCTTTGAGTCAGG-3'; p22<sup>phox</sup> (220 pares de bases) sentido 5'-GCGGTGTGGACAGAAGTACC-3' y antisentido, 5'-CTTGGGTTTAGGCTCAATGG-3'. Las secuencias de los cebadores de caveolina-1 y eNOS son las que siguen: caveolina-1 (304 pares de bases) sentido, 5'-TCTACAAGCCCAACAACAAGG-3' y antisentido, 5'-AGGAAAGAGAGGATGGCAAAG-3'; eNOS (164 pares de bases) sentido 5'-CGAGATATCTTCAGTCCCAAGC-3' y antisentido 5'-GTGGATTTGCTGCTCTCTAGG-3'. La gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa

(GADPH) se usó como control para la amplificación. Las señales se expresaron relativas a la intensidad de la GADPH en cada muestra del experimento.

### 1.9. Reactivos.

Todos los productos y reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, excepto la mezcla de polifenoles de vino tinto (Provinol®) que fue proporcionada por Mr. D. Ageron (Société Francaise de Distillerie, Vallont Pont d'Arc, Francia); el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-p47<sup>phox</sup> y el anticuerpo primario monoclonal de ratón ETAR, ambos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EE.UU); el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-fosfo-eNOS, el anticuerpo policlonal de ratón anti-eNOS y el anticuerpo primario policlonal de conejo ERK1/2 adquiridos en Cell Signaling Technology (Danvers, EE.UU).

Los tres monómeros contenidos en la mezcla de RWPs (catequina, epicatequina y resveratrol) fueron disueltos inicialmente en DMSO, y todos los demás fármacos y posteriores diluciones, en agua destilada.

### 1.10. 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. Las 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:

$E = E_{\max} / (1 + 10^{-k * ([\text{fármaco}] - pD_2)})$ , 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.

## **2. Estudios *in vivo*.**

### **2.1. Flavanol objeto de estudio.**

Para llevar a cabo los dos tratamientos *in vivo* propuestos en este trabajo utilizamos el flavanol **epicatequina** [(-)-epicatechin], que se obtuvo de Sigma-Aldrich.

### **2.2. Animales y grupos experimentales.**

Todos los experimentos se realizaron conforme a la Guía para el Cuidado y el Uso de los Animales de Laboratorio (*National Institutes of Health*, NIH; publicación nº85-23, revisada en 1996) y fueron aprobados por nuestro Comité Institucional para el cuidado ético de los animales. Antes de iniciar cada uno de los tratamientos hubo un periodo de aclimatación de dos semanas para los animales en las que, además, se les tomó la presión para que se acostumbraran al funcionamiento del pletismógrafo. Las ratas se mantuvieron en el animalario del Departamento, cinco por jaula, y a una temperatura constante de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , con un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad, libre acceso a comida (dieta estándar) y agua.

#### **2.2.1. Experimento I: Efectos de la epicatequina sobre el modelo de hipertensión DOCA-sal.**

Se utilizaron ratas Wistar macho (150-180 g) que se obtuvieron de Harlan Laboratories S.A. (Barcelona, España). Las ratas se anestesiaron con una dosis intraperitoneal de 2,5 mL/Kg de equitensina (500 mL contienen 43 % w/v hidrato de cloral en 81 mL etanol; 4,86 mg nembotal; 198 mL propilen glicol; 10,63 g  $\text{MgSO}_4$ ; agua destilada) y se uninefrectomizaron. Los animales se dividieron de forma randomizada en cinco grupos:

- a) Control (vehículo, 1mL de metilcelulosa al 1%), n=10.
- b) Epicatequina (10 mg/Kg en 1mL de metilcelulosa al 1%), n=10.
- c) DOCA-sal (vehículo, 1mL de metilcelulosa al 1%), n=9.
- d) DOCA-sal + Epicatequina 2 mg (2 mg/Kg en 1mL de metilcelulosa al 1%)  
n=10.
- e) DOCA-sal + Epicatequina 10 mg (10 mg/Kg en 1mL de metilcelulosa al 1%)  
n=9.

Al día siguiente de la uninefrectomía a los grupos DOCA-sal se les administró, vía intramuscular, DOCA a una dosis de 12,5 mg/0,5 mL vehículo/rata por semana (vehículo constituido por una suspensión de aceite de sésamo en etanol absoluto al 20 %), durante 5 semanas. A lo largo del periodo experimental, las ratas con el tratamiento DOCA-sal tenían acceso a agua que contenía NaCl al 1 %. A los grupos tratados con epicatequina se les administraba intragástricamente las dosis indicadas anteriormente cada día. El peso corporal se controló una vez por semana. Los tratamientos con epicatequina se detuvieron dos días antes del final de los experimentos, para poder estudiar los efectos crónicos sin la implicación de los efectos de la administración aguda. En ese momento las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas con libre acceso a comida y sus respectivos líquidos de bebida, con el fin de obtener la orina de 24 horas. Tras las cinco semanas que duró el tratamiento, las ratas fueron anestesiadas con 2,5 mL/Kg de equitensina intraperitoneal y se les extrajo sangre de la aorta abdominal.

### **2.2.2. Experimento II: Efectos de la epicatequina en el modelo de hipertensión L-NAME.**

En el tratamiento *in vivo* con epicatequina en este modelo de hipertensión (Zatz y Baylis, 1998) utilizamos ratas macho Wistar Kyoto de 14 semanas de edad (Charles River, Alemania). En el momento de comenzar el experimento los animales tenían un

peso comprendido entre 350 y 400 gramos y fueron asignadas de manera aleatoria a los siguientes cuatro grupos:

- f) Control (vehículo, 1mL de metilcelulosa al 1%), n=8.
- g) Vehículo + L-NAME (75 mg/100mL en agua de bebida, aproximadamente 75mg/Kg/día), n=10.
- h) Epicatequina (2 mg/Kg en 1mL de metilcelulosa al 1%) + L-NAME, n=9.
- i) Epicatequina (10 mg/Kg en 1mL de metilcelulosa al 1%) + L-NAME, n=10.

La duración del tratamiento fue de 4 semanas. En todos los grupos, tanto la epicatequina como el vehículo se administraron por vía oral mediante sonda gastroesofágica una vez al día. El consumo de bebida (agua con y sin L-NAME) y comida se midió diariamente, así como el peso corporal fue controlado semanalmente. Durante los últimos días del periodo experimental los animales se colocaron en jaulas metabólicas para la recogida de la orina durante 24 horas. El tratamiento con epicatequina se interrumpió dos días antes del final del estudio con el fin de analizar los efectos a largo plazo de nuestro fármaco sin intervención de los efectos de la administración aguda.

### **2.3. Medida de la presión arterial.**

Mediante registro indirecto se midieron la presión arterial sistólica, la presión arterial diastólica y la presión media, además de la frecuencia cardíaca. Dichos datos fueron determinados semanalmente 18-20 horas después de la administración del fármaco en ratas conscientes, aisladas y precalentadas (37°C), mediante pletismografía en la cola (Navarro-Cid *et al.*, 1995) (Digital Pressure Meter LE 5001, Letica S.A., Barcelona). El medidor de presión LE 5001 es un equipo basado en microprocesador, específicamente diseñado para medir de modo no invasivo la presión arterial en animales. El sistema se basa en un circuito neumático de presión variable que es

detectada mediante un transductor de presión y mostrada en la pantalla del equipo. El método usado para tomar la presión se basa en la técnica de esfigomanometría usada para medir la presión arterial en humanos. De ahí que el equipo conste de un manguito, cuya misión es ocluir el paso de la sangre en un vaso sanguíneo y un transductor que detecta los pulsos. Transductor y manguito se fijan a la cola del animal para trabajar en la arteria caudal. El LE 5001 mide la frecuencia cardíaca (FC) en latidos por minuto (lpm), los valores de presión arterial sistólica o máxima presión (PAS), diastólica o mínima (PAD) y la media calculada como:

$$\text{PAM} = \text{PAD} + 0,33 (\text{PAS}-\text{PAD})$$

Se realizaron del orden de quince determinaciones en cada sesión y se tomó como dato la media aritmética de los 10 valores más semejantes, con una diferencia no mayor de 5 mmHg.

#### **2.4. Parámetros morfológicos.**

Al final del periodo experimental, los animales se anestesiaron con 2,5 mL/Kg de equitensina (i.p.) y la sangre se recolectó de la aorta abdominal utilizando una jeringa heparinizada. Posteriormente se obtuvo el plasma mediante centrifugación de la sangre a 3000 r.p.m durante 10 minutos. El plasma se alicuotó y se almacenó a -80 °C hasta su utilización. Seguidamente, tras la exanguinación de los animales, se extrajeron los riñones, la aorta torácica y el corazón. Tras una cuidadosa y exhaustiva limpieza de la aorta, tanto del tejido conectivo como del graso, parte del vaso se guardó a -80°C para los experimentos de western blot y PCR, y otra parte se utilizó inmediatamente para las pruebas de reactividad vascular similares a las descritas en el apartado 1.4. Los demás órganos se lavaron en solución de Krebs fría y se secaron para ser pesados. Tras pesar el corazón se eliminaron las aurículas y el ventrículo derecho, para quedarnos con el ventrículo izquierdo limpio (más el septo), que se pesó de nuevo. Los índices de peso cardíaco, de ventrículo izquierdo y renal se calcularon dividiendo el peso de éstos entre el peso corporal. Los órganos fueron divididos, congelados en nitrógeno líquido y

almacenados a -80°C para su posterior utilización, a excepción de los riñones derechos que fueron guardados en formol para la posterior histología.

## **2.5. Determinaciones plasmáticas.**

### **2.5.1. Determinación del nivel de peroxidación lipídica.**

El contenido plasmático de MDA se evaluó como describen Esterbauer y Cheesman (1990). Se hicieron reaccionar en un eppendorf mantenido en hielo, 100µL de plasma con 250 µL de reactivo cromogénico (solución de 1-metil-2-fenilindol 1,03 mM en acetonitrilo) y 75 µL de ácido clorhídrico al 35 % (v/v), agitando cada eppendorf.

La mezcla se incubó durante 40 minutos en un baño a 45 °C, y posteriormente se volvió a mantener en hielo, para ser centrifugada a 4 °C durante 15 minutos a 14.000 r.p.m. Posteriormente, en una placa de 96 pocillos, se cargaron 100 µl de cada mezcla y se midió su absorbancia a 586 nm en un lector de placas (Microplate Reader Model 680XR, Bio-Rad). El cálculo del contenido de MDA se realizó mediante la interpolación de los valores obtenidos con una curva patrón de 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

### **2.5.2. Determinación de los niveles de ET-1 (Experimento I).**

Los niveles plasmáticos de ET-1 se determinaron con un kit comercial (R&D Systems, Mineapolis, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó 1 mL de plasma y los resultados se expresaron en pg de ET-1/mL de plasma.

### **2.5.3. Determinación del factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) (Experimento II).**

La concentración en plasma del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) se determinó utilizando un kit de inmunoensayo (Diacclone, Inc., Besancon, Francia) específico para TNF $\alpha$  de rata, siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **2.6. Determinaciones en orina.**

### **2.6.1. Determinación de 8-iso-prostaglandina (iso-PG) F<sub>2α</sub> total.**

Para este ensayo se utilizaron 50 µL de orina. La iso-PGF<sub>2α</sub> total se midió usando un kit de inmunoensayo (Cayman Chemical), y los resultados se expresaron en nanogramos excretados durante 24 h por 100g de peso corporal de la rata.

### **2.6.2. Proteinuria.**

Se utilizó el método de Bradford (1976). Éste se basa en la reacción de un colorante, el azul de Coomassie, con los grupos amino proteicos dando lugar a un complejo coloreado que presenta un máximo de absorbancia a 595 nm. La formación de dicho complejo es muy rápida y permanece estable durante, al menos, 60 minutos.

El reactivo de coloración se prepara disolviendo 100 mg de azul de Coomassie en 50 mL de etanol de 95° y se añaden 100 mL de ácido ortofosfórico al 85 % (p/v) y agua destilada hasta completar 1 litro. Esta solución se mantiene en agitación a 4 °C durante 24 horas y después se filtra para eliminar los restos no disueltos del reactivo de coloración. La solución, mantenida a 4 °C, permanece estable durante periodos de tiempo relativamente largos.

Para la curva patrón se preparan soluciones de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (fracción V) a partir de una solución madre de 1 mg/mL mediante diluciones seriadas de ½ en agua destilada o en solución salina.

Para la medida se procede adicionando a 1mL del reactivo de coloración, 4 µl de una dilución adecuada de la orina y 36 µl de agua destilada o solución salina en una cubeta para espectrofotometría. Se agita y se deja reaccionar la mezcla durante al menos 5 minutos antes de realizar la lectura a 595 nm en un espectrofotómetro GBC 916. El cálculo del contenido proteico se lleva a cabo por interpolación en la curva patrón obtenida de albúmina y los resultados se expresaron en miligramos de proteína excretados por 100g de rata durante 24 h.

## **2.7. Parámetros histológicos (Experimento II).**

El estudio de la histología renal se realizó solamente en el modelo de hipertensión L-NAME. Varias secciones transversales del polo superior del riñón, previamente fijadas con formaldehído tamponado al 4%, se tiñeron con hematoxilina y eosina, y tinción periódica con ácido Schiff. El alcance de la lesión vascular (estenosis, arteriopatía hialina e hiperplasia proliferativa miointimal) se evaluó mediante el examen de los perfiles de las arterias y arteriolas en una única sección del riñón y contando el número de vasos afectados. La presencia de lesiones glomerulares (glomeruloesclerosis y fibrosis capsular) fue evaluada en al menos 200 glomérulos. La atrofia tubular y los cilindros tubulares también fueron evaluados. El estudio morfológico se realizó en forma ciega en secciones de 4 micras. Los resultados se expresaron como porcentaje de ratas con lesiones en cada grupo, y la gravedad de las lesiones se calculó semicuantitativamente utilizando una escala de 0 a 3 (0, ausencia; 1, leve [ $<10\%$  de los vasos, túbulos o glomérulos implicados]; 2, moderada [10-25%], 3, grave [ $> 25\%$ ]). (De Gracia *et al.*, 2000).

## **2.8. Estudios de reactividad vascular.**

Tras el sacrificio de los animales y posterior exanguinación, la aorta fue cuidadosamente extraída y depositada en una placa Petri que contenía solución de Krebs. Se procedió a su limpieza y montaje en el sistema de baños de órganos tal como explicamos en el apartado 1.4. de esta Tesis Doctoral.

En el modelo de hipertensión L-NAME, se realizaron, además, estudios funcionales en arterias mesentéricas en un miógrafo isométrico (Multi Myograph System-610M Danish Myo Technology). Para ello, una vez aislada la segunda rama de la arteria mesentérica, se cortó en segmentos de unos 2 mm de longitud y entre 400 - 500  $\mu\text{m}$  de diámetro. Con la ayuda de las dos plataformas metálicas incluidas en el miógrafo, se introdujeron dos alambres de acero inoxidable (40  $\mu\text{m}$  de diámetro) por la luz del segmento; uno de los alambres se fijó a un soporte móvil acoplado a un tornillo

micrométrico (que permite modificar el grado de estiramiento del vaso) y el otro alambre se fijó a un segundo soporte acoplado a un transductor isométrico. Cada vaso se tensionó en función de su diámetro para la obtención de una presión transmural de 13,3 N/m<sup>2</sup>.

### **Protocolos experimentales.**

#### ***Experimento I: modelo de hipertensión DOCA-sal.***

Para evaluar la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, se realizaron curvas concentración-respuesta de relajación a acetilcolina (ACh) ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M) añadida de forma acumulativa a los baños, en anillos precontraídos con fenilefrina ( $10^{-6}$  M).

Con el fin de estudiar la respuesta vasodilatadora no dependiente de endotelio, se llevaron a cabo curvas concentración-respuesta de relajación a nitroprusiato sódico (NPS) ( $10^{-9}$  M -  $10^{-5}$  M) añadido a los baños de forma acumulativa. Este experimento se realizó en oscuridad en anillos a los que se les eliminó previamente el endotelio de manera mecánica, y precontraídos con fenilefrina ( $10^{-6}$  M).

Para estudiar la respuesta contráctil a fenilefrina se realizaron curvas concentración-respuesta en las que la fenilefrina se adicionó al baño de órganos de manera acumulativa ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  M).

Para evaluar la generación de NO basal se midió la contracción inducida por fenilefrina ( $10^{-6}$  M) tras 30 minutos de incubación con el inhibidor de la NOS, L-NAME, ( $10^{-4}$  M) (Vera *et al.*, 2007).

#### ***Experimento II: modelo de hipertensión L-NAME.***

En anillos aórticos sin endotelio pre-contraídos con fenilefrina ( $10^{-6}$  M) se realizaron curvas concentración-respuesta de relajación a NPS ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  M).

La respuesta relajante a acetilcolina se estudió tanto en la arteria mesentérica intacta como en la aorta, pre-contraídas con fenilefrina (5  $\mu$ M en la arteria mesentérica y 1  $\mu$ M

ó 0,1  $\mu\text{M}$ , en el control o en los anillos aórticos tratados con L-NAME, respectivamente, para obtener un nivel similar de precontracción).

Las contracciones provocadas por acetilcolina se llevaron a cabo en anillos aórticos con endotelio que fueron previamente estimulados con KCl (80 mM). Tras lavar con solución de Krebs e incubar durante 30 minutos con L-NAME ( $10^{-4}$  M), la acetilcolina se añadió de manera acumulativa ( $10^{-8}$  -  $10^{-4}$  M). En este experimento, las respuestas contráctiles a la acetilcolina se expresaron como porcentaje de la respuesta a KCl.

Para evaluar la generación NO basal se midió la contracción inducida por fenilefrina ( $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  M) tras 30 minutos de incubación con L-NAME ( $10^{-4}$  M).

## **2.9. Detección *in situ* de la producción vascular de $\text{O}_2^-$ .**

Utilizamos dihidroetidio para localizar la producción *in situ* de  $\text{O}_2^-$  en secciones aórticas. El DHE entra en las células y es oxidado por el  $\text{O}_2^-$  para formar etidio, que se une al DNA para producir una fluorescencia de color rojo. Anillos aórticos (de 2 - 3 mm) obtenidos tras el sacrificio de los animales fueron incluidos en OCT y se llevó a cabo esta técnica tal y como se ha explicado en el apartado 1.5. La producción de  $\text{O}_2^-$  fue calculada de la relación entre la fluorescencia de etidio/DAPI.

## **2.10. Actividad NADPH oxidasa.**

La medida de la producción de radicales  $\text{O}_2^-$  en los anillos de aorta se realizó mediante quimioluminiscencia con lucigenina (5 $\mu\text{M}$ ), mediante la técnica descrita en el punto 1.6. Tras el sacrificio de los animales y la obtención inmediata de los anillos aórticos, los cambios en la liberación de  $\text{O}_2^-$  se determinaron midiendo la luminiscencia de la lucigenina con un luminómetro (Lumat LB 9507, Berthold, Alemania) durante 200 segundos en intervalos de 5 segundos. Posteriormente, los anillos fueron desecados y se determinó su peso en seco. La producción de  $\text{O}_2^-$  se expresó como unidades relativas de luminiscencia (RLU)/minuto/mg de tejido aórtico seco.

### **2.11. Western blot.**

En el apartado 1.7. hemos descrito la técnica del western blot para la determinación de la expresión proteica en los anillos aórticos de los diferentes grupos. Es por ello que en este apartado nos limitaremos a resumir en la Tabla 3 los diferentes anticuerpos.

Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios durante toda una noche a 4°C. Posteriormente, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario y se llevó a cabo la detección y la medida de las bandas tal como hemos descrito en el apartado 1.7.1.

En el caso de p47<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, COX-2 y eNOS (este último sólo en el experimento I), las membranas fueron recicladas para determinar la expresión de la  $\alpha$ -actina. Se calculó la relación entre la intensidad de banda para cada uno de ellos y su correspondiente  $\alpha$ -actina de cada muestra. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de dicha relación de cada grupo con respecto al grupo control.

En los western blots de fosfo-eNOS y eNOS, fosfo-AKT y AKT así como en el caso de fosfo-ERK y ERK, se calculó la relación entre la intensidad de las bandas de cada muestra entre fosfo-eNOS/eNOS, fosfo-AKT/AKT y fosfo-ERK/ERK. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de dicha relación de cada grupo con respecto al grupo control.

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados en las determinaciones de expresión proteica.**

<b>Anticuerpo primario (Dilución) (Casa comercial)</b>	<b>Anticuerpo secundario (Dilución) (Casa comercial)</b>	<b>Concentración del gel de SDS- poliacrilamida</b>	<b>Experimento</b>
policlonal de conejo <b>anti-p47<sup>phox</sup></b> (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology)	caprino <b>anti-conejo</b> conjugado con peroxidasa (1:5000) (Sigma-Aldrich)	12 %	I y II
policlonal de cabra <b>anti-p22<sup>phox</sup></b> (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology)	conejo <b>anti-caprino</b> conjugado con peroxidasa (1:5000) (Sigma-Aldrich)	15 %	I y II
policlonal de conejo <b>anti-fosfo-eNOS (Ser<sup>1177</sup>)</b> (1:1000) (Cell Signaling Technology)	caprino <b>anti-conejo</b> conjugado con peroxidasa (1:5000) (Sigma-Aldrich)	8 %	I y II
monoclonal de ratón <b>anti-eNOS</b> (1:1000) (Cell Signaling Technology)	caprino <b>anti-ratón</b> conjugado con peroxidasa (1:5000) (Sigma-Aldrich)	8 %	I y II
monoclonal de conejo <b>anti-fosfo-AKT (Ser<sup>473</sup>)</b> (1:1000) (Cell Signaling Technology)	caprino <b>anti-conejo</b> conjugado con peroxidasa (1:5000) (Sigma-Aldrich)	10 %	I y II
monoclonal de conejo <b>anti-AKT</b> (1:1000) (Cell Signaling Technology)	caprino <b>anti-conejo</b> conjugado con peroxidasa (1:5000) (Sigma-Aldrich)	10 %	I y II
policlonal de conejo <b>anti-COX-2</b> (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology)	caprino <b>anti-conejo</b> conjugado con peroxidasa (1:4000) (Sigma-Aldrich)	10 %	II
policlonal de conejo <b>anti-ERK 1/2</b> (1:1000) (Cell Signaling Technology)	caprino <b>anti-conejo</b> conjugado con peroxidasa (1:5000) (Sigma-Aldrich)	12 %	II
policlonal de ratón <b>anti-fosfo-ERK 1/2(Thr<sup>183</sup> y Tyr<sup>185</sup>)</b> (1:1000) (Sigma-Aldrich)	caprino <b>anti-ratón</b> conjugado con peroxidasa (1:5000) (Sigma-Aldrich)	12 %	II

## 2.12. Reacción en cadena de la polimerasa (Experimento II).

Para analizar la expresión génica de p22<sup>phox</sup>, eNOS, ICAM-1, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (secuencias de los cebadores en la Tabla 4) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), el RNA total fue extraído mediante homogenización y siguió el mismo tratamiento que se describe en el apartado 1.8. 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>).

**Tabla 4. Cebadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa.**

Cebador	Ciclos de amplif.	T <sup>a</sup> annealing (°C)	Pares de bases	Secuencia (Sentido/Antisentido)
p47 <sup>phox</sup>	35	57	100	5-ATGACAGCCAGGTGAAGAAGC-3 5-CGATAGGTCTGAAGGCTGATGG-3
p22 <sup>phox</sup>	32	55	220	5-GCGGTGTGGACAGAAGTACC-3 5-CTTGGGTTTtaggctcaatgg-3
eNOS	32	58	161	5-ATGGATGAGCCAACTCAAGG-3 5-TGTCGTGTAATCGGTCTTGC-3
ICAM-1	32	55	386	5-AGGTATCCATCCATCCCACA-3 5-AGTGTCTCATTGCCACGGAG-3
TNF- $\alpha$	32	57	468	5-ATGTGGAAGTGGCAGAGGAG-3 5-GGCCATGGAAGTGGCAGAGGAG-3
IL-1 $\beta$	32	55	497	5-AGGCAGTGTCCTCATTGTG-3 5-GGAGAGCTTTCAGCTCACAT-3

### 2.13. Amplificación del cDNA (PCR-RT en tiempo real) (Experimento I).

La técnica de RT-PCR cuantitativa en tiempo real se utilizó para analizar la expresión de mRNA de genes. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó usando Syber Green con ROX como fluoróforo de referencia (iTaq™ SYBR® Green Supermix with ROX sample, Biorad laboratorios, California, EEUU), a partir del cDNA ya extraído como se describió anteriormente (apartado 1.8.). El gen de referencia elegido fue β-actina y su expresión fue empleada como control de carga en los distintos experimentos. Se emplearon las distintas secuencias o primers (Tabla 5):

**Tabla 5. Oligonucleótidos para RT-PCR cuantitativa a tiempo real.**

mRNA diana	Descripción	Sentido	Antisentido
<i>Actb</i>	Beta actina	AATCGTGCGTGACATCAAAG	ATGCCACAGGATTCCATACC
<i>Nrf-2</i>	Factor nuclear eritroide-2	GTTGAGAGCTCAGTCTTCAC	CAGAGAGCTATCGAGTGACT
<i>HMOX1</i>	Hemo oxigenasa - 1	GCACAGGGTGACAGAAGAGG	ATGGCATAAAATCCCACTGC
<i>GCLC</i>	Glutamato-cisteína ligasa, subunidad catalítica	CCTCATTCCACTGTCCAAGG	GGATGAGTCCAGGAAACACG
<i>NQO1</i>	NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1	GGGATATGAATCAGGGAGAGG	TGCCCTAAACCACAGAGAGG

La acumulación de copias del molde de DNA que se produce a medida que avanzan los ciclos de PCR provoca que también se incorporen más moléculas de fluorescencia. La acumulación de esas moléculas permite determinar el número de ciclo en el que se inicia la fase exponencial de la PCR. Este ciclo inicial depende directamente de la cantidad de molde de DNA inicial que había en la muestra usada para la reacción de PCR. Cuanta más cantidad de molde haya en una muestra más bajo será el valor del ciclo inicial. El equipo usado (*Stratagene, Mx3005*) incluye la programación

informática necesaria para calcular el valor del ciclo inicial y también permite identificar la especificidad del producto amplificado mediante el análisis de las curvas de fusión. Se hace aumentar la temperatura a una velocidad lenta hasta llegar a una temperatura final de 95°C y se establece en el aparato la recogida en todo momento de la fluorescencia que emiten las moléculas *SYBR Green*. En el momento en que la temperatura de incubación coincide con la temperatura de desnaturalización del producto amplificado se producirá la separación de la doble cadena de DNA. Esta separación provoca la pérdida de emisión de fluorescencia de las moléculas *SYBR Green* y por lo tanto una caída en la cantidad de fluorescencia que recoge el aparato. Esta temperatura es específica para cada fragmento de DNA de doble cadena y permite identificar el número de productos amplificados en la reacción de PCR. La cuantificación se realizó utilizando el método  $\Delta\Delta C_t$  (*cycle threshold*, ciclo umbral).

#### **2.14. Reactivos.**

En las tablas 3, 4 y 5 están indicadas las casas comerciales en las que se obtuvieron tanto los cebadores como los anticuerpos utilizados en los tratamientos.

El DOCA se obtuvo de ICN Biomedicals Inc. (Ohio, EEUU). El resto de los reactivos se obtuvieron de Sigma (Alcobendas, Madrid, España). Todos los reactivos y productos químicos se disolvieron en agua destilada, excepto la epicatequina que se mezcló con metilcelulosa al 1% y el DOCA, que se mezclaba con etanol/aceite de sésamo (1:5, v/v).

#### **2.15. Análisis estadístico.**

Los resultados fueron expresados como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (SEM, *standard error of mean*) y *n* refleja el número de animales. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas utilizando un análisis ANOVA de una vía seguido por el test de Bonferroni's. Se consideró estadísticamente significativa una  $P < 0,05$ .



**Resultados.**

---



## **1. Efectos de los RWPs sobre la disfunción endotelial provocada por ET-1 *in vitro*.**

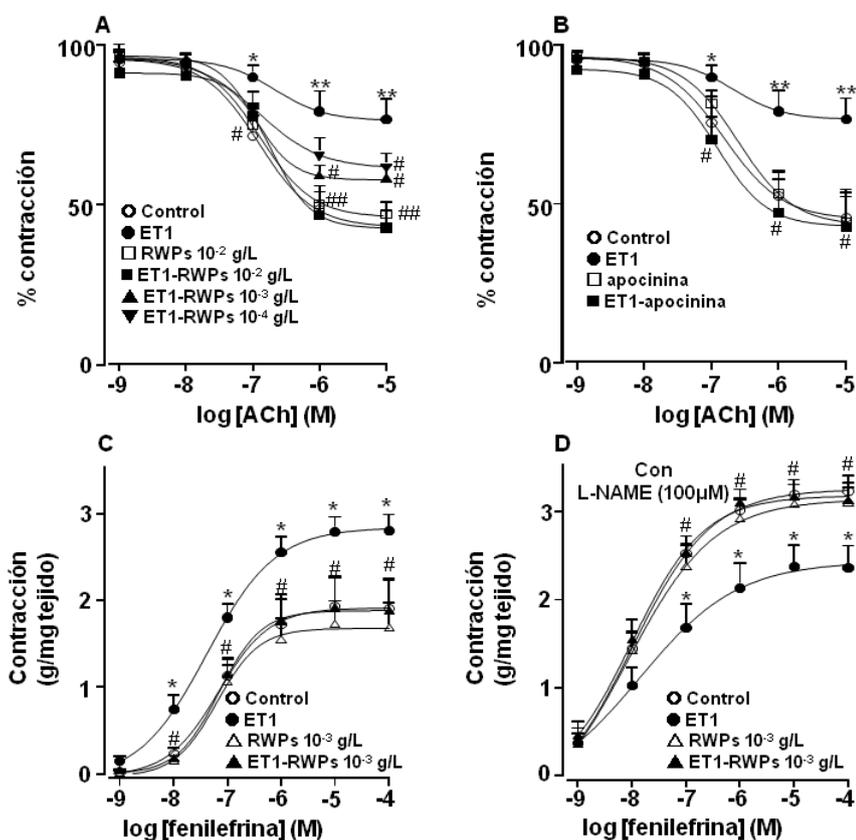
### **1.1. Efectos sobre la disfunción endotelial.**

En estudios previos observamos que la incubación de anillos aórticos en solución Krebs durante 4 horas en ausencia de ET-1 no produce cambios significativos en la respuesta contráctil a fenilefrina o en la respuesta a ACh. Sin embargo, la incubación de los anillos aórticos con ET-1 durante 4 horas induce al desarrollo de disfunción endotelial como se indica por la reducción en la respuesta relajante máxima a ACh (Fig. 12 y Tabla 6) y por el incremento en la respuesta contráctil a fenilefrina (Fig. 12 C). La co-incubación con RWPs durante 4 horas previno la disfunción endotelial inducida por ET-1 de manera concentración-dependiente (Fig. 12 A). De manera similar, el inhibidor de la NADPH oxidasa, apocinina, también restableció el empeoramiento en la respuesta relajante a ACh que induce la ET-1 (Fig. 12 B). La respuesta relajante a ACh se suprimió por el inhibidor de la NOS, L-NAME, tanto en controles como en anillos aórticos tratados con ET-1 (datos no incluidos). La respuesta contractora inducida por fenilefrina en anillos aórticos con endotelio intacto fue significativamente reducida en las aortas incubadas con ET-1 en comparación con el grupo control cuando los anillos fueron incubados previamente con L-NAME, lo que indica una disminución en la generación de NO basal en anillos tratados con ET-1. Los RWPs ( $10^{-3}$ g/L) incrementaron esta respuesta contráctil, sugiriendo una mayor actividad de la eNOS en estos vasos (Figuras 12 C y D).

Para determinar si el estiramiento de los anillos aórticos podía modificar los efectos de la ET-1 en la disfunción endotelial, en otro grupo de experimentos, los anillos se montaron en baños de órganos y se incubaron con o sin ET-1 durante 4 horas. Tras esto se eliminó la ET-1 del medio y se analizó la respuesta a ACh en anillos precontraídos con fenilefrina. En estas condiciones experimentales más fisiológicas, la incubación con

ET-1 también modificó la vasodilatación inducida por ACh en comparación con los anillos controles (Efectos máximos (%):  $35,2 \pm 4,6$  (n = 6);  $69,2 \pm 5,1$  (n = 6), respectivamente,  $P < 0,01$ ).

No se observaron diferencias en las respuestas relajantes independientes de endotelio al NPS en anillos aórticos tratados con vehículo, ET-1 y ET-1+RWP (Fig. 13).

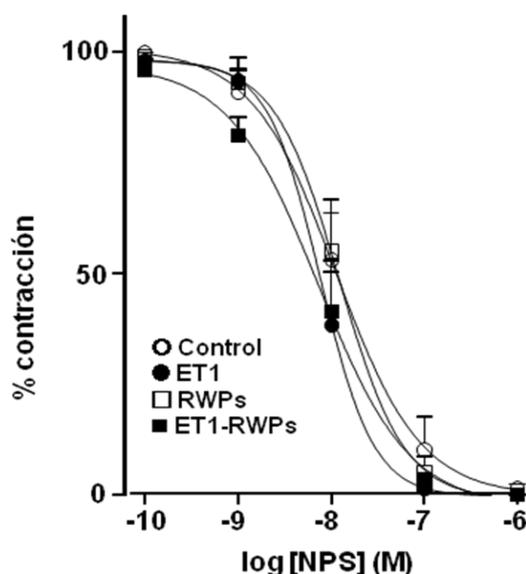


**Figura 12. Efectos de los RWPs sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1 en anillos aórticos de rata.** Los anillos se incubaron con o sin RWPs ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  g/L) (A) o con apocinina ( $10^{-4}$  M) (B) y con o sin ET-1 ( $10$  nM) durante 4 horas. Los anillos se estimularon con fenilefrina ( $10^{-6}$  M) y finalmente se indujo una relajación dependiente de endotelio mediante adición de acetilcolina (ACh) ( $0,001$ - $10$  μM). Curvas concentración-respuesta a fenilefrina en anillos aórticos en ausencia (C) o en presencia (D) de L-NAME ( $100$  μM), añadido al baño de órganos 30 minutos antes de la adición de fenilefrina. Condiciones experimentales: (○) Control, (●) ET1, (□) RWPs  $10^{-2}$  g/L, (△) RWPs  $10^{-3}$  g/L, (■) ET1-RWPs  $10^{-2}$  g/L, (▲) ET1-RWPs  $10^{-3}$  g/L, (▼) ET1-RWPs  $10^{-4}$  g/L. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM, n = 5-9. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  ET-1 vs control y # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  vs anillos tratados con ET-1.

**Tabla 6. Respuesta contráctil a fenilefrina y valores de  $pD_2$  y  $E_{max}$  para la relajación inducida por acetilcolina (ACh) en anillos aórticos incubados con ET-1 (10 nM) durante 4 horas en presencia de vehículo (DMSO 0,1%, control) o RWPs ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  g/L) o apocinina ( $10^{-4}$ M) calculados a partir de los datos de la Figura 12.**

Tratamiento	n	Contracción a fenilefrina (g)	Relajación a ACh	
			$pD_2$	$E_{max}$ (%)
Control	5	2,40 ± 0,31	6,99 ± 0,11	57,0 ± 7,6
ET-1	9	2,39 ± 0,33	7,16 ± 0,45	23,4 ± 6,5**
RWPs ( $10^{-2}$ g/L)	6	2,50 ± 0,14	6,98 ± 0,12	49,4 ± 3,0
ET-1+ RWPs ( $10^{-4}$ g/L)	6	2,38 ± 0,12	7,03 ± 0,27	40,5 ± 4,1 <sup>#</sup>
ET-1+ RWPs ( $10^{-3}$ g/L)	5	2,10 ± 0,32	6,98 ± 0,13	42,1 ± 4,3 <sup>#</sup>
ET-1+ RWPs ( $10^{-2}$ g/L)	9	2,32 ± 0,22	6,97 ± 0,05	57,2 ± 5,3 <sup>##</sup>
Apocinina	5	2,16 ± 0,32	6,85 ± 0,13	60,9 ± 9,9
ET-1+ apocinina	6	2,14 ± 0,28	7,08 ± 0,13	57,2 ± 11,8 <sup>#</sup>

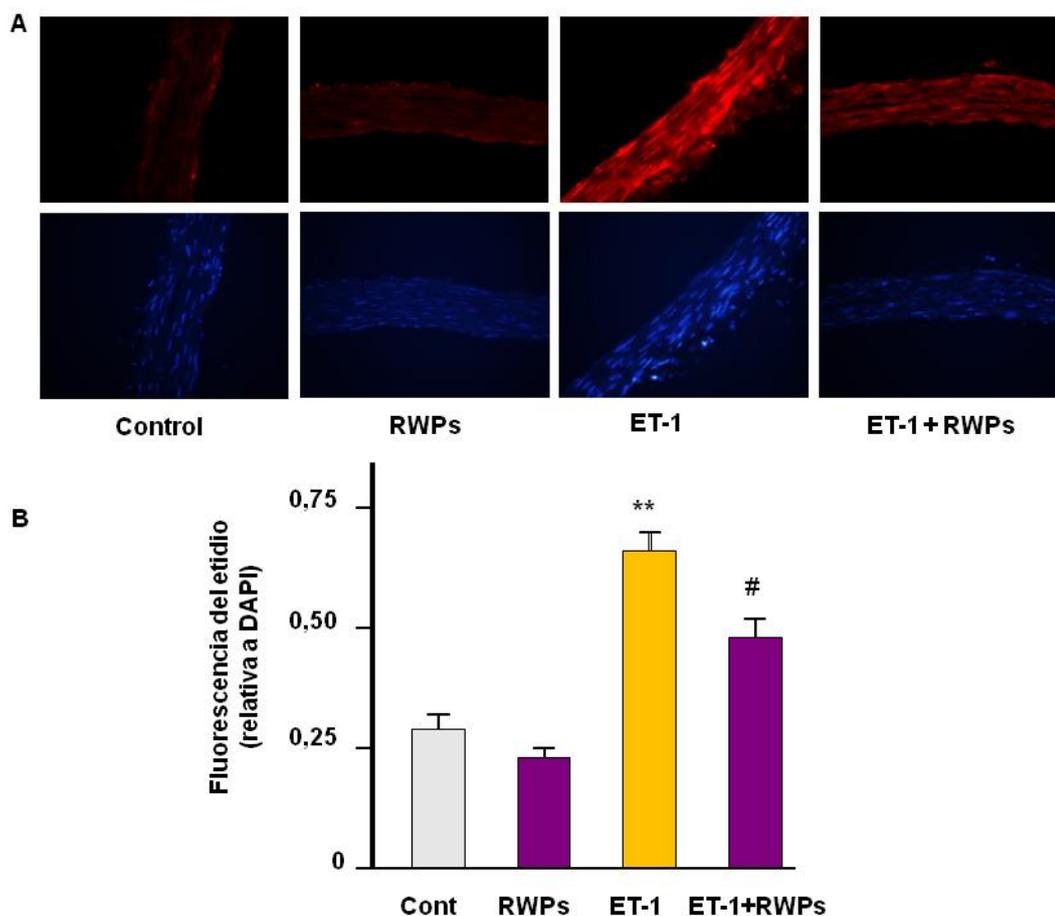
Los valores se expresan como la media ± SEM. \*\* indica  $P < 0,01$  vs control y # y ## indican  $P < 0,05$  y  $P < 0,01$ , respectivamente, vs anillos tratados con ET-1.



**Figura 13.** Efecto de los RWP sobre la relajación independiente de endotelio en anillos tratados con ET-1. Los anillos se incubaron con o sin RWP ( $10^{-2}$  g/L) y con o sin ET-1 ( $10$  nM) durante 4 horas y tras la eliminación mecánica del endotelio se montaron en un baño de órganos, se estimularon con fenilefrina ( $10^{-6}$  M) y finalmente se indujo una relajación independiente de endotelio mediante adición de nitroprusiato sódico (NPS). Condiciones experimentales: (○) Control, (●) ET1, (□) RWP  $10^{-2}$  g/L, (■) ET1-RWP  $10^{-2}$  g/L. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM,  $n = 5-6$ .

## 1.2. Efectos sobre la producción de $O_2^-$ .

Para caracterizar la producción de  $O_2^-$  y localizarla en la pared vascular, se analizó la fluorescencia roja del etidio en secciones de aorta incubadas con DHE, el cual se convierte a etidio por la oxidación inducida por  $O_2^-$ . La tinción de núcleos se vio prácticamente suprimida por el captador de  $O_2^-$  intracelular tirón. Núcleos teñidos de rojo pudieron observarse en la adventicia, la media y las células endoteliales (Fig. 14 A). Se cuantificó la fluorescencia y los datos se normalizaron respecto a la fluorescencia azul de la tinción nuclear del DAPI (Fig. 14 B). A 4 horas, la ET-1 indujo un incremento en la producción de  $O_2^-$  que resultó evidente en todas las capas del vaso. Los RWP ( $10^{-3}$  g/L) previnieron el incremento en la tinción por DHE inducido por ET-1. (Fig. 14 A y B).

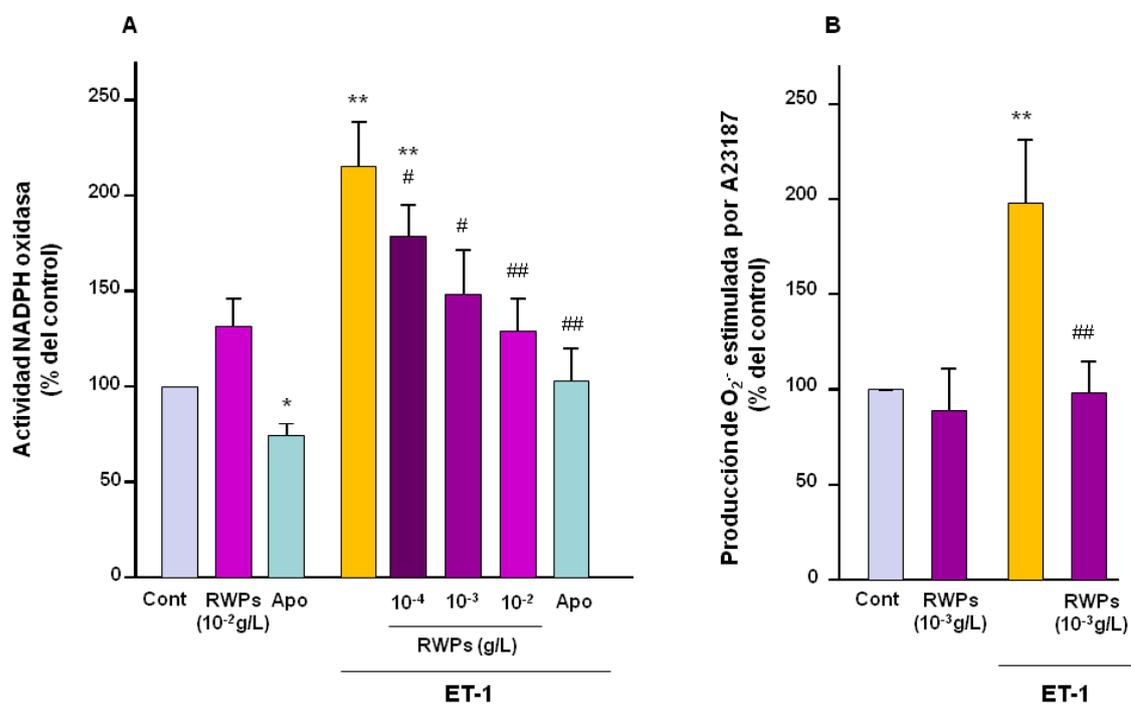


**Figura 14. Efectos de los RWPs en la producción vascular de  $O_2^-$  inducida por ET-1 medida por la fluorescencia con DHE.** Efectos de los RWPs en la producción de  $O_2^-$  en anillos incubados con o sin RWPs ( $10^{-3}$  g/L) y con o sin ET-1 (10nM) durante 4 horas. (A) Las fotografías en la parte superior muestran cortes histológicos de arterias incubadas en presencia de dihidroetidio (DHE) que produce fluorescencia roja cuando se oxida a etidio por el anión  $O_2^-$ . Las fotografías en la parte inferior muestran los mismos cortes histológicos con fluorescencia azul por el marcador nuclear dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ( $\times 40$  aumentos) (B) Valores promedio, media  $\pm$  SEM ( $n = 4$  anillos de distintas ratas), de la fluorescencia roja del etidio normalizada respecto a la fluorescencia azul del DAPI. \*\* $P < 0,01$  ET-1 vs control y # $P < 0,05$  ET-1+RWPs vs ET-1.

### **1.3. Efectos sobre la actividad NADPH oxidasa.**

El NADPH incrementa la luminiscencia de la lucigenina en anillos aórticos normales, efecto que resulta prácticamente suprimido previa incubación durante 30 minutos con el inhibidor de flavoproteínas DPI (10  $\mu$ M). La incubación con ET-1 durante 4 horas induce un incremento en la actividad NADPH oxidasa. La apocinina (100 $\mu$ M), un inhibidor intracelular específico de la NADPH oxidasa, que previene el desplazamiento de las subunidades p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> del citoplasma a la membrana y por tanto el ensamblaje de la NADPH oxidasa (Stolk *et al.*, 1994), inhibió el incremento en la actividad NADPH oxidasa inducido por ET-1. La coincubación con RWPs también previno el aumento en la actividad NADPH oxidasa inducido por la ET-1 de manera concentración-dependiente (Fig. 22).

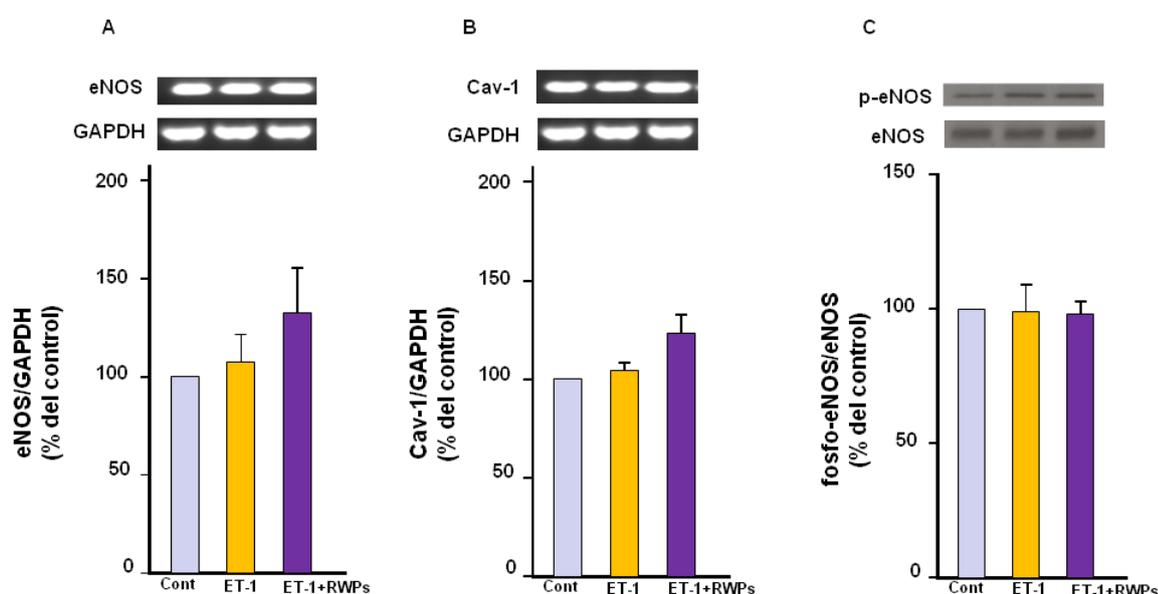
La ET-1 también incrementa la generación de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, medida por quimioluminiscencia con lucigenina, en anillos estimulados con el ionóforo de calcio A23187, como resultado del desacoplamiento de la eNOS. Este aumento en la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> fue suprimido por L-NAME (100  $\mu$ M), por la ausencia de endotelio (resultados no mostrados) y con la co-incubación con RWPs (10<sup>-3</sup> g/L) (Fig.15).



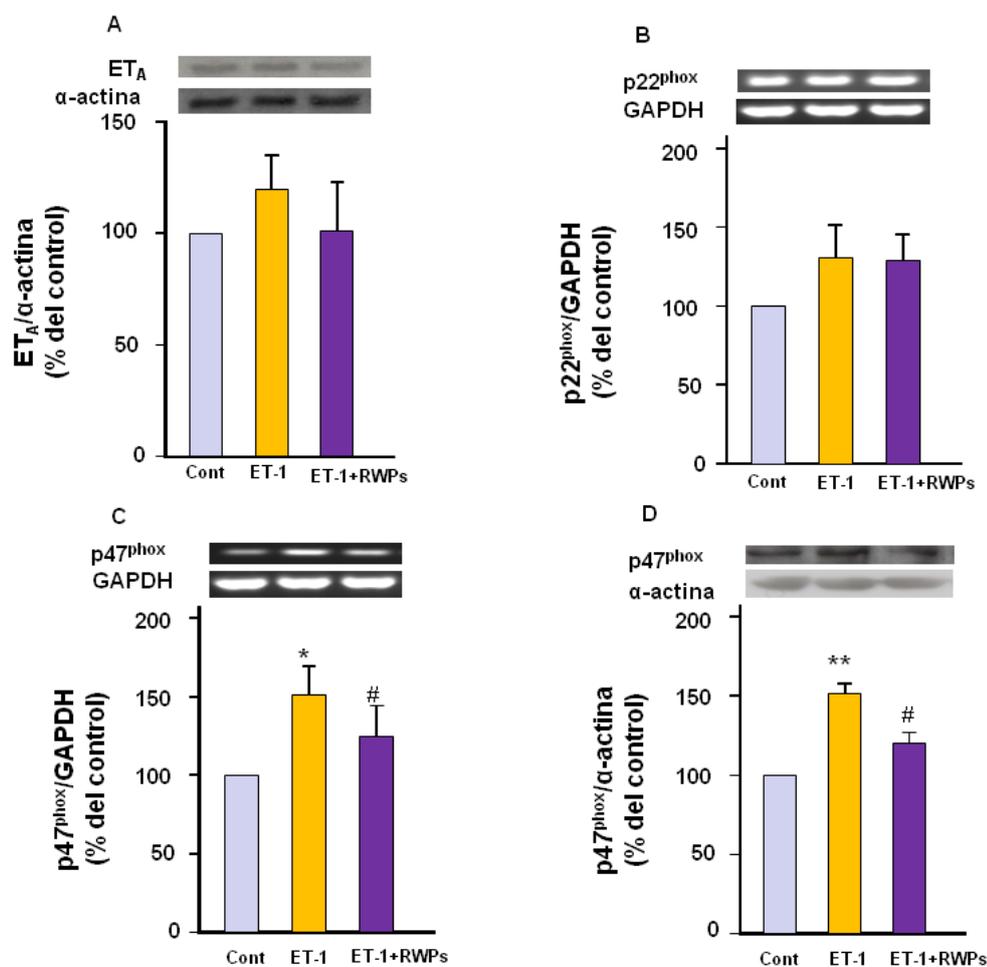
**Figura 15.** Efectos de los RWPs sobre la actividad NADPH oxidasa mediada por ET-1 y el desacoplamiento de la eNOS determinado por luminiscencia con lucigenina. Los anillos se incubaron con o sin RWPs (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup> g/L), o apocinina (Apo, 100 μM) y con o sin ET-1 (10 nM) durante 4 horas antes de su incorporación al tubo del luminómetro. (A) Actividad NADPH oxidasa estimulada por NADPH (100 μM), y (B) Producción de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) estimulada por ionóforo de calcio A23187 (10 μM). Los resultados se expresan como media ± SEM, n = 5-12. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 ET-1 vs control y #P < 0,05, ## P < 0,01 ET-1+RWPs o ET-1+apo vs ET-1.

#### 1.4. Efectos sobre la expresión génica y proteica de eNOS, caveolina-1, ET<sub>A</sub>, p47<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup>.

No se observaron diferencias entre grupos en la expresión génica tanto de eNOS como de caveolina-1 (Fig. 16 A y B), así como en la fosforilación de la eNOS (Fig. 16 C). Tampoco se observaron cambios en la expresión proteica del receptor ET<sub>A</sub> tras la incubación con ET-1 y ET-1 junto con RWPs ( $10^{-3}$  g/L) en comparación con los anillos control (Fig. 17 A). En segmentos aórticos la incubación con ET-1 durante 4 horas aumentó tanto la expresión génica como proteica de p47<sup>phox</sup> (Fig. 17 C y D) sin afectar la expresión génica de p22<sup>phox</sup> (Fig. 17 B), medida por RT-PCR. La coincubación con RWPs ( $10^{-3}$  g/L) previno el aumento en la expresión de p47<sup>phox</sup> inducido por ET-1.



**Figura 16. Efectos en la expresión génica de eNOS y caveolina, y proteica de la fosforilación de eNOS.** Expresión génica medida mediante RT-PCR de eNOS (A) y caveolina-1 (B) en la aorta, y expresión proteica determinada mediante western blot de fosfo-eNOS (p-eNOS, Ser 1117) en anillos aórticos incubados durante 4 horas con vehículo (DMSO 0,1%) o RWPs ( $10^{-3}$  g/L) en presencia o ausencia de ET-1 (10nM). Los paneles muestran bandas representativas y los histogramas representan valores densitométricos normalizados con el correspondiente producto de RT-PCR GAPDH (A y B) o con la correspondiente eNOS (C).

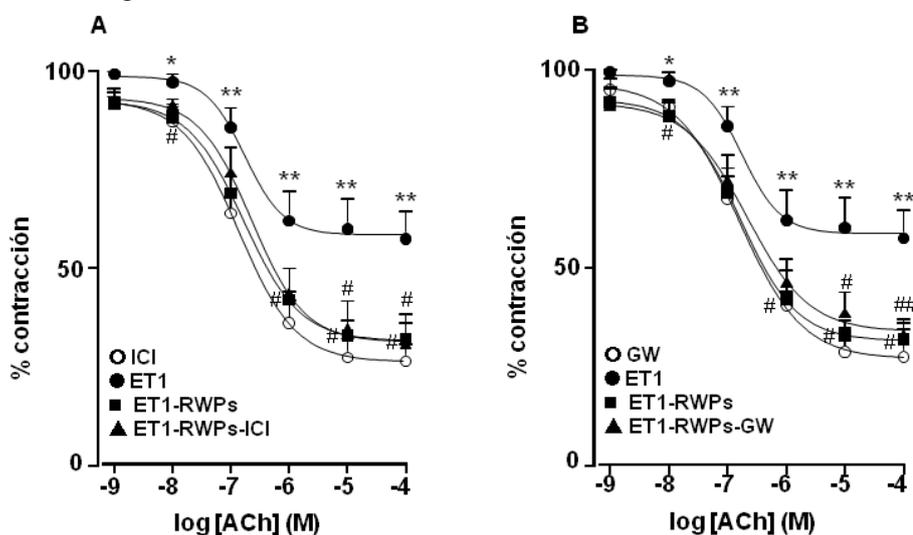


**Figura 17. Efectos de los RWPs en la expresión génica y/o proteica de ET<sub>A</sub>, p22<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup>.** Efectos de los RWPs en la expresión proteica de ET<sub>A</sub> (A) y p47<sup>phox</sup> (D) medidos por western blot, y en la expresión génica de p22<sup>phox</sup> (B) y p47<sup>phox</sup> (C) medidos por RT-PCR en anillos aórticos incubados con o sin RWPs (10<sup>-3</sup> g/L) y con o sin ET-1 (10 nM) durante 4 horas. Los paneles muestran bandas representativas y los histogramas representan valores densitométricos normalizados con el correspondiente producto de RT-PCR GAPDH (B y C) o normalizado con la correspondiente α-actina (A y D). Los resultados se expresan como media ± SEM, n = 5-6. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 vs control y #P < 0,05 vs ET-1.

### 1.5. Papel del receptor estrogénico y del receptor activado por el proliferador de peroxisoma.

Para analizar la implicación del ER $\alpha$  en la mejora que ejercen los RWPs sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1, incubamos los anillos con el antagonista no selectivo de ER, ICI-182780 (1 $\mu$ M). Este agente no modificó el efecto de los RWPs (10<sup>-2</sup> g/L) en la relajación inducida por ACh (Fig. 18 A).

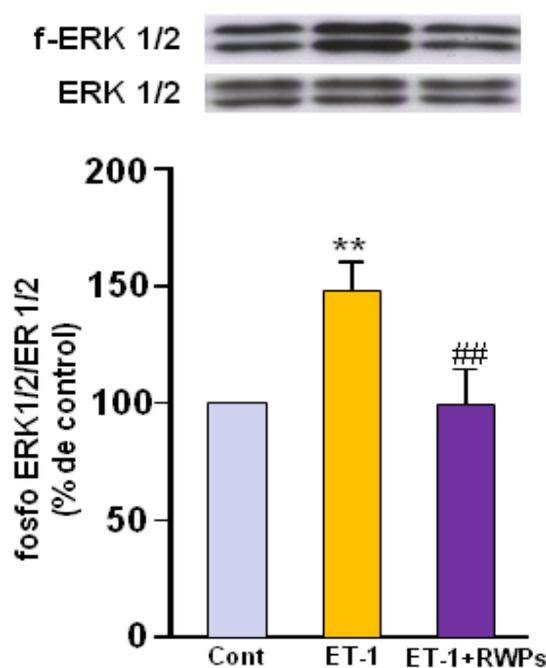
Para determinar si la activación PPAR $\gamma$  estaba implicada en el efecto protector de los RWPs, los anillos aórticos fueron coincubados con el antagonista de PPAR $\gamma$ , GW9662 (1 $\mu$ M) en la presencia de ET-1 y RWPs (10<sup>-2</sup> g/L). La mejora que ejercen los RWPs sobre el deterioro en la relajación a ACh inducido por ET-1 no se vio afectada por GW9662 (Fig. 18 B).



**Figura 18. Papel del receptor estrogénico (ER) (A) y del receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR)  $\gamma$  (B) sobre el efecto protector de los RWPs en la disfunción endotelial inducida por ET-1 en anillos aórticos de rata. Los anillos se incubaron con ET-1 (10 nM) y con RWPs (10<sup>-2</sup> g/L) en presencia o ausencia de ICI-182780 (1 $\mu$ M) (A) o de GW9662 (1 $\mu$ M) (B) durante 4 horas. Los anillos se estimularon con fenilefrina (10<sup>-6</sup> M) y finalmente se indujo una relajación dependiente de endotelio mediante adición de acetilcolina (ACh). Condiciones experimentales: (○) ICI-182780 (A) GW9662 (B), (●) ET1, (■) ET1-RWPs, (▲) ET1-RWPs-ICI-182780 (A) ET1-RWPs-GW9662 (B). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM, n = 5-6. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 ET-1vs control y #P < 0,05, ##P < 0,01 el resto de los grupos vs ET-1.**

### 1.6. Papel de las cinasas reguladas por señales extracelulares.

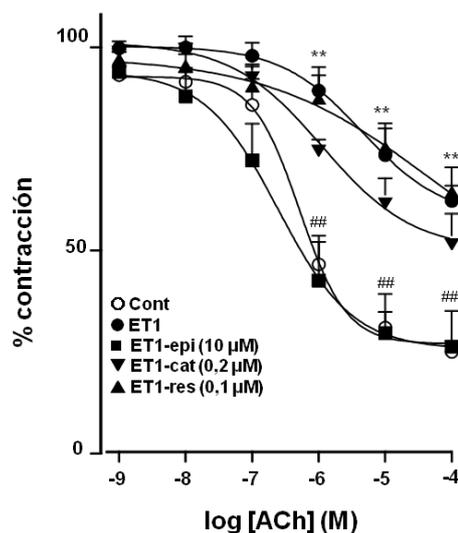
Puesto que recientemente se ha descrito la implicación ERK 1/2 en la vía de señalización del incremento en la producción de  $O_2^-$  por parte de la NADPH oxidasa (Romero et al., 2009), analizamos si los RWPs modifican el grado de fosforilación de ERK 1/2. Para ello, estudiamos el estado de fosforilación de ERK 1/2 mediante western blot en anillos aórticos incubados con ET-1 durante una hora en presencia o ausencia de RWPs. Se observa que la incubación con ET-1 induce un aumento significativo en el grado de fosforilación de ERK 1/2 con respecto a los anillos control, y que los RWPs son capaces de revertir este efecto (Fig. 19).



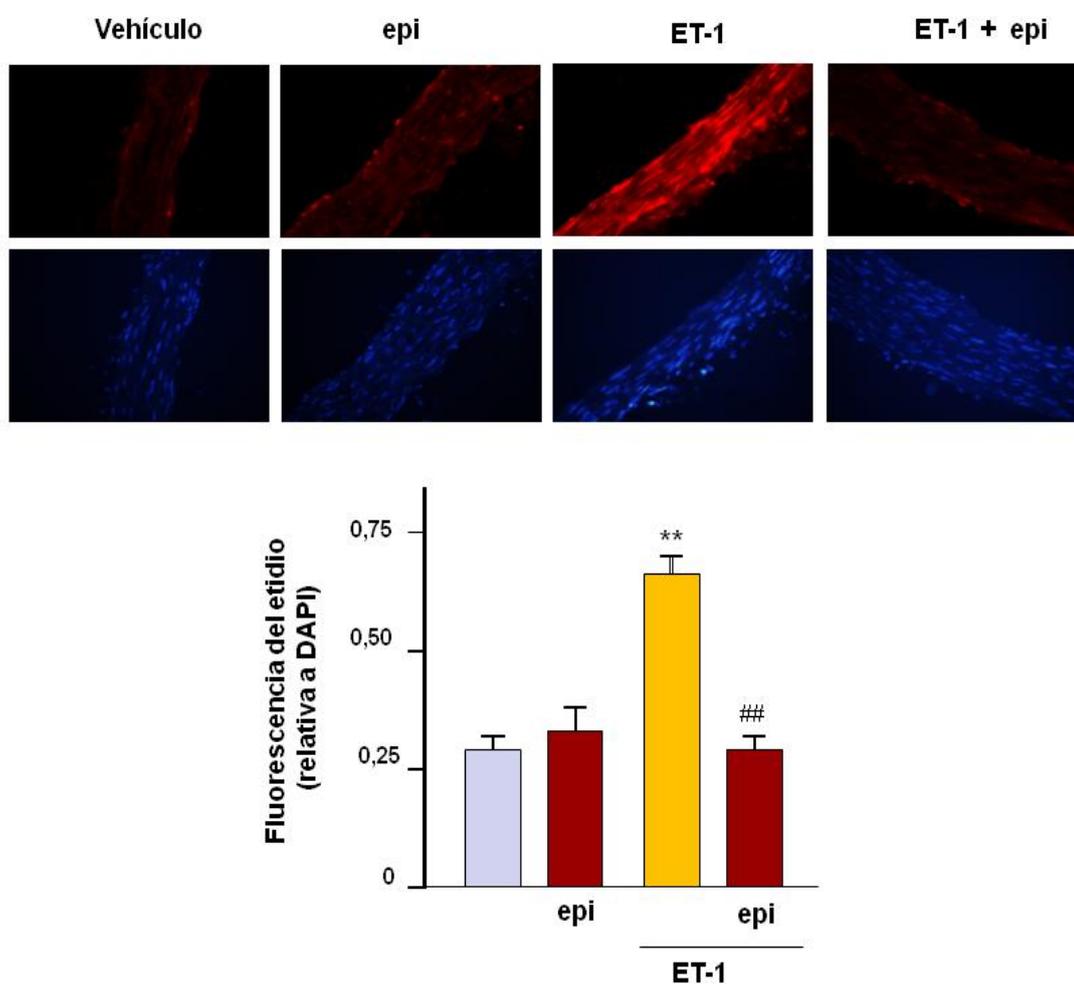
**Figura 19.** Efectos de los RWPs sobre la fosforilación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2). Los anillos se incubaron una hora con ET-1 (10nM) en presencia o ausencia de RWPs ( $10^{-3}$  g/L). Posteriormente, los homogenados fueron utilizados para realizar western blot para fosfo-ERK1/2 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,  $n = 4$ . \*\*  $P < 0,01$  vs anillos control. ##  $P < 0,01$  vs ET-1.

### 1.7. Efectos de polifenoles aislados en la funcionalidad y en cambios bioquímicos inducidos por ET-1.

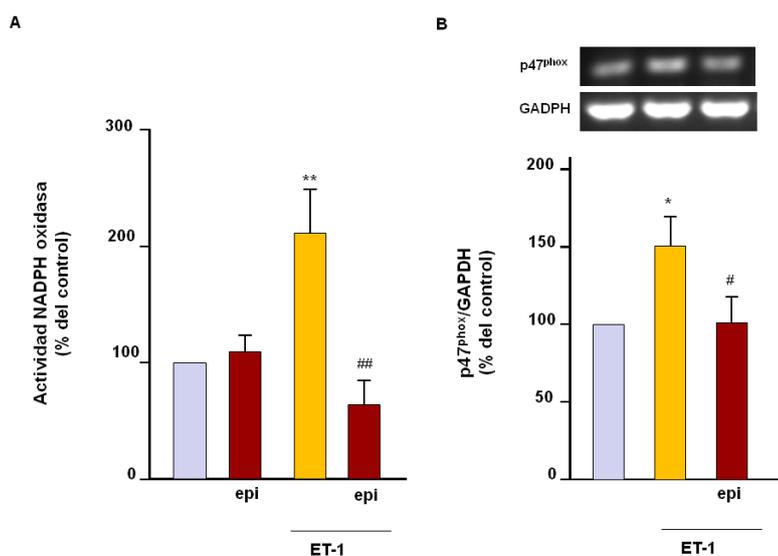
Para determinar cuál de los componentes de la mezcla polifenólica pudiera ser el responsable de la mejora en la disfunción endotelial realizamos incubaciones a 4 horas de anillos aórticos con epicatequina, catequina o resveratrol en presencia de ET-1 a las concentraciones que se encuentran en  $10^{-2}$  g/L de RWPs (epicatequina 10  $\mu$ M, catequina 0,2  $\mu$ M y resveratrol 0,1  $\mu$ M). En estas condiciones sólo la epicatequina mejoró la relajación inducida por ACh en anillos precontraídos con fenilefrina (Fig. 20). Además, la epicatequina 10 $\mu$ M previno el incremento en la producción de  $O_2^-$  (Fig. 21), la actividad NADPH oxidasa (Fig. 22 A), la sobreexpresión de p47phox (Fig. 22 B) y la fosforilación de ERK 1/2 (Fig. 23) inducidos por ET-1 en anillos de aorta.



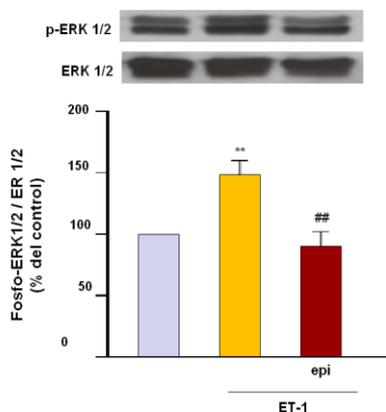
**Figura 20.** Efectos de los polifenoles aislados (a las concentraciones en las que se encuentran en  $10^{-2}$  g/L de RWPs) en la disfunción endotelial inducida por ET-1. Anillos aórticos con el endotelio intacto fueron incubados durante 4 horas con vehículo (DMSO 0,1%) o ET-1 (10nM) o ET-1 más catequina (0,2 $\mu$ M) o epicatequina (10 $\mu$ M) o resveratrol (0,1  $\mu$ M). Posteriormente fueron estimulados con fenilefrina ( $10^{-6}$  M) y finalmente se indujo una relajación dependiente de endotelio mediante adición de acetilcolina (ACh). Condiciones experimentales: (O) Control, (●) ET-1, (■) ET-1+epicatequina 10 $\mu$ M, (▼) ET-1+catequina 0,2 $\mu$ M, (▲) ET-1+resveratrol 0,1 $\mu$ M. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM, n = 5-7. \*\*P < 0,01 ET-1 vs control y ###P < 0,01 vs ET-1.



**Figura 21. Efectos de la epicatequina en la producción vascular de  $O_2^-$  inducida por ET-1 medida por la fluorescencia con DHE.** Efectos de la epicatequina en la producción de  $O_2^-$  en anillos incubados con o sin epicatequina ( $10\mu M$ ) y con o sin ET-1 ( $10\text{ nM}$ ) durante 4 horas. Las fotografías en la parte superior muestran cortes histológicos de arterias incubadas en presencia de dihidroetidio (DHE) que produce fluorescencia roja cuando se oxida a etidio por el anión  $O_2^-$ . Las fotografías en la parte inferior muestran los mismos cortes histológicos con fluorescencia azul por el marcador nuclear dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ( $\times 40$  aumentos). Valores promedio, media  $\pm$  SEM ( $n = 4$  anillos de distintas ratas), de la fluorescencia roja del etidio normalizada respecto a la fluorescencia azul del DAPI. \*\* $P < 0,01$  ET-1 vs control y ##  $P < 0,01$  ET-1+epi vs ET-1.



**Figura 22.** Efectos de la epicatequina sobre la actividad NADPH determinada por luminiscencia con lucigenina y sobre la expresión génica de p47<sup>phox</sup>. Los anillos se incubaron con o sin epicatequina (epi) (10 μM) y con o sin ET-1 (10 nM) durante 4 horas. (A) Actividad NADPH oxidasa estimulada por NADPH (100 μM), y (B) expresión génica de p47<sup>phox</sup> medida por RT-PCR. Los resultados se expresan como media ± SEM, n = 5-10. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 ET-1 vs control y #P < 0,05, ## P < 0,01 vs ET-1.

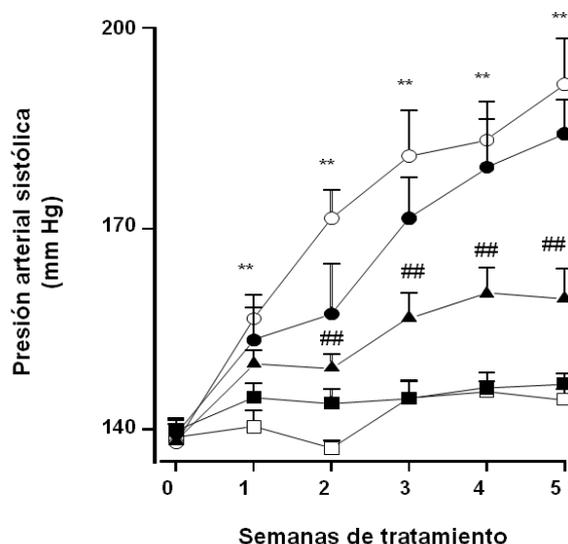


**Figura 23.** Efectos de la epicatequina sobre la fosforilación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2). Los anillos se incubaron una hora con y sin ET-1 (10 nM) en presencia o ausencia de epicatequina (epi) (10 μM). Posteriormente, los homogenados fueron utilizados para realizar western blot para fosfo-ERK1/2 (p-ERK 1/2) y ERK1/2. Los resultados se expresaron como la media aritmética ± 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 = 6. \*\*P < 0,01 vs anillos control. ##P < 0,01 vs anillos incubados con ET-1.

## 2. Efectos de la epicatequina sobre la hipertensión DOCA-sal.

### 2.1. Efectos sobre la presión arterial.

Las ratas que recibieron el tratamiento DOCA-sal mostraron un aumento progresivo en la presión arterial sistólica (PAS) en comparación con el grupo control (Fig. 24). Este incremento fue significativo ( $P < 0,05$ ) desde la primera semana, alcanzando una diferencia de aproximadamente 47 mmHg al final del tratamiento. El tratamiento crónico con epicatequina  $2 \text{ mg Kg}^{-1}$  no modificó este incremento de la PAS. Sin embargo, epicatequina a la dosis de  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  previno ( $P < 0,01$ ) el incremento de la PAS (aproximadamente en un 70%) en las ratas con el tratamiento DOCA-sal desde la segunda semana, sin ejercer efecto alguno en las ratas control. No se observaron cambios en la frecuencia cardíaca en ninguno de los grupos.



**Figura 24.** Efectos del tratamiento crónico con epicatequina sobre la evolución en el tiempo de la presión arterial sistólica (PAS), medida por pletismografía en la cola. Grupos experimentales: control (□) ( $n = 10$ ), DOCA (○) ( $n = 9$ ), epicatequina  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  (■) ( $n = 10$ ), DOCA-epicatequina  $2 \text{ mg Kg}^{-1}$  (●) ( $n = 10$ ), y DOCA-epicatequina  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  (▲) ( $n = 9$ ). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0,01$  comparado con el grupo control. ##  $P < 0,01$  comparado con el grupo DOCA.

## 2.2. Efectos sobre las variables morfológicas y la proteinuria.

Los valores de peso corporal, los índices cardíaco y renal y la proteinuria se muestran en la Tabla 7. Al final del tratamiento las ratas DOCA-sal mostraron un incremento significativo del índice de peso cardíaco ( $\approx 38\%$ ), del ventrículo izquierdo ( $\approx 49\%$ ) y renal ( $\approx 93\%$ ), comparado con las ratas control. No se observaron modificaciones de estos parámetros en las ratas que recibieron tratamiento DOCA-sal junto con epicatequina a ambas dosis. Sin embargo, el tratamiento con epicatequina a la mayor dosis redujo la marcada proteinuria detectada en las ratas DOCA-sal.

Tabla 7. Peso corporal y de órganos. Índices cardíaco y renal. Proteinuria.

Grupos	PC (g)	PCo (mg)	PVI (mg)	PR (mg)
Control (n = 10)	281 ± 8	760 ± 15	539 ± 13	785 ± 26
EPI 10 (n = 10)	280 ± 9	732 ± 19	521 ± 13	731 ± 13
DOCA (n = 9)	260 ± 6*	972 ± 34**	744 ± 31**	1404 ± 46**
DOCA-EPI 2 (n = 10)	260 ± 6*	916 ± 24**	683 ± 17**	1396 ± 33**
DOCA-EPI 10 (n = 9)	253 ± 8**	917 ± 11**	676 ± 15**	1291 ± 56**

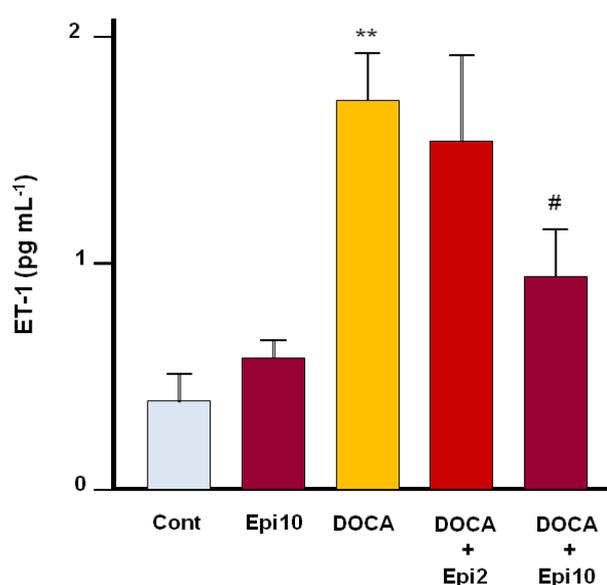
  

Grupos	PCo/PC Ratio	PVI/PC Ratio	PR/PC Ratio	Proteinuria (mg/100g/24h)
Control (n = 10)	2,71 ± 0,04	1,92 ± 0,04	2,80 ± 0,08	44,1 ± 11,6
EPI 10 (n = 10)	2,62 ± 0,05	1,87 ± 0,04	2,62 ± 0,07	55,3 ± 6,8
DOCA (n = 9)	3,74 ± 0,10**	2,86 ± 0,099**	5,40 ± 0,15**	103,3 ± 21,9*
DOCA-EPI 2 (n = 10)	3,54 ± 0,15**	2,64 ± 0,10**	5,39 ± 0,20**	97,7 ± 21,1*
DOCA-EPI 10 (n = 9)	3,65 ± 0,12**	2,69 ± 0,13**	5,12 ± 0,20**	41,1 ± 12,4#

PC, peso corporal; PCo, peso corazón; PVI, peso ventrículo izquierdo; PR, peso riñón. La proteinuria se expresó como miligramos de proteína excretados por 100 g de rata durante 24 horas. Valores expresados como la media ± SEM. \*P < 0,05 y \*\*P < 0,01 comparado con el grupo control. #P < 0,05 comparado con el grupo DOCA-sal.

### 2.3. Efectos sobre los niveles plasmáticos de ET-1.

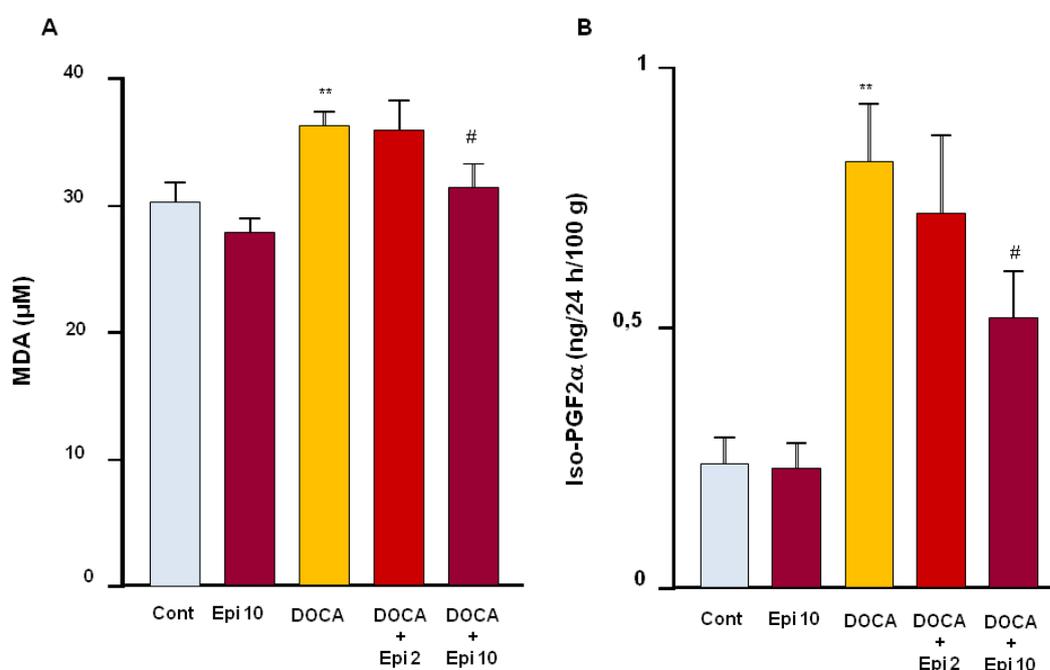
Los niveles de ET-1 en plasma fueron significativamente mayores en las ratas con el tratamiento DOCA-sal que en las ratas control. El tratamiento crónico de las ratas DOCA-sal con epicatequina a la dosis de  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  redujo los niveles de ET-1 de una manera significativa. La epicatequina  $2 \text{ mg Kg}^{-1}$ , sin embargo, no previno la acumulación plasmática de ET-1 en los animales DOCA-sal (Fig. 25).



**Figura 25.** Niveles plasmáticos de ET-1 de todos los grupos experimentales. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 9-10$ ). Grupos experimentales: control (Cont,  $n = 10$ ), epicatequina  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  (Epi10,  $n = 10$ ), DOCA-sal (DOCA,  $n = 9$ ), DOCA-epicatequina  $2 \text{ mg Kg}^{-1}$  (DOCA+Epi2,  $n = 10$ ), y DOCA-epicatequina  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  (DOCA+Epi10,  $n = 9$ ). \*\* $P < 0,01$  comparado con el grupo control. #  $P < 0,05$  comparado con el grupo DOCA.

## 2.4. Efectos sobre el estrés oxidativo sistémico.

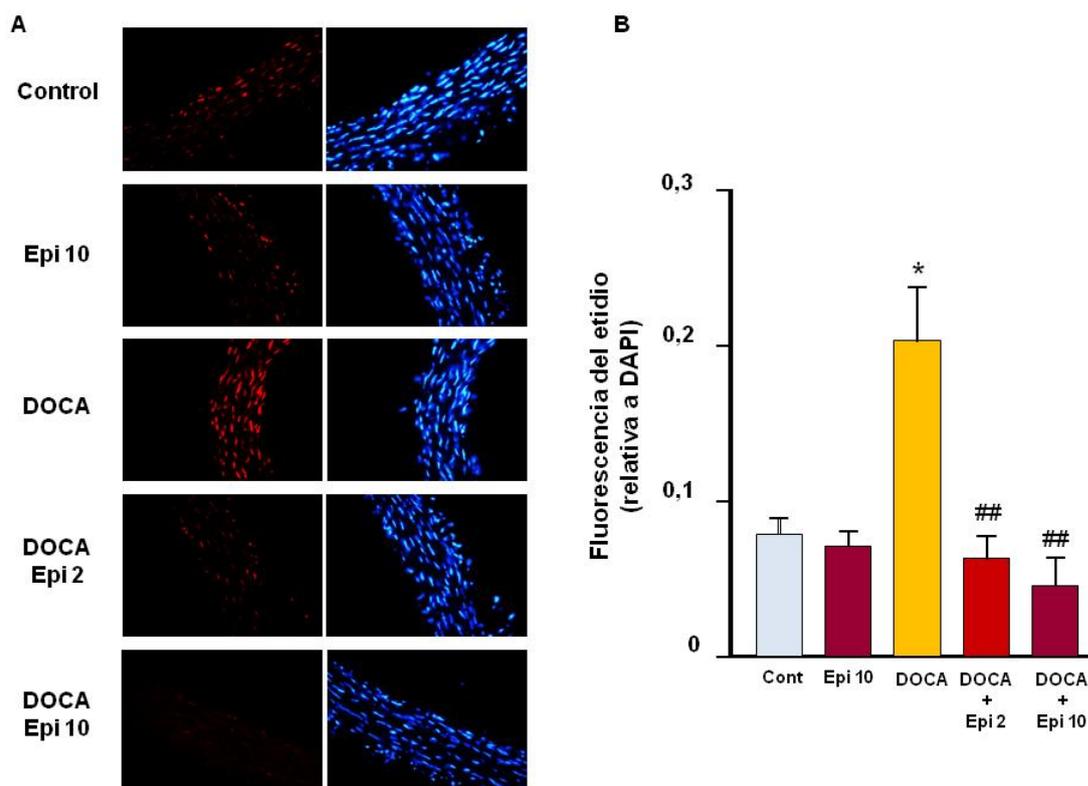
Los niveles plasmáticos de MDA, un marcador de peroxidación lipídica producido por ROS, de los animales con el tratamiento DOCA-sal se incrementaron con respecto al grupo control. En el grupo DOCA-sal tratado con epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup>, la concentración de MDA se vio reducida de manera significativa (Fig. 26 A). La excreción urinaria en 24h de iso-PGF<sub>2α</sub>, un marcador más específico de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, también estaba incrementado en el grupo DOCA-sal. En el grupo DOCA-sal con epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup>, la excreción de iso-PGF<sub>2α</sub> fue significativamente reducida (Fig. 26 B). En el grupo DOCA-sal tratado de manera crónica con epicatequina 2 mg Kg<sup>-1</sup>, ni los valores en plasma de MDA ni la excreción urinaria de iso-PGF<sub>2α</sub> se vieron alterados con respecto al grupo DOCA-sal.



**Figura 26.** Niveles plasmáticos de MDA (A) y excreción urinaria de iso-PGF<sub>2α</sub> en 24 horas (B) de todos los grupos experimentales. Valores expresados como la media ± SEM (n = 9-10). Grupos experimentales: control (Cont, n = 10), epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> (Epi10, n = 10), DOCA-sal (DOCA, n = 9), DOCA-epicatequina 2 mg Kg<sup>-1</sup> (DOCA+Epi2, n = 10), y DOCA-epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> (DOCA+Epi10, n = 9). \*\*P < 0,01 comparado con el grupo control. #P < 0,05 comparado con el grupo DOCA.

### **2.5. Efectos sobre la producción vascular *in situ* de $O_2^-$ .**

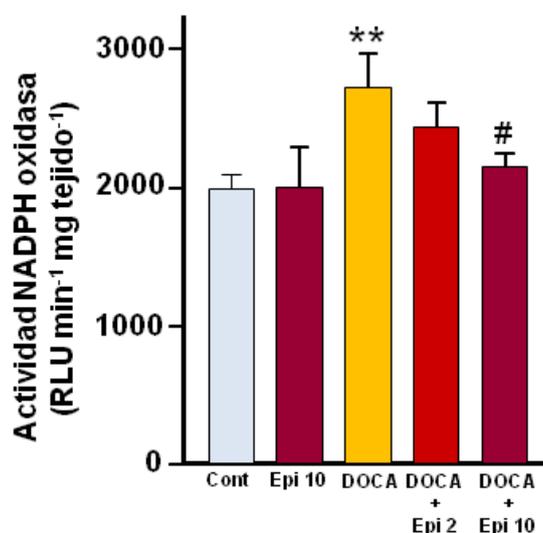
Para caracterizar y localizar la producción de  $O_2^-$  en la pared vascular, la fluorescencia roja del etidio se analizó en cortes histológicos de aorta incubados con DHE. Se sabe que el DHE se oxida por la acción del  $O_2^-$  que produce etidio que tiñe el DNA. La producción de  $O_2^-$  tiene lugar en toda la pared vascular (adventicia, media y células endoteliales) (Fig. 27 A). La fluorescencia del etidio se cuantificó y los resultados se normalizaron con la fluorescencia azul del marcador nuclear DAPI. (Fig. 27 B). La fluorescencia roja fue suprimida casi totalmente cuando las secciones se incubaron durante 30 minutos con tirón (10mM), un captador intracelular de  $O_2^-$  (datos no mostrados). Los anillos de las ratas DOCA-sal mostraron mayor fluorescencia en toda la pared vascular comparados con las ratas control. El tratamiento crónico con ambas dosis de epicatequina previno el incremento en la fluorescencia roja a etidio incrementada en el grupo DOCA-sal hasta valores similares a los del grupo control.



**Figura 27. Localización in situ de la producción de  $O_2^-$  en anillos aórticos de todos los grupos experimentales.** (A) Las fotografías en la parte izquierda muestran cortes histológicos de arterias incubadas en presencia de dihidroetidio (DHE) que produce fluorescencia roja cuando se oxida a etidio por el anión  $O_2^-$ . Las fotografías de la derecha muestran los mismos cortes histológicos con fluorescencia azul por el marcador nuclear dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ( $\times 40$  aumentos). (B) Valores promedio, media  $\pm$  SEM ( $n = 5-6$ , de anillos de diferentes ratas), de la fluorescencia roja del etidio normalizada respecto a la fluorescencia azul del DAPI. Grupos experimentales: control (Cont), epicatequina 10 mg  $Kg^{-1}$  (Epi10), DOCA-sal (DOCA), DOCA-epicatequina 2 mg  $Kg^{-1}$ (DOCA+Epi2), y DOCA-epicatequina 10 mg  $Kg^{-1}$ (DOCA+Epi10). \* $P < 0,05$  comparado con el grupo control. # # $P < 0,01$  comparado con el grupo DOCA.

## 2.6. Efectos sobre la actividad NADPH oxidasa.

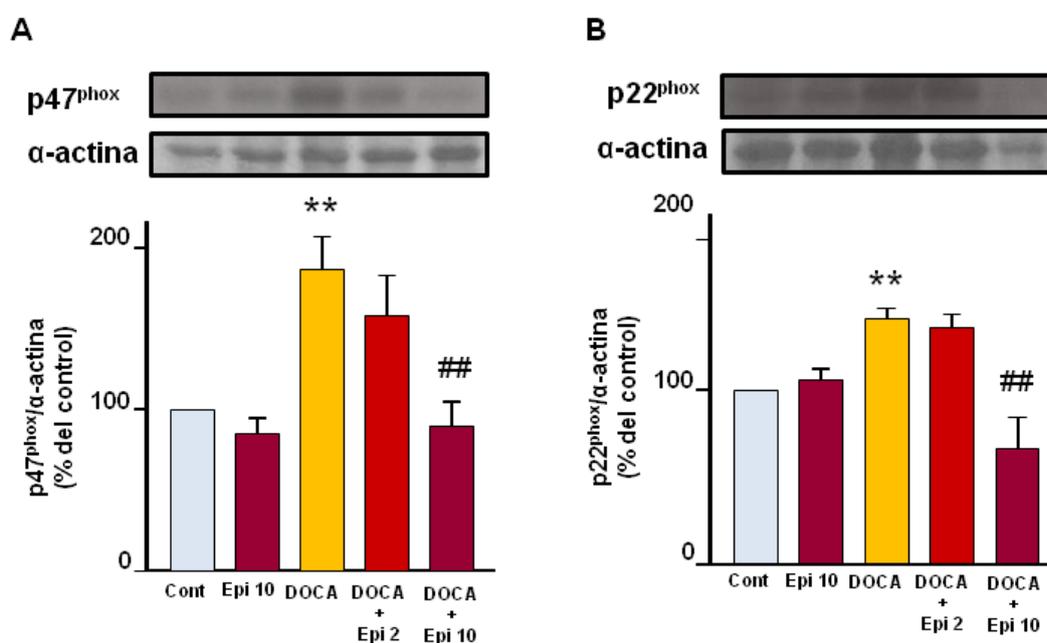
El NADPH incrementa la quimioluminiscencia con lucigenina en anillos aórticos normales, lo que fue prácticamente suprimido por incubación previa de 30 minutos con el inhibidor de flavoproteínas DPI (10  $\mu\text{M}$ ) o con el inhibidor selectivo de la NADPH oxidasa, apocinina (100  $\mu\text{M}$ , datos no mostrados), lo que demuestra que el NADPH externo aumenta la actividad NADPH oxidasa en el tejido vascular. La actividad NADPH oxidasa se vio incrementada en anillos aórticos de ratas DOCA-sal, comparado con las ratas control. El tratamiento crónico con epicatequina 10  $\text{mg Kg}^{-1}$  redujo significativamente dicha actividad sólo en los animales con tratamiento DOCA-sal, no teniendo efecto en animales control (Fig. 28).



**Figura 28.** Actividad NADPH oxidasa medida por luminiscencia con lucigenina. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 9-10$ ). En anillos aórticos de todos los grupos experimentales: control (Cont,  $n = 10$ ), epicatequina 10  $\text{mg Kg}^{-1}$  (Epi10,  $n = 10$ ), DOCA-sal (DOCA,  $n = 9$ ), DOCA-epicatequina 2  $\text{mg Kg}^{-1}$  (DOCA+Epi2,  $n = 10$ ), y DOCA-epicatequina 10  $\text{mg Kg}^{-1}$  (DOCA+Epi10,  $n = 9$ ). \*\* $P < 0,01$  comparado con el grupo control. # $P < 0,05$  comparado con el grupo DOCA.

## 2.7. Efectos sobre la expresión proteica de subunidades de la NADPH oxidasa.

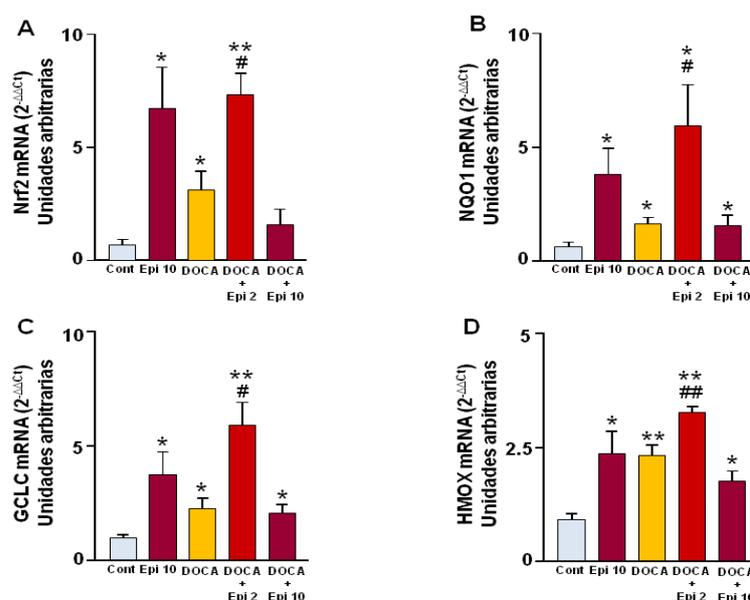
En tejido aórtico de ratas DOCA-sal hubo una mayor expresión proteica de  $p22^{\text{phox}}$  y de  $p47^{\text{phox}}$  comparado con las ratas control (Fig. 29). El tratamiento con epicatequina 10 mg  $\text{Kg}^{-1}$  fue capaz de inhibir ambos incrementos en la expresión proteica de las ratas DOCA-sal, sin producir efecto alguno en las ratas control. Sin embargo, el tratamiento con epicatequina a la dosis de 2 mg  $\text{Kg}^{-1}$  en ratas hipertensas fue incapaz de alterar ninguna de las expresiones proteicas de manera significativa.



**Figura 29.** Expresión vascular proteica de subunidades de la NADPH oxidasa,  $p47^{\text{phox}}$  (A) y  $p22^{\text{phox}}$  (B) en anillos aórticos de todos los grupos experimentales. Los histogramas representan valores densitométricos respecto a la  $\alpha$ -actina ( $n = 6$ ). Grupos experimentales: control (Cont), epicatequina 10 mg  $\text{Kg}^{-1}$  (Epi10), DOCA-sal (DOCA), DOCA-epicatequina 2 mg  $\text{Kg}^{-1}$  (DOCA+Epi2), y DOCA-epicatequina 10 mg  $\text{Kg}^{-1}$  (DOCA+Epi10). \*\* $P < 0,01$  comparado con el grupo control. ## $P < 0,01$  comparado con el grupo DOCA.

## 2.8. Efectos sobre la expresión génica de Nrf2 y genes controlados por Nrf2/ARE.

En los experimentos realizados encontramos que las ratas DOCA-sal presentaban un incremento en el mRNA de Nrf2 (Fig. 30 A) y de genes controlados por este factor de transcripción tales como NQO1 (Fig. 30 B), GCLC (Fig. 30 C) y HMOX (Fig. 30 D), en comparación al grupo control. El tratamiento crónico con epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> incrementó los genes controlados tanto por Nrf2 como por el complejo Nrf2/ARE en comparación con el grupo control. En ratas DOCA-sal tratadas con epicatequina 2 mg Kg<sup>-1</sup> también se incrementó de manera significativa la vía de Nrf2 en comparación con las ratas control tratadas sólo con vehículo. Sin embargo, en las ratas DOCA-sal tratadas con epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> la expresión de genes de Nrf2 fue similar a la encontrada en el grupo DOCA-sal.

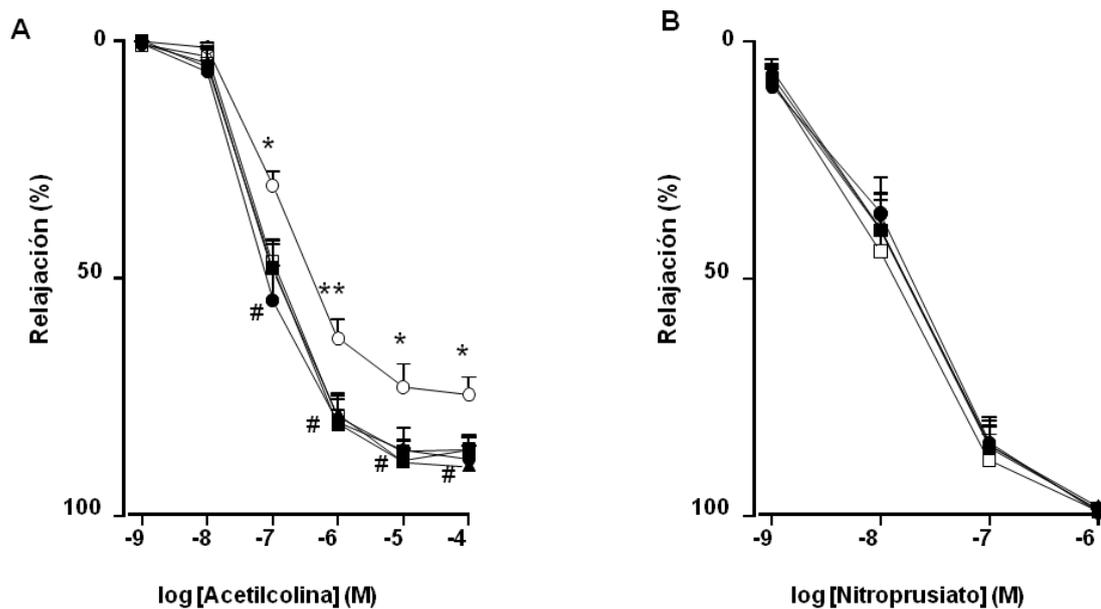


**Figura 30.** Vía Nrf2/ARE. Expresión de mRNA de Nrf2 (A), NQO1 (B), GCLC (C) y HMOX-1(D) en anillos aórticos de todos los grupos experimentales. Datos expresados como unidades arbitrarias del ratio de mRNA ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ). Valores expresados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 9-10$ ). Grupos experimentales: control (Cont,  $n = 10$ ), epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup>(Epi10,  $n = 10$ ), DOCA-sal (DOCA,  $n = 9$ ), DOCA-epicatequina 2 mg Kg<sup>-1</sup>(DOCA+Epi2,  $n = 10$ ), y DOCA-epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup>(DOCA+Epi10,  $n = 9$ ). \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$  comparado con el grupo control. # $P < 0,05$  y ## $P < 0,01$  comparado con el grupo DOCA.

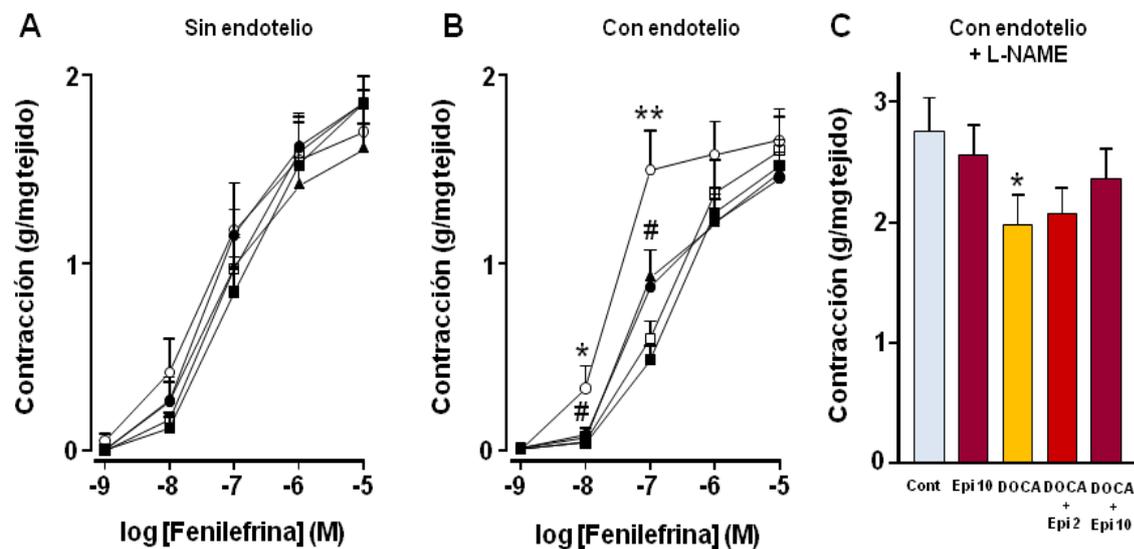
### **.2.9. Efectos sobre la función endotelial *ex vivo*.**

Anillos aórticos de animales tratados con DOCA-sal mostraron una fuerte reducción de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio a ACh en arterias estimuladas con fenilefrina en comparación con los anillos control (Fig. 31 A). Los anillos aórticos obtenidos de ratas DOCA-sal tratadas con ambas dosis de epicatequina (Fig. 31 B) restituyeron la vasodilatación inducida por ACh. No se observaron efectos significativos en los anillos de las ratas control tratadas con epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup>. Tampoco se observaron diferencias entre grupos en la respuesta vasodilatadora independiente de endotelio al donador de NO, NPS, en arterias precontraídas con fenilefrina. (Fig. 31 C y D).

No se encontraron diferencias entre los diferentes grupos en la respuesta contracción-concentración inducida por fenilefrina en anillos aórticos sin endotelio (Fig. 31 A). Sin embargo, en anillos con el endotelio intacto la respuesta vasoconstrictora a fenilefrina estaba incrementada en el grupo DOCA-sal en comparación con el grupo control (Fig. 32 B). El tratamiento crónico con ambas dosis de epicatequina redujo significativamente el incremento de la respuesta contráctil a fenilefrina en aortas con endotelio. No obstante, la vasoconstricción inducida por fenilefrina (10<sup>-6</sup> M) estaba significativamente reducida en las aortas del grupo DOCA-sal en comparación con el grupo control (Fig. 32 C) cuando los anillos fueron incubados previamente con el inhibidor de la NOS, L-NAME, lo que indica una reducción en la síntesis basal de NO en las ratas DOCA-sal. En ratas DOCA-sal tratadas con epicatequina no se observó ninguna modificación significativa en esta respuesta contráctil, lo que sugiere una mayor formación de NO en estos vasos en comparación con ratas DOCA-sal control.



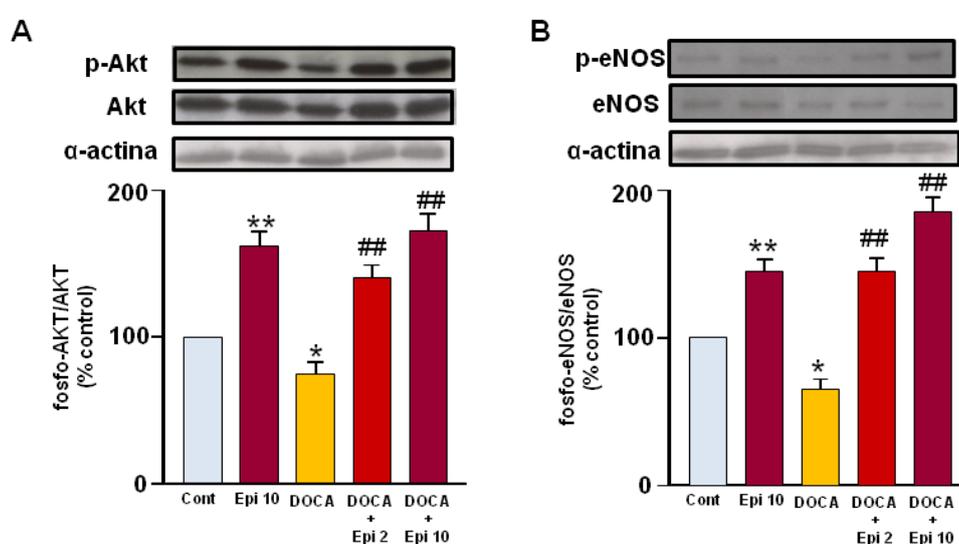
**Figura 31. Efectos en la respuesta relajante.** Respuestas relajantes inducidas por acetilcolina (A), y por nitroprusiato sódico (B) en aortas con o sin endotelio respectivamente, en anillos aórticos de todos los grupos experimentales. Las respuestas relajantes se analizaron en arterias previamente contraídas con fenilefrina ( $10^{-6}$  M). Valores expresados como la media  $\pm$  SEM. ( $n = 9 - 10$ ). Grupos experimentales: control ( $\square$ ) ( $n = 10$ ), DOCA ( $\circ$ ) ( $n = 9$ ), epicatequina  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  ( $\blacksquare$ ) ( $n = 10$ ), DOCA-epicatequina  $2 \text{ mg Kg}^{-1}$  ( $\bullet$ ) ( $n = 10$ ), y DOCA-epicatequina  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  ( $\blacktriangle$ ) ( $n = 9$ ). \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$  comparado con el grupo control. #  $P < 0,05$  comparado con el grupo DOCA.



**Figura 32. Efectos en la respuesta contráctil.** Respuestas contráctiles inducidas por fenilefrina en anillos aórticos sin (A) y con (B) endotelio, y con endotelio más L-NAME  $10^{-4}M$  (C) en anillos aórticos de todos los grupos experimentales. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM. ( $n = 9-10$ ). Grupos experimentales: control ( $\square$ ) ( $n = 10$ ), DOCA ( $\circ$ ) ( $n = 9$ ), epicatequina  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  ( $\blacksquare$ ) ( $n = 10$ ), DOCA-epicatequina  $2 \text{ mg Kg}^{-1}$  ( $\bullet$ ) ( $n = 10$ ), y DOCA-epicatequina  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  ( $\blacktriangle$ ) ( $n = 9$ ).  $*P < 0,05$  y  $**P < 0,01$  comparado con el grupo control. #  $P < 0,05$  comparado con el grupo DOCA.

## 2.10. Efectos sobre la vía vascular AKT/eNOS.

Aortas de animales tratados con DOCA-sal exhibieron una disminución en los niveles de fosforilación de AKT<sup>Ser473</sup> (Fig. 33 A) y de eNOS<sup>Ser-1177</sup> (Fig. 33 B) con respecto a los grupos control, sin cambios en los niveles totales de AKT o eNOS. Las ratas control tratadas crónicamente con epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> mostraron un incremento en los niveles de fosforilación tanto de AKT como de eNOS en comparación con las ratas control. La expresión proteica de fosfo-AKT y de fosfo-eNOS fue restituida por el tratamiento con epicatequina a ambas dosis en ratas DOCA-sal.



**Figura 33. Efectos de la epicatequina en la vía AKT/eNOS.** Los paneles (A y B) muestran bandas representativas y los histogramas representan valores densitométricos de fosfo-AKT y fosfo-eNOS relativos a los niveles de proteína total de AKT y eNOS, respectivamente, en anillos aórticos de todos los grupos experimentales. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM.

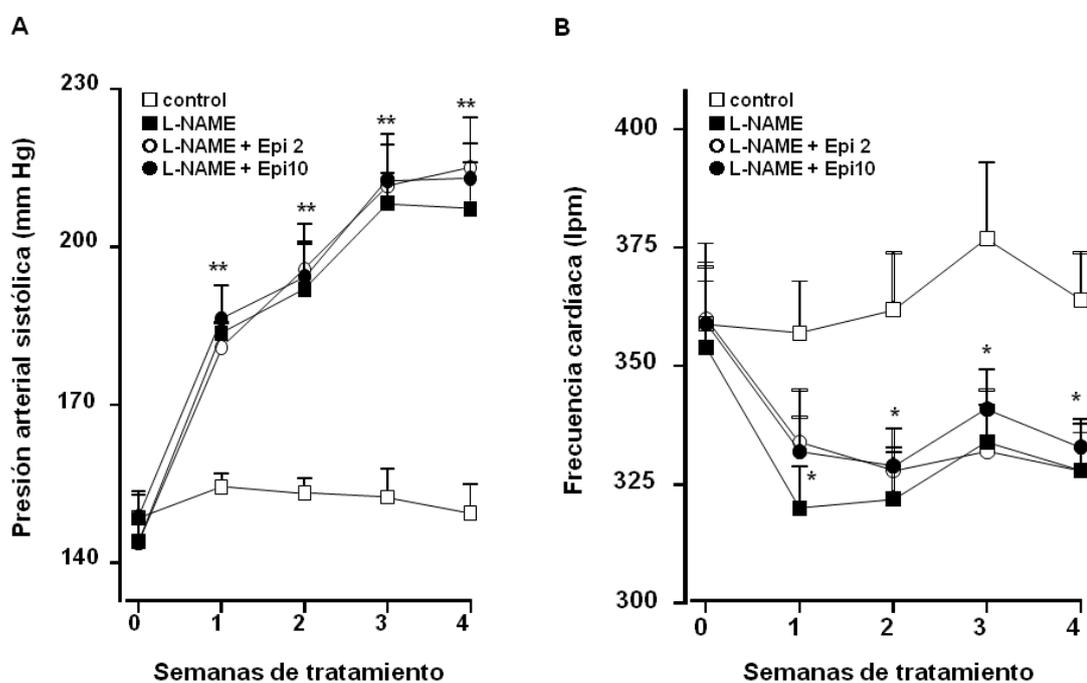
(n = 4-6). Grupos experimentales: control (Cont), epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> (Epi10), DOCA-sal (DOCA), DOCA-epicatequina 2 mg Kg<sup>-1</sup>(DOCA+Epi2), y DOCA-epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> (DOCA+Epi10). \*P < 0,05 y \*\*P < 0,01 comparado con el grupo control. ## P < 0,01 comparado con el grupo DOCA.

### **3. Efectos de la epicatequina sobre la hipertensión L-NAME.**

#### **3.1. Efectos sobre la presión arterial y los índices de peso del ventrículo izquierdo y riñón.**

Las ratas que recibieron L-NAME mostraron un incremento progresivo en la PAS (Fig. 34 A) en comparación con las ratas control. Dicho aumento fue significativo desde la primera semana, alcanzando una diferencia de aproximadamente 53 mmHg al final de las 4 semanas que duró el estudio. El tratamiento crónico con L-NAME también provocó una disminución significativa de la frecuencia cardíaca (FC, Fig. 34 B) tras la primera semana con respecto a las ratas control (FC final,  $328 \pm 8$  lpm frente a  $364 \pm 10$  lpm en las ratas control). El tratamiento concomitante con epicatequina (2 y 10 mg Kg<sup>-1</sup>) no previno los cambios provocados por L-NAME ni en la PAS ni en la FC.

Al final del tratamiento, en el grupo L-NAME estaban significativamente elevados los índices de peso del corazón (13%) y del ventrículo izquierdo (22%) en comparación con el grupo control. En las ratas que recibieron L-NAME junto a epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup>, estos parámetros fueron significativamente reducidos en comparación con el grupo L-NAME (Tabla 8).



**Figura 34.** Efectos sobre la presión arterial sistólica y la frecuencia cardíaca. Efectos del tratamiento crónico con epicatequina en la evolución en el tiempo de la presión arterial sistólica (PAS) (A) y de la frecuencia cardíaca (B) medida por pletismografía en la cola en ratas de los grupos control (□), L-NAME (■), L-NAME + epicatequina 2 mg Kg<sup>-1</sup> (Epi 2) (○) y L-NAME + epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> (Epi 10) (●). Valores expresados como la media ± SEM (n = 8-10 ratas). \*P < 0,05 y \*\*P < 0,01 L-NAME vs control.

Tabla 8. Peso corporal y de órganos. Índices cardíaco y renal.

Grupos	n	PC (g)	PCo (mg)	PVI (mg)
Control	8	384 ± 11	972 ± 46	670 ± 27
L-NAME	10	363 ± 11	1041 ± 47	770 ± 31*
L-NAME + epi 2	10	339 ± 12	944 ± 39	691 ± 31
L-NAME + epi 10	10	355 ± 13	951 ± 45	698 ± 30

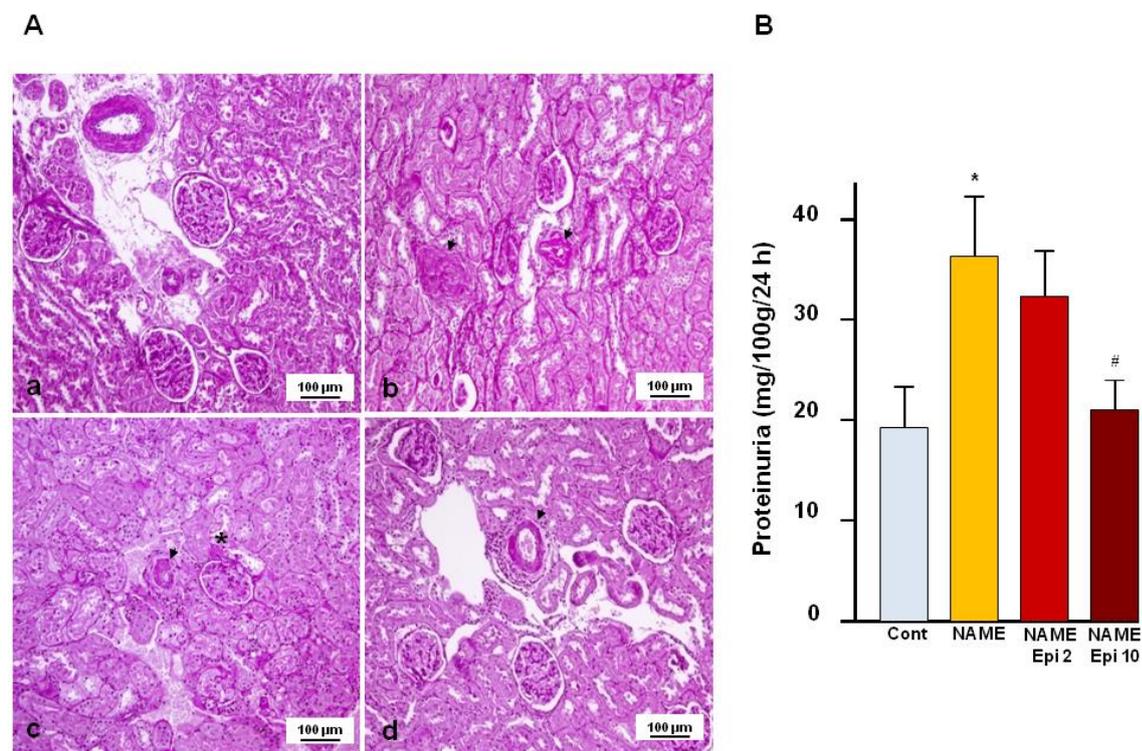
Grupos	PR (mg)	PVI/PCo Ratio	PVI/PC Ratio	PR/PC Ratio
Control	1030 ± 39	2,52 ± 0,07	1,74 ± 0,02	2,68 ± 0,07
L-NAME	953 ± 37	2,86 ± 0,07**	2,12 ± 0,06**	2,62 ± 0,14
L-NAME + epi 2	864 ± 42	2,79 ± 0,07	2,04 ± 0,07	2,55 ± 0,08
L-NAME + epi 10	936 ± 42	2,67 ± 0,07#	1,96 ± 0,04 #	2,63 ± 0,08

PC, peso corporal; PCo, peso corazón; PVI, peso ventrículo izquierdo; PR, peso riñón. Valores expresados como la media ± SEM (n = 8-10 ratas). # indica  $P < 0,05$  comparado con el control. \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$  comparado con el grupo L-NAME.

### **3.2. Efectos en la histología renal y en la proteinuria.**

Las ratas control no mostraron lesiones en el parénquima renal en la zona vascular, glomerular o tubulointersticial (Fig. 35 A). El daño en el grupo L-NAME fue moderado/severo en intensidad y afectó al 40% de los animales. La arteriopatía hialina y proliferativa (hiperplasia miointimal proliferativa) fueron las principales y más intensas lesiones, y se observó también engrosamiento de la pared vascular con disminución del lumen de las ratas del grupo L-NAME (Fig. 35 A y Tabla 9). La intensidad, el número y el tamaño de los vasos afectados con arteriopatía hialina e hiperplasia miointimal proliferativa se redujo de manera significativa con el tratamiento crónico con epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup>. No se observaron lesiones glomerulares y tubulointersticiales, excepto en las ratas de los grupos L-NAME y L-NAME más epicatequina 2 mg Kg<sup>-1</sup> que sólo presentaban cilindros tubulares y atrofia tubular de manera débil y dispersa.

La proteinuria se incrementó notablemente en el grupo L-NAME, y este efecto sólo se redujo con el tratamiento crónico con epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> (Fig. 35 B).



**Figura 35. Efectos de la epicatequina sobre la lesión renal.** (A) *Parénquima renal en el modelo de hipertensión L-NAME.* (a) Ausencia de lesiones en la zona vascular, glomerular o tubulointersticial en el grupo control; (b) vasos con arteriopatía hialina e hiperplasia miointimal proliferativa (flechas) en el grupo L-NAME; (c) arteriopatía hialina moderada / grave en las arteriolas aferentes del glomérulo (asterisco) y la arteria interlobular con la reducción del lumen (flecha) en el grupo L-NAME más epicatequina 2mg Kg<sup>-1</sup>; (d) arteriopatía hialina circunferencial sin reducción del lumen en el grupo L-NAME-más epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> (flecha). (B) *Proteinuria de todos los grupos experimentales. Valores expresados como la media ± SEM (n = 8-10). Grupos experimentales: control (Cont, n = 8), L-NAME (NAME, n = 10), L-NAME-epicatequina 2 mg Kg<sup>-1</sup> (NAME+Epi2, n = 10), y L-NAME-epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> (NAME+Epi10, n = 10). \* P<0,05 frente al grupo control; # P<0,05 frente al grupo L-NAME.*

**Tabla 9. Datos histológicos de los riñones procedentes de los distintos grupos experimentales.**

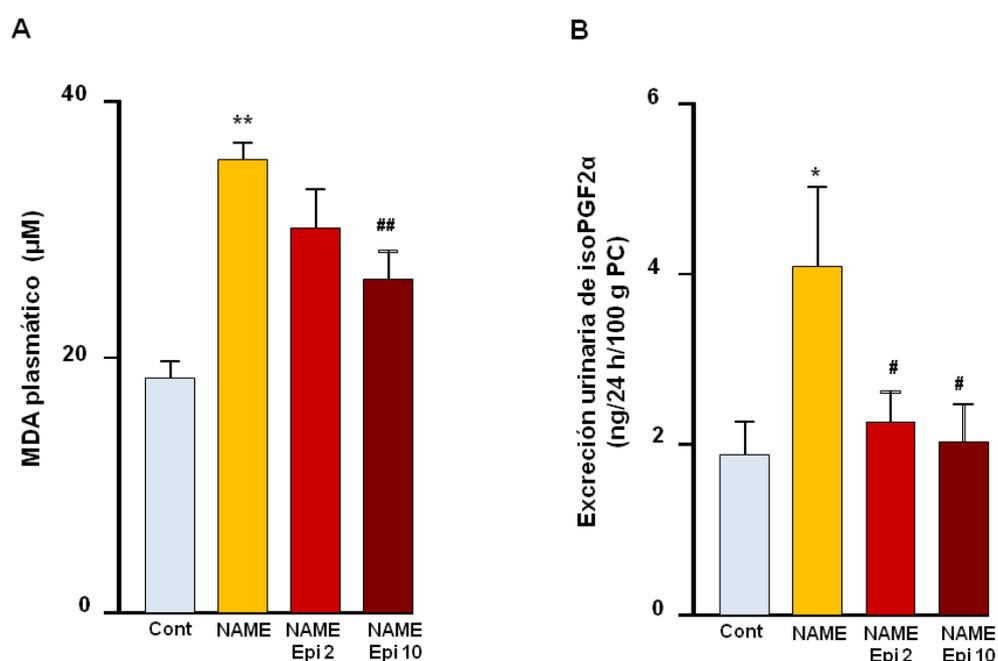
<b>Grupos</b>	<b>Control (n = 8)</b>	<b>L-NAME (n = 10)</b>	<b>L-NAME + epicatequina 2 mg kg<sup>-1</sup> (n = 10)</b>	<b>L-NAME + epicatequina 10 mg kg<sup>-1</sup> (n = 10)</b>
<b>Glomeruloesclerosis</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>
<b>Necrosis glomerular</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>
<b>Necrosis fibrinoide</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>
<b>Arteriopatía hialina</b>	<b>0 (-)</b>	<b>40 (++)</b>	<b>40 (++)</b>	<b>20 (+)</b>
<b>Arteriopatía proliferativa</b>	<b>0 (-)</b>	<b>40 (++)</b>	<b>40 (++)</b>	<b>20 (+)</b>
<b>Microaneurisma</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>
<b>Obliteración luminal</b>	<b>0 (-)</b>	<b>40 (++)</b>	<b>40 (++)</b>	<b>20 (+)</b>
<b>Dilatación tubular</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>
<b>Atrofia tubular</b>	<b>0 (-)</b>	<b>10 (+)</b>	<b>10 (+)</b>	<b>0 (-)</b>
<b>Necrosis tubular</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>	<b>0 (-)</b>
<b>Cilindros tubulares</b>	<b>0 (-)</b>	<b>10 (+)</b>	<b>10 (+)</b>	<b>0 (-)</b>

*Los valores se expresan como porcentaje de ratas con lesiones en cada grupo. La intensidad de las lesiones se muestra entre paréntesis (+, poca intensidad; ++, intensidad moderada; +++, intensidad severa de las lesiones vascular, glomerular y tubular; -, sin lesiones).*

### 3.3. Efectos sobre el estrés oxidativo sistémico.

Los niveles plasmáticos de MDA, un marcador de peroxidación lipídica inducido por ROS, en los animales L-NAME estaban incrementados (89%) con respecto al grupo control. En los grupos L-NAME tratados con epicatequina, los niveles de MDA se redujeron sólo a la dosis de 10 mg Kg<sup>-1</sup> (Fig. 36 A).

La excreción urinaria en 24h de iso-PGF<sub>2α</sub>, un marcador más específico de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, también estaba incrementado en el grupo L-NAME. Ambos grupos L-NAME tratados con epicatequina mostraron valores similares en la excreción urinaria de iso-PGF<sub>2α</sub> a las ratas del grupo control (Fig. 36 B).

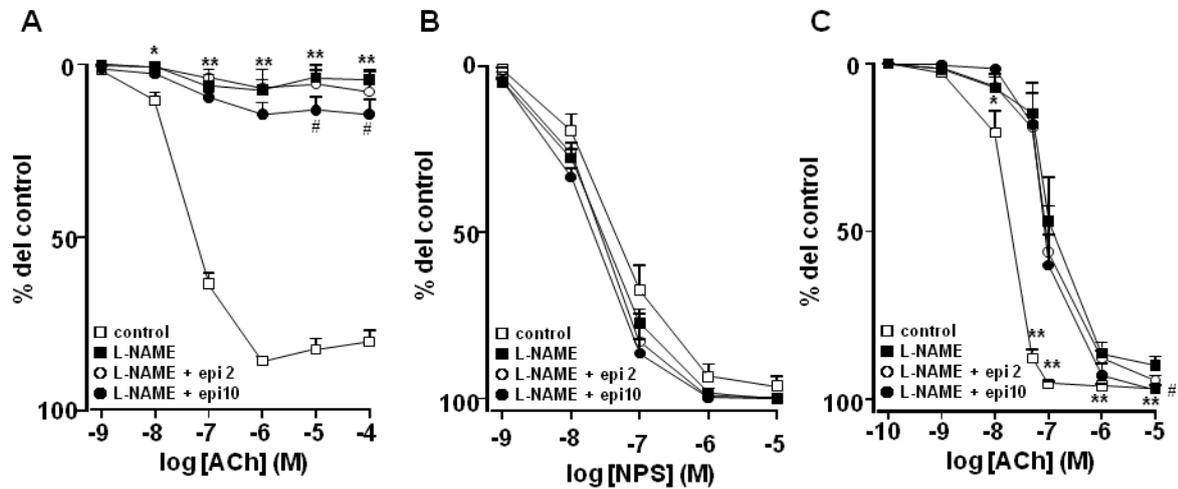


**Figura 36. Efectos de la epicatequina sobre marcadores de oxidación sistémica.** Niveles plasmáticos de MDA (A) y excreción urinaria de iso-PGF<sub>2α</sub> en 24 horas (B) de todos los grupos experimentales. Valores expresados como la media ± SEM (n = 8-10). Grupos experimentales: control (Cont, n = 8), L-NAME (NAME, n = 10), L-NAME-epicatequina 2 mg Kg<sup>-1</sup> (NAME+Epi2, n = 10), y L-NAME-epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> (NAME+Epi10, n = 10). \* P<0,05 y \*\*P<0,01 frente al grupo control; # P<0,05 y ##P<0,01 frente al grupo L-NAME.

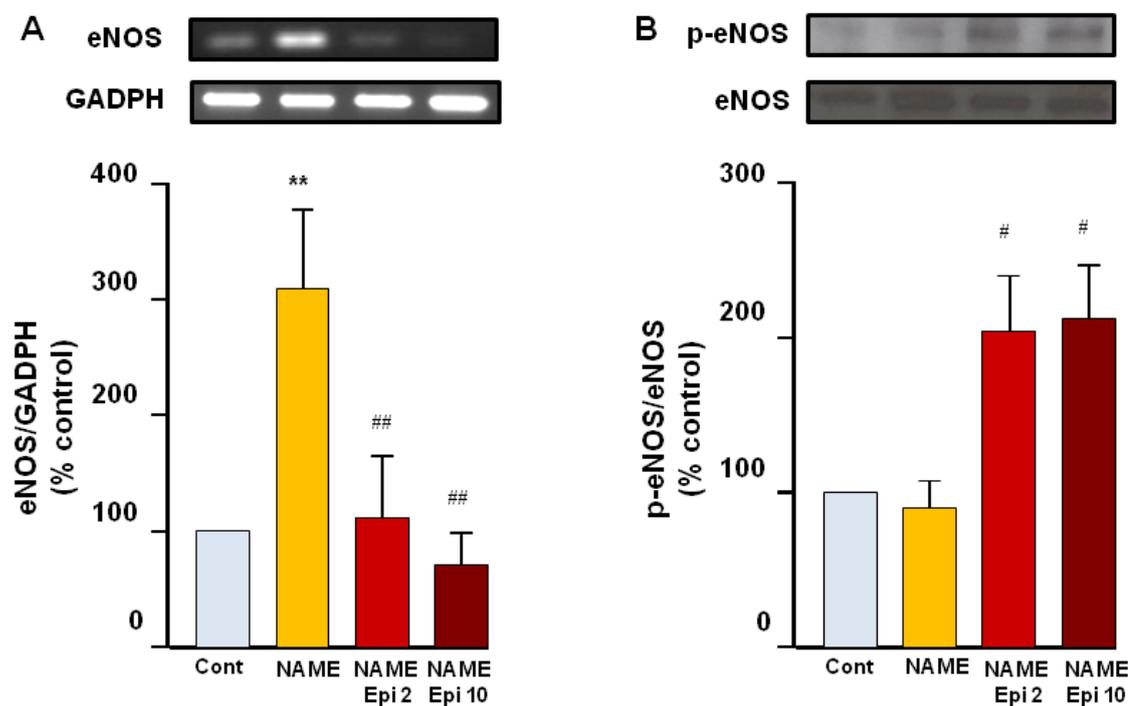
### **3.4. Efectos sobre la vía del NO vascular.**

Las aortas de ratas tratadas con L-NAME presentaron una fuerte reducción de las respuestas vasodilatadoras dependiente de endotelio a la acetilcolina (ACh, Fig. 37 A). Las aortas de los animales tratados con L-NAME más epicatequina a la dosis de 10 mg Kg<sup>-1</sup> mostraron un leve aumento de la vasodilatación inducida por acetilcolina en comparación con los animales del grupo L-NAME. En los anillos aórticos de todos los grupos experimentales no se observaron diferencias entre los grupos en la respuesta vasodilatadora independiente del endotelio al donante de NO, nitroprusiato de sodio (NPS, Fig. 37 B). En las arterias mesentéricas de pequeño calibre y con el endotelio intacto, la acetilcolina provocó relajaciones concentración-dependiente que fueron inhibidas por el tratamiento crónico con L-NAME (Fig. 37 C). La epicatequina 2 mg Kg<sup>-1</sup> no evitó este efecto del L-NAME, aunque la dosis de 10 mg Kg<sup>-1</sup> sí aumentó la respuesta relajante inducida por acetilcolina a altas concentraciones.

El contenido de mRNA de eNOS en la aorta del grupo L-NAME estaba incrementado en comparación con el grupo control. Este incremento en la expresión génica de eNOS se vio reducido con el tratamiento crónico con epicatequina a ambas dosis (Fig. 38 A). También observamos que el tratamiento con epicatequina aumentó significativamente la fosforilación de la eNOS en el residuo Ser-1177, en comparación con el control y el grupo L-NAME (Fig. 38 B).



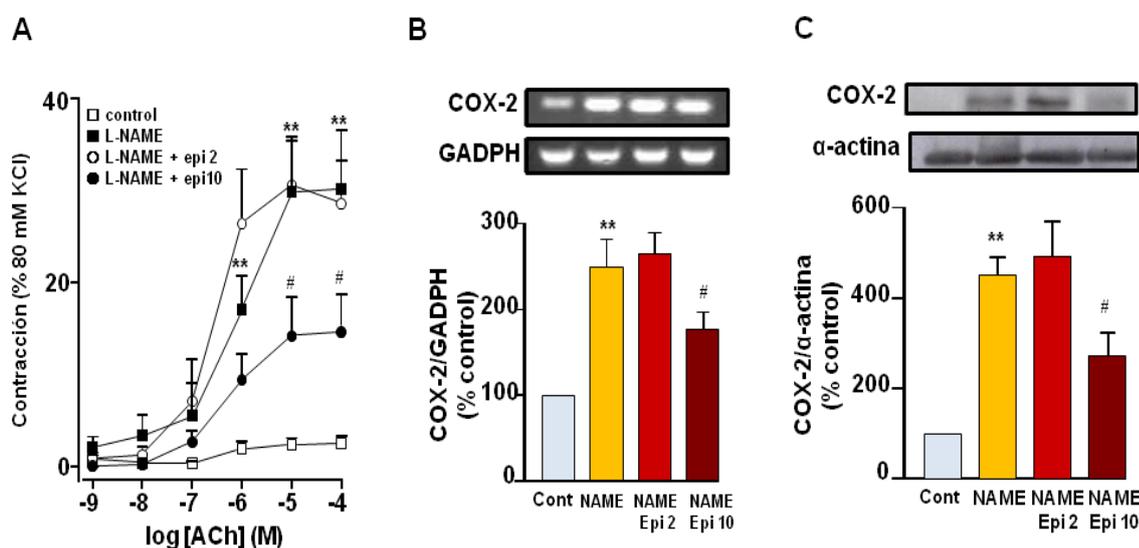
**Figura 37. Efectos de la epicatequina en la función endotelial.** Respuesta vascular relajante inducida por acetilcolina (ACh, A) y nitroprusiato sódico (NPS, B) en aortas pre-contraídas por fenilefrina (Phe, 1  $\mu$ M), y por ACh en las pequeñas arterias mesentéricas contraídas con Phe 5  $\mu$ M (C) en los correspondientes vasos de los grupos control ( $\square$ ), L-NAME ( $\blacksquare$ ), L-NAME más 2 mg Kg<sup>-1</sup> de epicatequina (epi 2) ( $\circ$ ) y L-NAME más 10 mg Kg<sup>-1</sup> de epicatequina (epi 10) ( $\bullet$ ). Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. \* P < 0,05 y \*\* P < 0,01 frente al grupo control, y # P < 0,05 en comparación al grupo L-NAME.



**Figura 38. Efectos de la epicatequina en la expresión génica y proteica de eNOS.** Expresión génica de eNOS por RT-PCR (A), y fosfo-eNOS Ser-1177 y eNOS por western blot (B) en los grupos control (Cont), L-NAME (NAME), L-NAME más epicatequina 2 mg Kg<sup>-1</sup> (Epi 2) y L-NAME más epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> (Epi 10). Los paneles muestran bandas representativas y los histogramas representan valores densitométricos normalizados con los correspondientes productos de GADPH en el caso de la RT-PCR (A) o normalizados a la correspondiente eNOS (B) (n = 3-5). Los valores se expresan como media ± SEM. \*\* P < 0,01 L-NAME vs grupo control, y # p < 0,05 y ## P < 0,01 grupo L-NAME-epi vs L-NAME.

### 3.5. Efectos sobre la vía de la COX vascular.

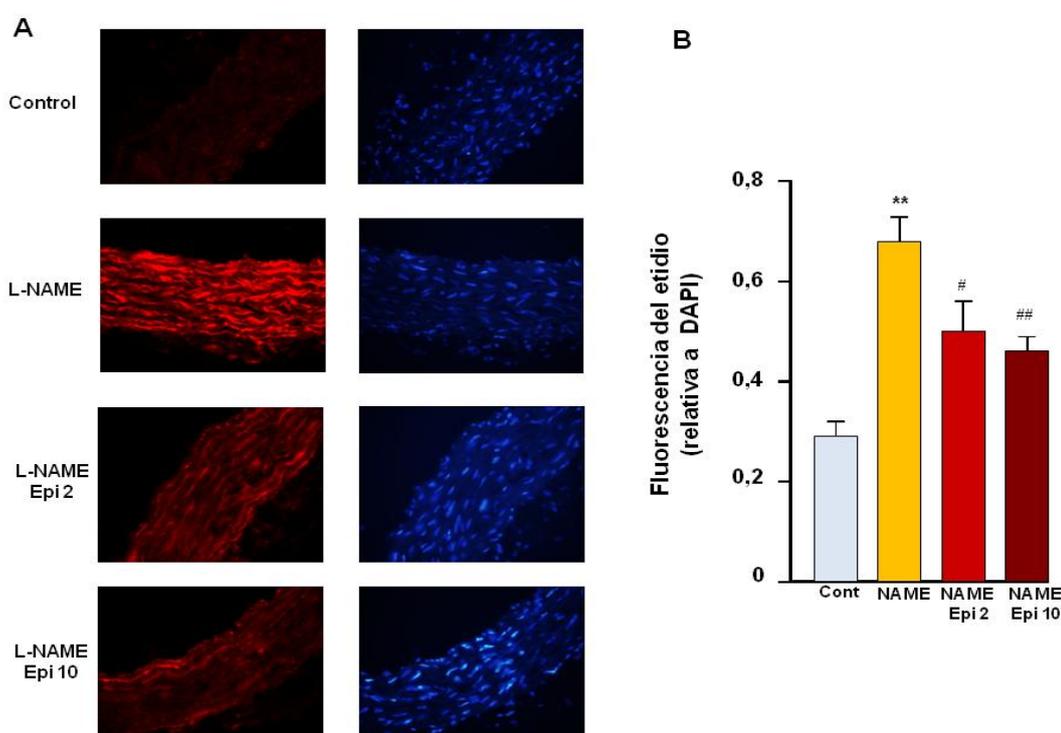
Las aortas de las ratas tratadas con L-NAME mostraron un marcado aumento en la respuesta vasoconstrictora dependiente de endotelio a la ACh (fig. 39 A), siendo los metabolitos derivados de la COX los responsables de esta respuesta contractora. Este efecto se acompañó de un aumento en el mRNA de la COX-2 (Fig. 39 B) y en su expresión proteica (Fig. 39 C). Las aortas de los animales tratados con L-NAME más epicatequina a la dosis de 10 mg Kg<sup>-1</sup> mostraron una reducción en la respuesta vasoconstrictora a la acetilcolina y en la expresión de COX-2, en comparación con el grupo L-NAME.



**Figura 39. Efectos de la epicatequina en la vía de la COX.** (A) Contracciones dependientes del endotelio inducidas por acetilcolina (ACh) en aortas de los grupos control (Cont.), L-NAME (NAME), L-NAME más epicatequina 2 mg Kg<sup>-1</sup> (Epi 2) y L-NAME más epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> (Epi 10). Las contracciones inducidas por ACh se llevaron a cabo en arterias tratadas con L-NAME (10<sup>-4</sup> M) en el baño de órganos y se expresaron como porcentaje de la respuesta a 80 mM de KCl. Expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) a nivel de mRNA por RT-PCR (B) y proteica por western blot (C) en todos los grupos experimentales. Los paneles muestran bandas representativas y los histogramas representan valores densitométricos normalizados con los correspondientes productos de GADPH en la RT-PCR (B) o normalizados con la correspondiente α-actina (C) (n = 3-5). Los valores se expresan como media ± SEM. \*\* P < 0,01 L-NAME vs grupo control, y # p < 0,05 grupo L-NAME-epi vs L-NAME.

### 3.6. Efectos sobre la producción *in situ* de $O_2^-$ y en la vía de la NADPH oxidasa.

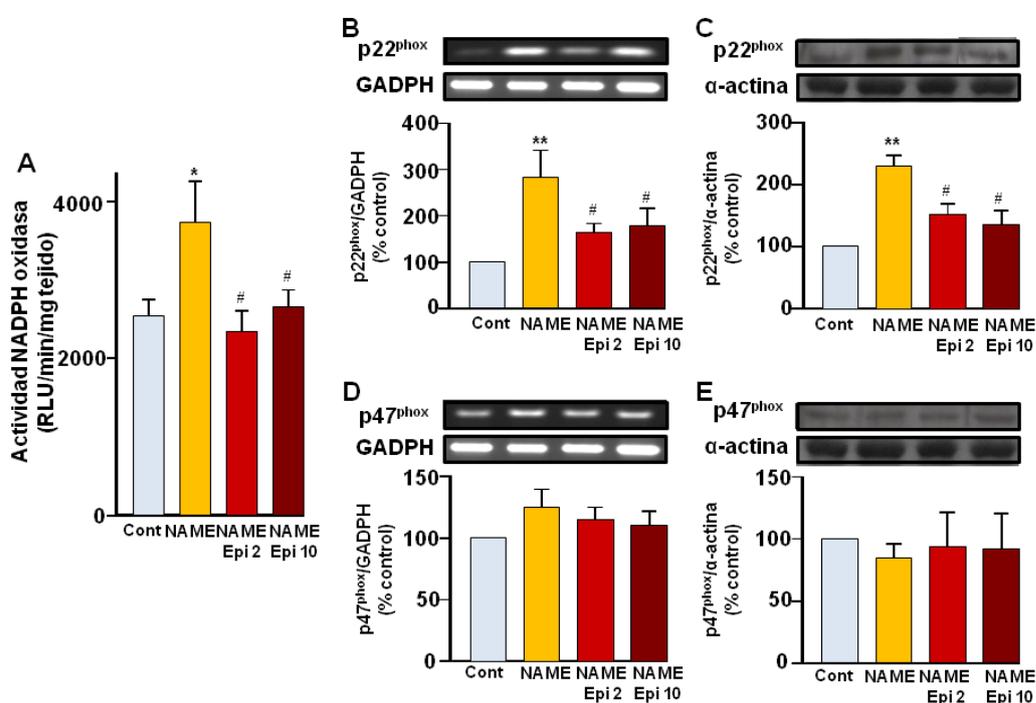
En las ratas L-NAME, los anillos aórticos mostraron un marcado incremento en la fluorescencia en la capa adventicia, la media y en células endoteliales comparados con la de las ratas control cuando se analizó la fluorescencia del etidio en secciones de aorta incubadas con DHE. Este incremento se vio significativamente reducido en los dos grupos tratados con epicatequina (Fig. 40).



**Figura 40. Efectos de la epicatequina en los niveles de  $O_2^-$  aórtico.** (A) Las fotografías de la izquierda muestran cortes histológicos de arterias incubadas en presencia de DHE que produce fluorescencia roja cuando se oxida a etidio por el anión  $O_2^-$ . Las imágenes de la derecha muestran los mismos cortes histológicos con fluorescencia azul por el marcador nuclear DAPI ( $\times 40$  aumentos). (B) Valores promedio, media  $\pm$  SEM ( $n = 5-7$  anillos de distintas ratas), de la fluorescencia roja del etidio normalizada respecto a la fluorescencia azul del DAPI en aortas de los grupos control (Cont.), L-NAME (NAME), L-NAME más epicatequina  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  (Epi 2) y L-NAME más epicatequina  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  (Epi 10). Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. \*\*  $P < 0,01$  L-NAME vs grupo control, y #  $p < 0,05$  y ##  $P < 0,01$  grupo L-NAME-epi vs L-NAME.

La actividad NADPH oxidasa, medida por luminiscencia con lucigenina, se incrementó en los anillos de aorta de ratas L-NAME en comparación con las ratas control. El tratamiento crónico con epicatequina, a ambas dosis, abolió este aumento en la actividad de la NADPH oxidasa en las ratas tratadas con L-NAME (Fig. 41 A).

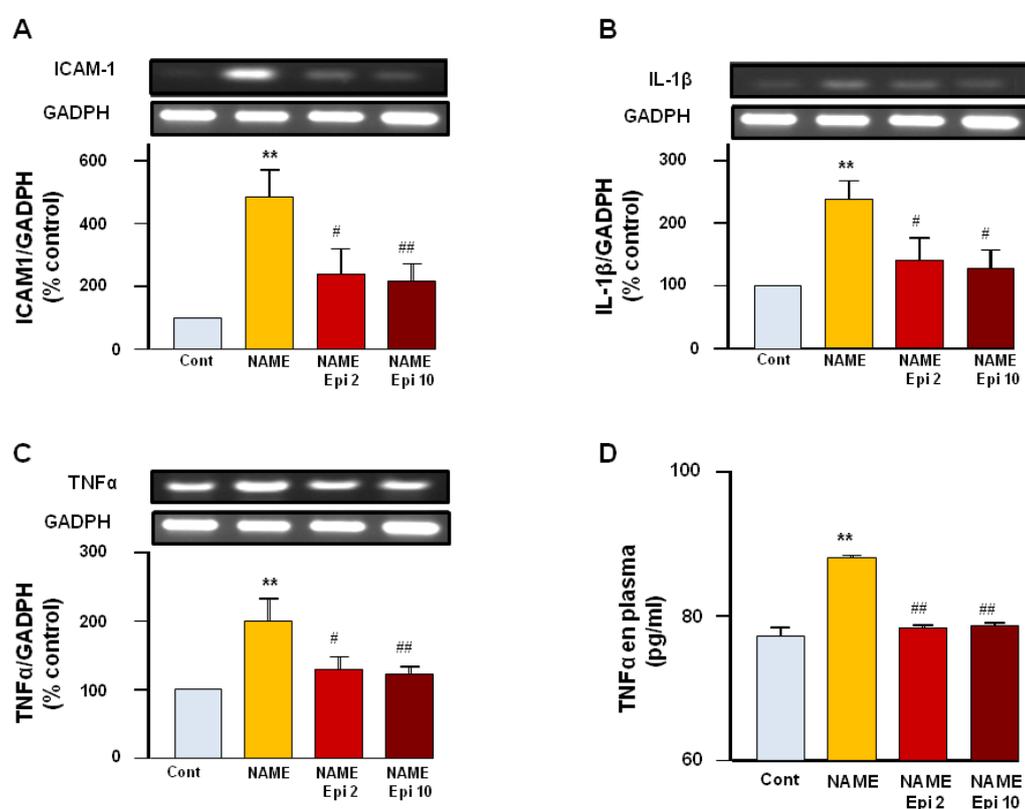
En el tejido de aorta de ratas L-NAME se observó un incremento significativo en la expresión del mRNA (Fig. 41 B) y de la expresión proteica (Fig. 41 C) de p22<sup>phox</sup>, sin cambios en otra de las subunidades de la NADPH oxidasa, la p47<sup>phox</sup> (Fig. 41 D y E). El tratamiento con epicatequina, a ambas dosis, inhibió la sobreexpresión del gen p22<sup>phox</sup> en los animales tratados con L-NAME.



**Figura 41. Efectos de la epicatequina en la vía de la NADPH oxidasa.** (A) Actividad de la NADPH oxidasa medida por quimioluminiscencia con lucigenina, y la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa p22<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup> a nivel de mRNA por RT-PCR (B y D) y proteico por western blot (C y E) en los grupos control (Cont.), L-NAME (NAME), L-NAME más epicatequina 2 mg Kg<sup>-1</sup> (Epi 2) y L-NAME más epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> (Epi 10). Los paneles muestran bandas representativas y los histogramas representan valores densitométricos normalizados con los correspondientes productos de GADPH en el caso de la RT-PCR (B y D) o normalizados a la correspondiente α-actina (C y E) (n = 3-5). Los valores se expresan como media ± SEM. \* P < 0,05 y \*\*P < 0,01 L-NAME vs grupo control, y # p < 0,05 y ## P < 0,01 grupo L-NAME-epi vs L-NAME.

### 3.7. Efectos en el estado inflamatorio.

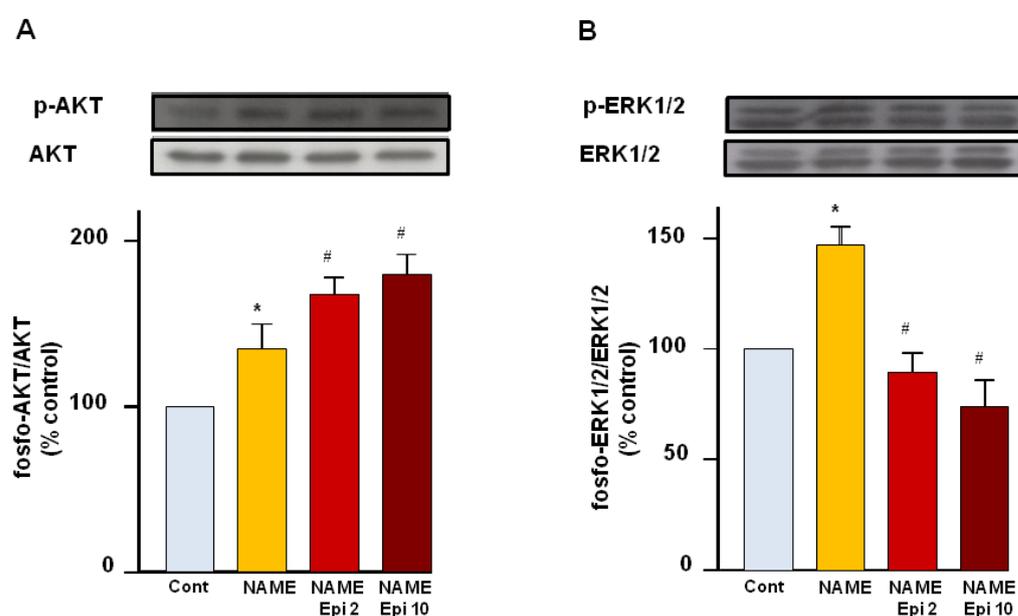
La expresión del mRNA de la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) (Fig. 42 A) y de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  (Fig. 42 B) y TNF $\alpha$  (Fig. 42 C), en homogeneizados aórticos, fue mayor en aortas del grupo L-NAME, en comparación con las ratas control. Los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$  (Fig. 42 D) también se incrementaron en las ratas tratadas con L-NAME. El tratamiento con epicatequina, a ambas dosis, disminuyó la expresión de estos genes de manera significativa y redujo los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$ .



**Figura 42. Efectos de la epicatequina en genes proinflamatorios.** Los paneles muestran bandas representativas y los histogramas representan valores densitométricos normalizados con los correspondientes productos de GADPH en la RT-PCR para ICAM-1 (A), IL-1 I $\beta$  (B) y TNF $\alpha$  (C) ( $n=3-5$ ) en aortas de los grupos control (Cont.), L-NAME (NAME), L-NAME más epicatequina 2 mg Kg $^{-1}$  (Epi 2) y L-NAME más epicatequina 10 mg Kg $^{-1}$  (Epi 10). Niveles plasmáticos de TNF $\alpha$  en todos los grupos experimentales (D). Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0,01$  L-NAME vs grupo control, y #  $P < 0,05$  y ##  $P < 0,01$  grupo L-NAME-epi vs L-NAME.

### 3.8. Efectos en las vías vasculares de AKT y ERK 1/2.

La expresión proteica de fosfo-AKT (Fig. 43 A) y de fosfo-ERK 1/2 (Fig. 43 B) estaban incrementadas en las aorta del grupo tratado sólo con L-NAME en comparación con el grupo control. El tratamiento crónico con epicatequina aumentó la fosforilación de AKT y redujo la fosforilación de ERK1/2 en ratas con hipertensión por inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico.



**Figura 43. Efectos de la epicatequina en las vías de AKT y ERK 1/2.** Los paneles (A y B) muestran bandas representativas y los histogramas representan valores densitométricos de fosfo-AKT y fosfo-ERK 1/2 relativos a los niveles de proteína total de AKT y ERK 1/2, respectivamente, ( $n=3-5$ ) en aortas de los grupos control (Cont.), L-NAME (NAME), L-NAME más epicatequina  $2 \text{ mg Kg}^{-1}$  (Epi 2) y L-NAME más epicatequina  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  (Epi 10). Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  L-NAME vs grupo control, y #  $P < 0,05$  grupo L-NAME-epi vs L-NAME.

**Discusión.**

---



## 1. Efectos de los RWP's sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1.

La ET-1 es un conocido factor desencadenante del aumento del estrés oxidativo vascular. La subsecuente inactivación de NO mediada por  $O_2^-$  juega un importante papel en la génesis de la disfunción endotelial en varias situaciones fisiopatológicas, incluyendo la aterosclerosis, la hipertensión y la diabetes (Miyachi y Masaki, 1999). Este trabajo apoya la hipótesis de que la ET-1 media la producción vascular de  $O_2^-$  vía activación de la NADPH oxidasa conduciendo a disfunción endotelial, y se muestra por primera vez que la disfunción endotelial inducida por ET-1 puede prevenirse con los RWP's, independientemente de la posible interferencia con la producción de ET-1. Además, estos RWP's también previenen el incremento en la producción de  $O_2^-$  por parte de la NADPH oxidasa mediante la disminución en la expresión de la p47<sup>phox</sup> y de la eNOS desacoplada. Estos efectos protectores parece que son independientes de la activación de ER $\alpha$  y PPAR $\gamma$  y podrían estar relacionados con la inhibición de ERK1/2.

La disfunción endotelial está presente en diferentes modelos experimentales en cuya fisiopatología la ET-1 juega un papel predominante, tales como:

- Las ratas hipertensas DOCA-sal, un modelo de hipertensión con bajos niveles de renina y angiotensina (Li *et al.*, 2003c).
- Ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (Makino *et al.*, 1998).
- Ratas a las que se les infunde ET-1 (Elmarakby *et al.*, 2005).
- Ratones transgénicos que sobreexpresan preproendotelina-1 humana específicamente en el endotelio de los vasos sanguíneos (Amiri *et al.*, 2004).

El hecho de que la ET-1 pueda inducir disfunción endotelial *in vitro* en aorta de rata (Kamata *et al.*, 2004, Loomis *et al.*, 2005, Romero *et al.*, 2009) indica que estos cambios se deben a efectos directos en la pared vascular, independientemente de hormonas circulantes, mecanismos neurogénicos o cambios en la presión arterial. En nuestros experimentos, la disfunción endotelial resultó evidente por la reducida respuesta relajante tras la activación de la eNOS inducida por ACh. El tratamiento

crónico con RWPs reduce la presión sanguínea y mejora la disfunción endotelial (Soares de Moura *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2007); estos efectos protectores se asocian a sus propiedades antioxidantes, con lo que se reduce el estrés oxidativo sistémico y vascular (Soares de Moura *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2007).

Sin embargo, no está claro si los efectos en la función endotelial se debían a un efecto directo sobre la pared vascular, secundarios a la disminución en la presión sanguínea o si se deben a mecanismos neurohumorales de los RWPs. De hecho, en trabajos previos de nuestro grupo (Jiménez *et al.*, 2007) hemos visto cómo los RWPs reducen los niveles plasmáticos de ET-1 en ratas DOCA-sal, sin afectar a los animales control. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral muestran que los RWPs también son efectivos *in vitro*, aumentando la relajación inducida por ACh y reduciendo la contracción debida a fenilefrina en anillos aórticos incubados con ET-1. Además, debería tenerse en cuenta que la concentración de RWPs fue efectiva a partir de  $10^{-4}$  g/L, indicando que este efecto pudiera ser fisiológicamente relevante (Diebolt *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta la dosis utilizada de RWPs en los tratamientos *in vivo* anteriormente descritos y sabiendo que la absorción media de los RWPs en el tracto digestivo humano está entre el 5 % y el 10 % (Duthie *et al.*, 1998), podría alcanzarse en plasma una concentración de 0,01 g/L de RWPs. Ensayamos con catequina, epicatequina y resveratrol su posible papel protector frente a la disfunción endotelial inducida por ET-1 y de los tres compuestos estudiados, la epicatequina es el único que a la concentración que teóricamente alcanzaría *in vitro* tiene efectos beneficiosos.

El efecto de la ET-1 se observó a partir de las 4 horas de incubación, incluso cuando la ET-1 estuvo ausente durante la curva a fenilefrina o ACh. De manera similar, los RWPs estuvieron presentes durante la exposición a ET-1 pero ausentes durante las pruebas de función endotelial. Estos cambios lentos y persistentes inducidos por la ET-1 son acordes con los cambios en la expresión génica de los sistemas generadores de  $O_2^-$ , como las subunidades de la NADPH oxidasa. Por otra parte, el incremento en la expresión proteica de p47<sup>phox</sup> inducido por ET-1 fue inhibido por el antagonista de los

receptores ETA (BQ123), pero no por el antagonista del receptor ETB, BQ788 (Romero *et al.*, 2010). Es posible que los efectos preventivos de RWPs en la disfunción endotelial inducida por ET-1 fueran el resultado del cambio en la expresión del receptor ETA. Sin embargo, esta posibilidad se descartó porque encontramos que la expresión proteica del receptor de ETA no fue alterada por RWPs.

El rasgo más característico de la disfunción endotelial es una bioactividad disminuida del NO derivado del endotelio. En la aorta de rata, la vasodilatación dependiente del endotelio depende casi exclusivamente de la liberación endotelial de NO. Son varios los mecanismos que podrían estar involucrados en el hecho de que los RWPs sean capaces de aumentar el NO derivado de endotelio, como los cambios en la actividad y / o expresión de la eNOS, cambios en los niveles vasculares de  $O_2^-$  y, por tanto, inactivación del NO por ese  $O_2^-$ , así como los cambios en la sensibilidad a la vía NO/GMPc en las células vasculares del músculo liso. Debido a que las respuestas al nitroprusiato no se modificaron por RWPs, este tercer posible mecanismo puede ser descartado. La reducción de la síntesis de NO asociada a la disfunción endotelial puede ser causada por un descenso en la expresión de la eNOS, una modificación post-transduccional de la enzima (por ejemplo, fosforilación o modificaciones de ácidos grasos), las interacciones con las proteínas de choque calórico 90 (hsp90) y la caveolina o por concentraciones por debajo de niveles óptimos tanto del sustrato L-arginina como del cofactor tetrahidrobiopterina (BH4). En los experimentos para llevar a cabo este trabajo encontramos que el mRNA de la eNOS y de su regulador negativo en la aorta (caveolina-1) no se alteraron cuando incubamos con ET-1 o cuando co-incubamos con RWPs. Además, los RWPs no aumentaron la fosforilación de la eNOS. Sin embargo, la actividad de la eNOS, medida indirectamente por la contracción provocada por fenilefrina en presencia de L-NAME, se redujo con la ET-1 y se restauró en presencia de RWPs. Estos datos concuerdan con la disminución en el desacoplamiento de eNOS inducido por RWPs.

El exceso en la generación de  $O_2^-$  está críticamente involucrado en la inactivación del NO asociada a la disfunción endotelial en anillos aórticos de ratas DOCA-sal (Li *et al.*, 2003c; Galisteo *et al.*, 2004) y en anillos incubados con ET-1 (Kamata *et al.*, 2004; Loomis *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2009). En nuestros experimentos, la presencia de SOD en el baño de órganos mejoró la respuesta relajante inducida por ACh en anillos aórticos expuestos a ET-1. De manera similar, Kamata *et al.* (2004) encontraron que la coincubación de anillos aórticos con ET-1 y PEG-SOD, un captador de  $O_2^-$  permeable a la membrana, previno por completo el empeoramiento en la relajación dependiente de endotelio a ACh inducida por ET-1. En este estudio, la apocinina, que inhibe selectivamente la actividad NADPH oxidasa, revirtió el empeoramiento en la respuesta relajante a ACh en anillos tratados con ET-1. Estos resultados muestran el papel tan destacado de la actividad NADPH oxidasa como moduladora del tono vascular. Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con precaución, ya que la apocinina *in vitro* no es un inhibidor específico de la NADPH oxidasa (Aldieri *et al.*, 2008).

Hemos visto que la ET-1 provocó un incremento en la tinción con DHE en las capas media y adventicia del vaso, donde no se expresa la eNOS, lo que sugiere que la ET-1 activa la NADPH oxidasa dando lugar a un incremento en la producción aórtica de  $O_2^-$ . De hecho, hemos observado que la ET-1 produce un aumento en la actividad NADPH oxidasa, efecto que previno la co-incubación con el inhibidor selectivo de la NADPH oxidasa apocinina. Los RWPs previnieron tanto el incremento en la producción vascular de  $O_2^-$  como el incremento en la actividad NADPH oxidasa, medida en ausencia de RWPs, lo que sugiere una posible interferencia con la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa. En nuestros experimentos, anillos aórticos incubados durante 4 horas con ET-1 mostraron un incremento en la expresión de p47<sup>phox</sup> pero no en la de p22<sup>phox</sup>. De este modo, este incremento en la expresión proteica de p47<sup>phox</sup> concuerda con la producción aumentada de  $O_2^-$  que encontramos en aortas estimuladas con ET-1. La co-incubación con RWPs disminuyó los niveles de esta proteína en aortas tratadas con ET-1. Todos estos resultados sugieren que los RWPs

reducen el aumento en la producción de  $O_2^-$  estimulada por ET-1 disminuyendo la expresión de la subunidad p47<sup>phox</sup> de la NADPH oxidasa vascular. En estudios recientes en SHR (López-Sepúlveda *et al.*, 2008), en ratas DOCA-sal (Jiménez *et al.*, 2007) y en ratas con infusión de Ang II (Sarr *et al.*, 2006) la mejora de la función endotelial por la administración crónica de RWPs se asocia a una reducción en la actividad NADPH oxidasa, que es anormalmente alta en estos animales comparado con los controles normotensos. Nuestros resultados sugieren que la disminución del  $O_2^-$  derivado de NADPH oxidasa, y por tanto, la disminución en la inactivación del NO pueden ser un mecanismo muy importante de la administración crónica de RWPs que contribuya a la prevención de la disfunción endotelial mediada por ET-1.

La eNOS desacoplada es otra fuente generadora de  $O_2^-$  en el tejido aórtico. El ionóforo de calcio A23187, que induce la activación de eNOS dependiente del calcio, aumentó la producción de  $O_2^-$  en los anillos aórticos expuestos a ET-1. Como era de esperar, este efecto se redujo cuando inhibimos la eNOS con L-NAME. Estudios previos (Loomis *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2009) sugieren que la generación de  $O_2^-$  debida a la NADPH oxidasa es necesaria para el desacoplamiento de la eNOS. De hecho, los RWPs, que inhibieron la NADPH oxidasa, también inhibieron la generación de  $O_2^-$  inducida por A23187, es decir, que impidieron el desacoplamiento de la eNOS inducido por ET-1. Puesto que el desacoplamiento de la eNOS inducido por ET-1 fue secundario a NADPH oxidasa y se previno con sepiapterin (Romero *et al.*, 2009), es probable que la oxidación de  $BH_4$  esté implicada en dicho desacoplamiento de la eNOS.

El ER $\alpha$  es una diana fundamental en la acción que tienen en el endotelio los RWPs (Chalopin *et al.*, 2010). La activación de ER por 17 $\beta$ -estradiol inhibe la actividad NADPH oxidasa mediante la regulación del mRNA y de la expresión proteica de p47<sup>phox</sup> (Sumi *et al.*, 2003). Sin embargo, en nuestros experimentos, el antagonista de ER, ICI 182780, no pudo reducir el efecto protector de los RWPs en la disfunción endotelial inducida por ET-1, lo que sugiere que los ER $\alpha$  no están implicados en este efecto beneficioso. Algunos RWPs aislados parecen tener efectos agonistas sobre los

PPAR $\gamma$  (Liang *et al.*, 2001). Puesto que los ligandos de PPAR $\gamma$  reducen la generación de O $_2^-$  estimulada por Ang II en células endoteliales de arteria coronaria humana (Mehta *et al.*, 2003), podría ser posible que los RWPs previnieran la disfunción endotelial activando estos receptores. Sin embargo, el antagonista de PPAR $\gamma$ , GW9662, no alteró los efectos inducidos por RWPs, lo que sugiere que estos efectos protectores están desvinculados de la activación PPAR $\gamma$ .

Un paso fundamental provocado por la ET-1 en la pared vascular es la activación de la cascada de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Foschi *et al.*, 1997; Daou y Srivastava, 2004; Yogi *et al.*, 2007). De las principales MAPKs, las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), p38 MAPK y la proteína cinasa activada por estrés/c-Jun N-terminal cinasa (SAPK/JNK) son las mejor caracterizadas (Pearson *et al.*, 2001). Recientemente, en este laboratorio (Romero *et al.*, 2010), haciendo uso de la inhibición farmacológica de estas principales MAPKs, encontramos que sólo la inhibición de ERK1/2 era capaz de prevenir el incremento tanto de la producción de O $_2^-$  como de la expresión de p47<sup>phox</sup> inducidos por ET-1, no teniendo ningún efecto la inhibición de p38MAPK o de JNK. Los vinos tintos inhiben la fosforilación de ERK1/2 inducida por el factor de crecimiento derivado de plaquetas en CMLV de rata y humanas. Este efecto inhibitorio está relacionado con la presencia de flavonoides en el vino (Sparwel *et al.*, 2009). En nuestras condiciones experimentales, la ET-1 estimula la fosforilación de ERK1/2 y este efecto fue inhibido por los RWPs, lo que sugiere que este efecto inhibitorio podría ser responsable, al menos en parte, de la reducción en la producción de O $_2^-$  por la NADPH oxidasa inducida por estos compuestos en anillos aórticos estimulados con ET-1.

Los monómeros de polifenoles más abundantes en esta mezcla de RWPs son catequina, epicatequina y el resveratrol. La epicatequina es, con mucho, el más abundante de todos ellos, ya que está cerca de 50 y 100 veces más concentrada que los otros dos, respectivamente. Con el fin de comprobar si estos compuestos, a las concentraciones que se encuentran en 10<sup>-2</sup> g/L de RWPs, serían los responsables de los

efectos protectores de los RWPs, estudiamos la respuesta relajante dependiente del endotelio a ACh en anillos incubados con ET-1. De los tres, sólo la epicatequina restauró el deterioro de dicha respuesta relajante a ACh. Además, la epicatequina previno todos los cambios bioquímicos inducidos por la ET-1 en la pared vascular. Estos resultados sugieren que la epicatequina presente en la mezcla de RWPs sería el principal polifenol implicado en la mejora de la disfunción endotelial inducida por RWPs. Por otra parte, los datos ponen de relieve que componentes de los RWPs, como el resveratrol, pueden ejercer interesantes efectos de protección, pero su concentración en el vino es demasiado baja como para ser eficaces.

En conjunto, estos resultados indican que los polifenoles del vino tinto previenen la disfunción endotelial originada por ET-1 en anillos aórticos de rata. 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<sup>phox</sup>, que conduce a una menor actividad NADPH oxidasa. Estos efectos parecen ser independientes de la activación de ER $\alpha$  y PPAR $\gamma$  y están relacionados con la inhibición de ERK1/2. La epicatequina contenida en esta mezcla de RWPs juega un papel clave en estos efectos protectores.

## 2. Efectos preventivos de la epicatequina sobre la hipertensión DOCA-sal.

Las principales hallazgos de este estudio son que el tratamiento crónico con epicatequina, de manera dosis dependiente, previene el aumento progresivo de la PAS, la proteinuria y la disfunción endotelial en ratas uninefrectomizadas y sometidas a la administración crónica de DOCA-sal, y que estos efectos parecen estar relacionados con la reducción vascular de  $O_2^-$  mediada tanto por la inhibición de la NADPH oxidasa como por el aumento de la respuesta antioxidante a través del sistema Nrf2/ARE. Además, los estudios expuestos en esta Tesis Doctoral muestran que la epicatequina es capaz de reducir la producción de ET-1 *in vivo*, lo cual podría colaborar en sus efectos cardiovasculares beneficiosos.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman las evidencias epidemiológicas y los estudios de intervención sobre los efectos antihipertensivos y la mejora en la función endotelial de los alimentos enriquecidos en flavanoles (Stensvold *et al.*, 1992; Hodgson *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; Taubert *et al.*, 2003; 2007; Matsuyama *et al.*, 2008). La epicatequina, principal componente bioactivo del cacao y otros alimentos y bebidas ricos en flavanoles (Schroeter *et al.*, 2006), previene la hipertensión, al menos en parte, al reducir el estrés oxidativo. En concordancia con estudios anteriores (Beswick *et al.*, 2001; Ghosh *et al.*, 2004; Elmarakby *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2007) también nosotros encontramos que el estrés oxidativo está involucrado en la hipertensión inducida por DOCA-sal, ya que la administración a largo plazo de epicatequina a la dosis de 10 mg Kg<sup>-1</sup> en ratas DOCA-sal disminuyó significativamente la excreción urinaria de iso-PGF<sub>2α</sub> (una prostaglandina producida en una reacción no enzimática del ácido araquidónico y  $O_2^-$ ), los niveles plasmáticos de MDA (un marcador fiable de la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo) y la PAS en comparación con las ratas tratadas sólo con DOCA-sal. Sin embargo, la epicatequina a la dosis de 2 mg Kg<sup>-1</sup> fue incapaz de reducir tanto los marcadores de estrés oxidativo sistémicos como de

prevenir el desarrollo de la hipertensión inducida por el tratamiento DOCA-sal. Por otro lado, las lesiones renales características de la hipertensión mineralcorticoide se asocian con el estrés oxidativo y son, en parte, independientes de la presión arterial (de Gracia *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2006). En nuestro estudio, la proteinuria, un marcador de daño renal, se incrementó en las ratas DOCA-sal y el tratamiento con epicatequina, sólo a la dosis que reduce el estrés oxidativo sistémico, redujo la excreción de proteínas hasta valores similares a los encontrados en las ratas control.

La presión arterial alta mantenida en el tiempo es un poderoso factor determinante del desarrollo de hipertrofia cardíaca y renal (Frohlich *et al.*, 1992). De hecho, las ratas hipertensas DOCA-sal mostraron aumento del gasto cardíaco y de los índices de peso, tanto del ventrículo izquierdo como del riñón, en comparación con las ratas control normotensas. Sin embargo, el tratamiento con epicatequina no redujo ninguno de estos índices, a pesar de su efecto preventivo en el desarrollo de la hipertensión. De esta manera, encontramos que la disociación entre la presión arterial alta y la hipertrofia cardíaca existe en este modelo de hipertensión arterial, mostrando la implicación de otro estímulo trófico importante, que no se vio afectado ni por los compuestos con propiedades antioxidantes como pueden ser la epicatequina (estudios de esta Tesis Doctoral), ni los polifenoles de vino tinto o la apocinina (Jiménez *et al.*, 2007), ni por las moléculas sin propiedades antioxidantes, tales como verapamilo (Galisteo *et al.*, 2004). De hecho, nuestro grupo demostró que las ratas que recibieron las mismas dosis de DOCA utilizadas en el presente estudio pero con el agua sin sal, fueron capaces de desarrollar hipertrofia renal y cardíaca sin aumentar la presión arterial (Wangenstein *et al.*, 2002). La ET-1 está implicada en el desarrollo del estrés oxidativo y la hipertensión en ratas DOCA-sal, ya que el bloqueo de los receptores ETA reduce los niveles de  $O_2^-$  arteriales, con una disminución concomitante de la PAS (Li *et al.*, 2003). Recientemente, se ha descrito que la epicatequina reduce los niveles de ET-1 plasmáticos en hombres sanos (Loke *et al.* 2008) y en ratones knock-out de la apolipoproteína E (ApoE ) (-/-) (Loke *et al.*, 2010). De acuerdo con estos resultados,

encontramos que el tratamiento con epicatequina  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  es capaz de prevenir la hipertensión reduciendo la ET-1 plasmática en este modelo de hipertensión de renina baja. Este efecto inhibitorio podría estar relacionado con la activación AKT, que regula el promotor de la ET-1, como se ha sugerido en trabajos anteriores (Reiter *et al.*, 2010). En nuestro estudio, ambas dosis de epicatequina suprimieron el aumento de  $\text{O}_2^-$  aórtico intracelular medido por fluorescencia del etidio, pero sólo la dosis más alta redujo los niveles plasmáticos de ET-1 en ratas DOCA-sal, lo que sugiere que otros mecanismos pueden estar involucrados en los efectos protectores de dosis bajas de epicatequina en el estrés oxidativo vascular, tales como:

- La capacidad de interferir en la vía de señalización de ET-1 que lleva a la generación de  $\text{O}_2^-$ .
- La activación de los sistemas vasculares antioxidantes.

Se sabe que la ET-1 activa la NADPH oxidasa para generar  $\text{O}_2^-$  vascular en ratas con hipertensión DOCA-sal (Beswick *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003), aunque la ET-1 también incrementó la xantina oxidasa y la producción mitocondrial de ROS en este modelo de hipertensión (Callera *et al.*, 2006; Viel *et al.*, 2008). Se descubrió, además, que la actividad NADPH oxidasa está aumentada en la aorta de ratas hipertensas DOCA-sal y que este aumento se asocia con una generación elevada de  $\text{O}_2^-$ . El sitio exacto de generación de  $\text{O}_2^-$  por parte de la NADPH oxidasa no está claro, ya que este complejo multienzimático se expresa en las células endoteliales, las células musculares lisas vasculares y en las células de la capa adventicia (Lassegue y Clempus, 2003). Cuando estudiamos la detección *in situ* de la producción de  $\text{O}_2^-$ , encontramos que los anillos de ratas DOCA-sal mostraban una marcada tinción en comparación con los de las ratas control, y que ésta se encontraba distribuida por todas las capas de la pared aórtica. Hemos descrito que, *in vitro*, la epicatequina a  $10 \mu\text{M}$ , una concentración más baja que la encontrada en el plasma de rata 1 h tras la administración oral de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de epicatequina (Baba *et al.*, 2001), redujo la producción de  $\text{O}_2^-$  por la NADPH oxidasa estimulada por ET-1 en los anillos de aorta, a través de la inhibición de ERK1/2

(Resultados *in vitro* de esta Tesis Doctoral). En el caso de este tratamiento, ambas dosis de epicatequina previnieron el aumento del  $O_2^-$  vascular en las ratas DOCA-sal. Sin embargo, sólo la dosis más alta inhibió el aumento de la actividad NADPH oxidasa en dichas ratas, lo que sugiere que las dosis bajas de epicatequina podrían reducir los niveles aumentados de  $O_2^-$  vascular, no disminuyendo la producción, sino aumentando las defensas antioxidantes. El aumento de la actividad NADPH oxidasa en DOCA-sal se ha relacionado con cambios en las subunidades de la enzima que se encuentran en las arterias de estas ratas, como el aumento en la expresión de p22<sup>phox</sup> y de p47<sup>phox</sup> (Beswick *et al.*, 2001; Callera *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2007) y / o el aumento del desplazamiento de p47<sup>phox</sup> a la membrana (Callera *et al.*, 2006). De hecho, encontramos una mayor expresión proteica de p22<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup> en ratas DOCA-sal, lo que fue prevenido sólo por epicatequina a la dosis de 10 mg Kg<sup>-1</sup>, lo que sugiere que esta expresión a la baja de ambas subunidades está implicada en la reducción vascular de la producción de  $O_2^-$  mediada por NADPH oxidasa encontrada en las ratas DOCA sal tratadas con epicatequina a la mayor dosis.

El Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor*) es un factor de transcripción activado por el estrés oxidativo que regula la expresión de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes mediante su unión a una secuencia específica del DNA conocida como ARE (*Antioxidant Response Element*). Estudios recientes sugieren que la vía Nrf2/ARE puede ser activada tanto farmacológicamente como mediante la dieta (Pearson *et al.*, 2008). En condiciones basales de no activación, el factor Nrf2 se encuentra unido a una proteína citoplasmática represora Keap1 (*Kelch-like-erythroid cell-associated protein 1*). Se ha sugerido que el complejo Nrf2-Keap1 constituye un sensor del estrés oxidativo, de tal forma que cuando se ve incrementado, Nrf2 es liberado y se desplaza al núcleo uniéndose al ARE y activando la transcripción de genes que participan en la respuesta de fase II de detoxificación así como de enzimas de defensa antioxidante, como la flavoproteína NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) y hemo-oxigenasa-1 (Hmox-1). La vía Nrf2-ARE también controla la

expresión de  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa (GCLC), enzima limitante en la síntesis de glutatión. Recientemente, se ha visto que el tratamiento agudo con epicatequina (10  $\mu$ M) incrementa el desplazamiento al núcleo de Nrf2 así como su fosforilación en células HepG2 (Granado-Serrano *et al.*, 2010). En nuestro trabajo demostramos por primera vez cómo el tratamiento crónico con epicatequina incrementa tanto la expresión de Nrf2 como de sus genes diana (NQO1, GCLC y Hmox) en la pared vascular. Los mecanismos responsables de este efecto no están claros. Las ROS parecen jugar un papel importante en la activación de Nrf2, de manera que niveles no demasiado elevados de ROS inducen su expresión (Glorie *et al.*, 2006). Sin embargo, en tejidos aórticos de ratas normotensas tratadas con epicatequina el incremento en la actividad de la vía Nrf2-ARE no parece relacionarse con cambios en la producción de ROS. Por otra parte, debería señalarse que el incremento de la actividad de PI3K/AKT por epicatequina se ha relacionado con la activación de Nrf2 en astrocitos (Bahía *et al.*, 2008) y células HepG2 (Granado-Serrano *et al.*, 2010). También observamos que el tratamiento crónico con epicatequina incrementaba la fosforilación de AKT en aorta, hecho que estaría relacionado con el incremento en la actividad de Nrf2. En ratas hipertensas DOCA-sal también observamos una regulación incrementada de Nrf2 en comparación con animales normotensos, a pesar de una menor fosforilación de AKT, lo que podría justificar el aumento de Hmox-1 y otros genes de la vía Nrf2/ARE encontrado en nuestro estudio y por otros autores (Nath *et al.*, 2007). Este incremento en la vía Nrf2 está en concordancia con el aumento de producción de  $O_2^-$  vía NADPH oxidasa en ratas DOCA-sal, y parece ser un mecanismo compensatorio para proteger a los vasos del daño oxidativo (Nath *et al.*, 2007). En nuestros experimentos, la epicatequina 2 mg  $Kg^{-1}$ , dosis que no redujo la producción vascular de  $O_2^-$ , también incrementó la vía Nrf2 en ratas DOCA-sal, lo que condujo a un menor contenido vascular de  $O_2^-$ . Sin embargo, el incremento de la actividad Nrf2 inducido por la epicatequina 10 mg  $Kg^{-1}$  en las ratas controles podría ser reducido por el efecto inhibitorio sobre la producción vascular de  $O_2^-$  que se observa cuando se administra a

ratas DOCA-sal. De hecho, observamos una menor expresión de los componentes de esta vía en las ratas DOCA-sal tratadas con epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> que en las ratas controles tratadas con esta misma dosis. Estos resultados sugieren que la epicatequina es más potente como estimulador de la vía Nrf2/ARE que inhibidor de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por parte de la NADPH oxidasa y que el primer efecto debe modular de manera local el estado oxidativo vascular.

Nuestros resultados concuerdan con estudios anteriores que demuestran que la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio inducida por ACh se ve alterada en los vasos de conductancia en la hipertensión DOCA-sal (Somers *et al.*, 2000; Galisteo *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2007; Nath *et al.*, 2007). Se ha demostrado que el aumento vascular de O<sub>2</sub><sup>-</sup> está relacionado con una inactivación de NO endógeno asociado a una menor respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio (Rajagopalan *et al.*, 1996). Por lo tanto, el balance local entre O<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO en la pared vascular determina el tono vascular. Nuestros resultados confirman el papel esencial de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en la disfunción endotelial observada en los anillos de aorta de ratas DOCA-sal, ya que el tratamiento crónico con epicatequina mejora la respuesta relajante inducida por ACh, posiblemente reduciendo los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y protegiendo al NO de su inactivación. La disfunción endotelial no estaba relacionada con cambios en la vía de la guanilato ciclasa-GMPc, ya que las respuestas al donador de NO, NPS, se mantuvieron sin cambios. Por otra parte, las variaciones en la expresión de eNOS inducidas por el tratamiento crónico con epicatequina podrían estar involucradas en sus efectos protectores de la función endotelial en este modelo de hipertensión mineralocorticoide con niveles bajos de renina. Se observó que la expresión total de eNOS se mantuvo sin cambios en la aorta de ratas DOCA-sal, que tampoco se vieron afectados por la epicatequina. Sin embargo, y de acuerdo con Lima *et al.* (2009), los niveles de fosforilación de eNOS se redujeron en las aortas del grupo DOCA-sal, y se incrementaron significativamente en todos los grupos tratados con epicatequina. Este aumento en la vía de AKT-eNOS inducida por la epicatequina podría estar implicado en el incremento en la contracción a fenilefrina

encontrado en anillos intactos de aortas de ratas DOCA-sal tratados con epicatequina que se incubaron con el inhibidor de eNOS, L-NAME, un índice indirecto de la actividad de eNOS.

En conclusión, estos resultados demuestran claramente que el tratamiento crónico con epicatequina reduce la hipertensión y la disfunción endotelial en este modelo de hipertensión DOCA-sal. El efecto antihipertensivo es probable que se deba a la capacidad de la epicatequina para prevenir el estrés oxidativo sistémico y reducir los niveles plasmáticos de ET-1. Por otra parte, la epicatequina también mejora la función endotelial al prevenir el estrés oxidativo vascular por la inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa y / o por aumentar la transcripción dependiente de Nrf2/ARE de las enzimas de defensa antioxidante en ratas hipertensas, y por el aumento de la vía AKT-eNOS. Estos datos sugieren que la protección cardiovascular asociada a una dieta que contiene alimentos ricos en flavonoides puede ser en parte el resultado de la ingesta de flavanoles como la epicatequina.

### 3. Efectos de la epicatequina sobre la hipertensión L-NAME.

La administración de L-NAME en el agua de bebida provoca un aumento progresivo de la presión arterial que se atribuye a una reducción de la síntesis del agente vasodilatador NO y ha sido ampliamente utilizado como un modelo de hipertensión crónica (Zatz y Baylis, 1998). El presente estudio muestra por primera vez que una sola dosis oral diaria de epicatequina (2 ó 10 mg/Kg) fue capaz de prevenir total o parcialmente la mayoría de los efectos inducidos por L-NAME, tales como: a) el aumento de la hipertrofia ventricular izquierda, b) la proteinuria, c) las lesiones histológicas renales, d) el aumento de las concentraciones plasmáticas de MDA y de la excreción urinaria de iso-PGF2 $\alpha$ , e) la mayor contracción dependiente de endotelio de ACh y la sobreexpresión de COX-2, f) el aumento de la producción vascular de O $_2^-$  y de la actividad NADPH oxidasa, así como g) el aumento del estado inflamatorio vascular. En la mayoría de los casos, estos efectos fueron dosis-dependiente. Sin embargo, no inhibió el desarrollo de la hipertensión y sólo tuvo efectos de menor importancia en la alteración del endotelio y en la relajación NO dependiente.

La epicatequina, a concentraciones superiores a 30  $\mu$ M, ejerce efectos vasodilatadores *in vitro*, que son parcialmente dependientes de endotelio y de NO (Chen *et al.*, 2002). La epicatequina activa a la eNOS en las células endoteliales de la arteria coronaria humana por: *i*) la fosforilación de Ser-633 y de Ser-1177 y desfosforilación de Thr-495, y *ii*) a través de la vía de la cinasa II dependiente de Ca $^{2+}$ /calmodulina, aumentando la producción de NO (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2010). Además, la epicatequina y sus dos metabolitos metilados elevan los niveles de NO en las células endoteliales a través de la inhibición de la NADPH oxidasa (Steffen *et al.*, 2007). Sin embargo, era previsible que este efecto agudo no se diera *in vivo* en los animales tratados con L-NAME porque: 1) las concentraciones de epicatequina en plasma tras la administración de 2 ó 10 mg kg $^{-1}$  estarían por debajo de este rango de concentraciones activas (Piskula y Terao, 1998), y 2) su respuesta relajante sería pequeña en condiciones

en las que la eNOS se encuentra inhibida de manera crónica. Por tanto, la ausencia de efecto antihipertensivo de la epicatequina en este modelo de hipertensión puede estar relacionada, al menos en parte, a la ausencia de efecto vasodilatador agudo.

*Daño renal y cardíaco.*

La lesión renal tras la inhibición crónica de la síntesis de NO ha sido consistentemente descrita (Zatz y Baylis, 1998). En nuestro estudio, el grupo L-NAME presentó un daño renal entre moderado y grave, especialmente en los vasos, y con bajos cilindros tubulares y atrofia tubular leve. La lesión vascular principal y más intensa que se halló en las ratas L-NAME fue la arteriopatía hialina y el engrosamiento de la pared vascular (arteriopatía proliferativa) acompañado de una disminución moderada del lumen, que se observó casi siempre en los vasos de tamaño medio. Estos hallazgos histológicos se asociaron con proteinuria, lo que indica que existe un deterioro funcional de la barrera de la pared glomerular. La epicatequina, a la mayor dosis utilizada, previno parcialmente las lesiones del parénquima renal y vascular, así como la proteinuria, lo que indica que la epicatequina protege, al menos parcialmente, del daño renal inducido por L-NAME, a pesar de la falta de efecto antihipertensivo.

En este modelo de hipertensión se ha descrito una ligera hipertrofia del ventrículo izquierdo (9-30%), que contrasta con la severa carga sistólica (Bartunek *et al.*, 2000). En nuestro estudio, los índices de peso del ventrículo izquierdo y del corazón aumentaron significativamente en las ratas L-NAME y estos efectos fueron significativamente prevenidos por la epicatequina a la dosis de 10 mg Kg<sup>-1</sup>. Estos efectos protectores se deben, al menos en parte, a una reducción inducida por la epicatequina de ROS y de las citocinas proinflamatorias, que son potentes estímulos para el crecimiento cardíaco y el daño renal (Li *et al.*, 2002; Vaziri, 2004).

---

*Disfunción endotelial, NO y vasoconstrictores derivados de la COX.*

La administración de L-NAME se asocia con la disfunción endotelial (Bryan *et al.*, 1995; Zanchi *et al.*, 1995; Moreau *et al.*, 1997; Zatz y Baylis, 1998). Las aortas procedentes de ratas tratadas con L-NAME mostraron una menor respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio inducida por ACh, tanto en pequeñas arterias como en la aorta, con similar respuesta relajante independiente de endotelio debida al NPS. La epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> evitó, sólo débilmente, este efecto en ambos lechos vasculares, sin afectar la sensibilidad al NO, ya que no modificó la vasodilatación inducida por nitroprusiato.

El L-NAME inhibe las isoformas constitutivas de NOS dependiente de Ca<sup>2+</sup> (eNOS y nNOS) y la isoforma inducible Ca<sup>2+</sup> independiente (iNOS) (Mitchell *et al.*, 1993). Sin embargo, estos efectos inhibitorios sobre la actividad de la NOS se asociaron con un incremento en la expresión de eNOS en los tejidos de la aorta, lo que se puede considerar como un mecanismo de compensación para mantener la producción de NO bioactivo ante un mayor estrés oxidativo (Vazziri *et al.*, 1999; Zhen *et al.*, 2008). La epicatequina redujo la expresión génica y proteica de eNOS, posiblemente como resultado de la reducción de los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> vascular en las aortas. Curiosamente, también encontramos un aumento de la fosforilación de la Ser1177 de la eNOS, asociado a un incremento de la fosforilación de AKT vascular en ambos grupos de ratas tratadas con epicatequina. Estos resultados *in vivo* concuerdan con observaciones anteriores *in vitro* que muestran cómo la epicatequina induce la activación de la fosforilación de eNOS a través de la vía PI3K/AKT en células endoteliales humanas incubadas con este flavanol (Yamakuchi *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2010).

Además, el aumento de la vasoconstricción dependiente del endotelio inducida por ACh en presencia de L-NAME en baño de órganos también se observó en las aortas de ratas tratadas crónicamente con L-NAME. Estas contracciones se han atribuido previamente a una mayor liberación endotelial de prostanoides vasoconstrictores derivados de la COX (como PGH<sub>2</sub> o TXA<sub>2</sub>) (Duarte *et al.*, 2002; Belik *et al.*, 2010). Del

mismo modo, se encontró sobreexpresión de COX-2 en la aorta de ratas tratadas con L-NAME. La epicatequina 10 mg Kg<sup>-1</sup> redujo la vasoconstricción inducida por ACh y previno el aumento de la expresión de COX-2, lo que sugiere que la epicatequina inhibe la liberación de metabolitos derivados de la COX por regulación a la baja de COX-2. Así, aunque el tratamiento crónico con epicatequina previno los cambios secundarios en la función endotelial (debido a la mayor liberación de vasoconstrictores endoteliales) fue incapaz de restaurar el defecto endotelial primario (producción deficiente de NO).

*Especies reactivas de oxígeno sistémicas y vasculares y marcadores inflamatorios.*

Se ha sugerido que las ROS intervienen en la génesis de la aterosclerosis, la diabetes, la cardiopatía isquémica, la insuficiencia cardíaca y la hipertensión (Griendling y Alexander, 1997; Givert y Colucci, 1998; Nakazono *et al.*, 2001). El modelo de hipertensión L-NAME ha sido también asociado con un aumento sistémico de estrés oxidativo (Bauersachs *et al.*, 1998; Usui *et al.*, 1999; Duarte *et al.*, 2002). De hecho, los valores plasmáticos de MDA, que reflejan un índice general del estado oxidativo y de la peroxidación lipídica (Vericel *et al.*, 1994; Kitts *et al.*, 1998) y los niveles de excreción urinaria del isoprostano F<sub>2α</sub>, prostaglandina producida por la reacción del ácido araquidónico y el O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Belik *et al.*, 2010), se incrementaron en el presente estudio. Se sabe que la epicatequina *in vitro* posee propiedades antioxidantes (van Acker *et al.*, 1996) y que reduce el contenido de MDA en los eritrocitos de pacientes hipertensos (Kumar *et al.*, 2010). En nuestros experimentos, y en concordancia con estos datos, el tratamiento a largo plazo con epicatequina redujo los niveles plasmáticos de MDA y los niveles urinarios de isoprostanos.

De acuerdo con otros modelos de hipertensión (Rajagolapan *et al.*, 1996; Fukai *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 2006), el modelo de hipertensión inducida por el bloqueo crónico de la producción de NO se asocia con un exceso de producción de ROS dentro de la pared arterial (González *et al.*, 2000). En nuestros estudios de detección *in situ* de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> encontramos que los anillos del grupo L-NAME mostraron una

marcada tinción en comparación con las ratas control, y que ésta se distribuyó por todas las capas de la pared aórtica. Este exceso puede deberse, al menos en parte, a un aumento en la actividad de la NADPH oxidasa, como sugieren tanto el incremento en la quimioluminiscencia con lucigenina como el aumento en la expresión de p22<sup>phox</sup> (resultados de esta Tesis Doctoral; González *et al.*, 2000). La epicatequina, a ambas dosis, redujo intensamente la fluorescencia de etidio, la actividad de la NADPH oxidasa y la regulación al alza de la subunidad p22<sup>phox</sup> en anillos de aorta de ratas tratadas con L-NAME. Se han descrito resultados similares en la pared vascular utilizando una dosis más alta (30 mg Kg<sup>-1</sup>) de su estereoisómero, catequina, en ratas prediabéticas OLETF (Ihm *et al.*, 2009). En nuestro estudio, la inhibición crónica de NO también provocó el aumento de la fosforilación de ERK1/2, efecto que se redujo con la epicatequina. La reducción de la actividad ERK 1/2 puede estar implicada en los efectos inhibitorios sobre la actividad de la NADPH oxidasa producidos por epicatequina.

El reclutamiento de monocitos es uno de los primeros pasos en la hipertensión inducida por arteriosclerosis y por la fibrosis perivascular (Nicoletti y Michel, 1999). La supresión crónica de NO provoca un aumento de la adhesión endoluminal de monocitos *ex vivo* y una acumulación perivascular de macrófagos *in vivo*, de acuerdo con el aumento en el estrés oxidativo y de las citocinas inflamatorias en la pared arterial (Luvará *et al.*, 1998; Tomita *et al.*, 1998). Los niveles de mRNA de IL-1 $\beta$ , ICAM-1 y TNF $\alpha$  se incrementaron en la pared vascular de las ratas L-NAME, lo que sugiere que las señales proinflamatorias proceden de dicha pared arterial. La expresión de moléculas de adhesión y de citocinas proinflamatorias son principalmente los productos de genes inducibles que suelen ser controlados, al menos en parte, por la vía redox-sensible NF- $\kappa$ B (Brand *et al.*, 1997). El aumento del estrés oxidativo en la pared vascular de las ratas tratadas con L-NAME probablemente se deba a la activación del sistema NF- $\kappa$ B, que a su vez, induce la expresión de citocinas proinflamatorias (Hernández-Presa *et al.*, 1997). Los resultados expuestos en este estudio apoyan aún más esta hipótesis, ya que, la

epicatequina, que redujo los niveles de  $O_2^-$  en aorta, también inhibió la expresión vascular de estos marcadores proinflamatorios y proaterogénicos.

En conclusión, el presente estudio demuestra que el tratamiento crónico con epicatequina, a dosis equivalentes a las que se puede conseguir en la dieta humana, previene la hipertrofia cardíaca y del parénquima renal, las lesiones vasculares y la proteinuria, además de reducir el prostanoide que media en la respuesta vasoconstrictora dependiente de endotelio y que se encuentra incrementado en este modelo de hipertensión de inhibición crónica de la síntesis de NO con L-NAME. La epicatequina, además, reduce el estrés oxidativo vascular y el estado proinflamatorio, primeros eventos involucrados en el desarrollo de la aterosclerosis, lo que podría ayudar a explicar los efectos beneficiosos cardiovasculares de los alimentos ricos en epicatequina descritos en estudios epidemiológicos.

**Discussion.**

---



## **1. Effects of RWPs on endothelial dysfunction induced by ET-1.**

ET-1 is a well-known trigger for increased vascular oxidative stress and the subsequent  $O_2^-$  driven NO inactivation plays a major role in the genesis of clinical endothelial dysfunction in a variety of pathophysiological conditions, including atherosclerosis, hypertension and diabetes (Miyachi y Masaki, 1999). The present study supports the hypothesis that ET-1 mediates vascular  $O_2^-$  production via activation of NADPH oxidase leading to endothelial dysfunction. In this study, we show for the first time that ET-1-induced endothelial dysfunction can be prevented by RWPs, independently of their possible interference with ET-1 production. Moreover, these RWPs also prevented the ET-1-induced increase in vascular  $O_2^-$  production from both NADPH oxidase through down-regulation of p47<sup>phox</sup> expression and from uncoupled eNOS. These protective effects seemed to be independent of both ER $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activation but related to ERK1/2 inhibition. Endothelial dysfunction is present in several experimental models in which ET-1 plays a predominant pathophysiological role such as 1) the DOCA-salt hypertensive rats, a low renin-angiotensin model of hypertension (Li *et al.*, 2003c), 2) streptozotocin-induced diabetic rats (Makino *et al.*, 1998), 3) ET-1-infused rats (Elmarakby *et al.*, 2005), and 4) transgenic mice overexpressing human preproET-1 specifically in blood vessel endothelium (Amiri *et al.*, 2004). The fact that ET-1 can also induce endothelial dysfunction *in vitro* in rat aorta (Kamata *et al.*, 2004, Loomis *et al.*, 2005, Romero *et al.*, 2009) indicates that these changes are due to direct effects of ET-1 on the vessel wall, independent of circulating hormones, neurogenic mechanisms or changes in arterial pressure. In our experiments, endothelial dysfunction was evidenced by the reduced relaxant response after eNOS activation induced by ACh, and by the increased vasoconstrictor response to phenylephrine. Chronic RWPs reduces blood pressure and improves endothelial function in DOCA-salt rats (Soares de Moura *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2007). These protective effects have been related to its antioxidant properties reducing systemic and vascular oxidative stress (Soares de Moura

*et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2007). However, it was unclear whether the effects on endothelial function were due to a direct effect on the vessel wall, secondary to the blood pressure lowering effect or driven by neurohumoral mechanisms of RWPs. In fact, RWPs reduced ET-1 plasma levels in DOCA-salt rats, without affecting control animals. The present results show that RWPs are also effective *in vitro*, increasing the ACh-induced relaxation and reducing the phenylephrine-induced contraction in aortic rings exposed to ET-1. Moreover, it should be noted that the effective concentration of RWPs was as low as  $10^{-4}$  g/L, indicating that this effect appears to be physiologically relevant (Diebolt *et al.*, 2001). The effect of ET-1 was observed after 4 h of incubation even when ET-1 was absent during the challenge with phenylephrine or ACh. Similarly, RWPs were present during the exposure to ET-1 but absent during the endothelial function tests. These slow and persistent changes induced by ET-1 are consistent with the involvement of changes in gene expression of  $O_2^-$  generating systems, such as NADPH oxidase subunits. Moreover, the increased p47<sup>phox</sup> protein expression induced by ET-1 was inhibited by the ET<sub>A</sub>-receptor antagonist BQ123, but not by the ET<sub>B</sub>-receptor antagonist, BQ788 (Romero *et al.*, 2010). It is possible that the preventive effects of RWPs in the endothelial dysfunction induced by ET-1 were a result of the change in ET<sub>A</sub> receptor expression. However, this possibility was ruled out because we found that protein expression of ET<sub>A</sub> receptor was unaltered by RWPs.

The most characteristic feature of endothelial dysfunction is a diminished bioactivity of endothelium derived NO. In the rat aorta, endothelium-dependent vasodilatation relies almost entirely on the endothelial release of NO. Several potential mechanisms would be involved in the RWPs-induced increase of endothelial-derived NO responses, such as changes in the activity and/or expression of eNOS, changes in the vascular levels of  $O_2^-$  and, thus,  $O_2^-$ -driven NO inactivation and, changes in the sensitivity to NO-cGMP pathway in vascular smooth muscle cells. Because the responses to nitroprusside were not modified by RWPs, the third potential mechanism can be ruled out. Reduced NO synthesis associated to endothelial dysfunction may be

caused by impaired expression of eNOS, post-translational modification of the enzyme (e.g. phosphorylation or fatty acid modifications), interactions with heat shock protein 90 (hsp90) and caveolin or suboptimal concentrations of the substrate L-arginine or the cofactor tetrahydrobiopterin (BH4). We found that mRNA of eNOS and their negative regulator caveolin-1 in aorta was not altered by ET-1 or co-incubation with RWPs. Moreover, RWPs did not increase eNOS phosphorylation. However, eNOS activity, indirectly measured by phenylephrine contraction in presence of L-NAME, was reduced by ET-1 and restored by RWPs. These data are consistent to the improvement of eNOS uncoupling induced by RWPs.

Excess of  $O_2^-$  generation is critically involved in the breakdown of NO associated to endothelial dysfunction in aortic rings from DOCA-salt rats (Li *et al.*, 2003c; Galisteo *et al.*, 2004) and rings incubated with ET-1 (Kamata *et al.*, 2004; Loomis *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2009). In our experiments, the presence of SOD in the organ chamber improved the relaxant response induced by ACh in aortic rings exposed to ET-1. Similarly, Kamata *et al.* (2004) found that co-incubation of aortic rings with ET-1 and polyethylene-glycol SOD, a cell-permeant  $O_2^-$  scavenger, completely prevented the impairment in endothelium dependent relaxation to ACh induced by ET-1. In our study, apocynin, which selectively inhibits NADPH oxidase activity, reversed the impaired relaxant response to ACh in ET-1 treated rings. These results showed the critical role of NADPH oxidase activity modulating vascular tone. However, caution might be taken with this result, since apocynin *in vitro* is not a specific inhibitor of NADPH oxidase (Aldieri *et al.*, 2008).

We found that ET-1-induced an increase in DHE staining in medial and adventitial layers of the vessel and an increase in NADPH oxidase activity in aortic rings, an effect which was prevented by coincubation with apocynin. Coincubation of RWPs with ET-1 also prevented both the increased vascular  $O_2^-$  production and the increased NADPH oxidase activity. These experiments were carried in rings that had been treated previously with ET-1 and RWPs for 4 h but the actual measurements were done in

the absence of ET-1 and RWPs, which suggested a possible interference with the expression rather than the activity of NADPH oxidase subunits. In fact, aortic rings incubated by 4 hours with ET-1 showed increased expression of p47<sup>phox</sup> but not of p22<sup>phox</sup>. Thus, this increased p47<sup>phox</sup> protein expression is consistent with the increased O<sub>2</sub><sup>-</sup> production found in aortae stimulated by ET-1. Co-incubation with RWPs decreased the levels of this protein in ET-1-treated aortae. These results suggest that RWPs reduced O<sub>2</sub><sup>-</sup> production stimulated by ET-1 by downregulating the expression of the p47<sup>phox</sup> subunit of vascular NADPH oxidase. In recent studies in SHR (López-Sepúlveda *et al.*, 2008), in DOCA-salt (Jiménez *et al.*, 2007), and Angiotensin II-infused rats (Sarr *et al.*, 2006) it has been demonstrated that the improvement of endothelial function by chronic oral administration of RWPs is associated with a reduction in the NADPH oxidase activity which is abnormally high in these animals as compared to normotensive rats. Our present results suggest that reduced NADPH oxidase derived O<sub>2</sub><sup>-</sup> and, thus, reduced NO inactivation may be an important mechanism contributing to the prevention of ET-1-mediated endothelial dysfunction induced by chronic RWPs.

Uncoupled eNOS is also a source of O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in aortic tissue. The calcium ionophore A23187, which induces calcium-dependent eNOS activation, increased O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in aortic rings exposed to ET-1. As expected, this effect was reduced by eNOS inhibition with L-NAME. Previous studies (Loomis *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2009) suggest that NADPH oxidase derived O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation is required for eNOS uncoupling. In fact RWPs, that inhibit NADPH oxidase, also inhibited A23187-induced O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation, i.e. they prevented ET-1-induced eNOS uncoupling. Because ET-1-induced eNOS uncoupling was secondary to NADPH oxidase and prevented by sepiapterin (Romero *et al.*, 2009), oxidation of BH<sub>4</sub> is likely to be involved in eNOS uncoupling.

ER $\alpha$  is a key target of RWPs extract action on the endothelium (Chalopin *et al.*, 2010). Activation of ER by 17 $\beta$ -estradiol inhibits NADPH oxidase activity through the regulation of p47<sup>phox</sup> mRNA and protein expression (Sumi *et al.*, 2003). However, in

our experiments the ER antagonist ICI 182780 was unable to reduce the protective effects of RWPs in endothelial dysfunction induced by ET-1, which suggests that ER $\alpha$  are not involved in this beneficial effect. Some isolated RWPs have been suggested to show agonistic effects on PPAR $\gamma$  (Liang *et al.*, 2001). Because the PPAR $\gamma$  ligands reduce O $_2^-$  generation stimulated by AngII in human coronary artery endothelial cells (Mehta *et al.*, 2003), we hypothesized that RWPs might also prevent endothelial dysfunction via activation of these receptors. However, the PPAR $\gamma$  antagonist GW9662 did not affect the effects induced by RWPs, suggesting that these protective effects are unrelated to PPAR  $\gamma$  activation.

A key signalling event evoked by ET-1 in vascular wall is the activation of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) cascade (Foschi *et al.*, 1997; Daou y Srivastava, 2004; Yogi *et al.*, 2007). 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). Recently, Romero *et al.*, (2010), using pharmacological inhibition of these major MAPKs found that only ERK1/2 inhibition are able to prevent the increased of both O $_2^-$  production and p47<sup>phox</sup> protein expression induced by ET-1, being without effect p38MAPK and JNK inhibition. Red wines inhibit ERK1/2 phosphorylation induced by platelet-derived growth factor in rat and human vascular smooth muscle cells. This inhibitory effect was related to the accumulation of flavonoids in wine (Sparwel *et al.*, 2009). In our experimental conditions ET-1 stimulates ERK1/2 phosphorylation and this effect was inhibited by RWPs, which suggests that this inhibitory effect might be responsible, at least in part, to the reduced NADPH oxidase-driven O $_2^-$  production induced by these compounds in aortic rings stimulated by ET-1.

The major monomeric polyphenols in this RWPs mixture are catechin, epicatechin and resveratrol. Epicatechin is by far the most abundant in this wine, being about 50 and 100 fold more concentrated than the other two, respectively. In order to test if these compounds, at the concentrations found in 10<sup>-2</sup> g/L RWPs, would be

responsible of the protective effects of RWPs we studied the endothelium-dependent relaxant response to ACh in ET-1 incubated rings. Only epicatechin restored the impaired relaxant response to ACh. Moreover, epicatechin also prevented all biochemical changes induced by ET-1 in the vascular wall. These results suggest that epicatechin content of RWPs mixture would be the main polyphenol involved in the improvement of endothelial dysfunction induced by RWPs. Moreover, the data highlight that RWPs components such as resveratrol may exert interesting protective effects but its concentration in wine is too low as to be effective.

Taken together these results indicate that RWPs prevent ET-1-induced vascular  $O_2^-$  production by reducing overexpression of p47<sup>phox</sup> and the subsequent increased NADPH oxidase activity, leading to improvement of endothelial function. The effects of RWPs seem to be independent of ER $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activation and related to ERK1/2 inhibition. The epicatechin content of RWPs plays a key role in these protective effects.

## 2. Effects of epicatechin in DOCA-salt hypertension.

The major new findings of this study are that chronic treatment with epicatechin, in a dose-response manner, prevents the progressive increase in SBP, the proteinuria and the endothelial dysfunction in uninephrectomized rats subjected to chronic administration of DOCA-salt, and that this effect seems to be related to attenuation of vascular  $O_2^-$  content mediated by both NADPH oxidase inhibition and increased Nrf2-mediated antioxidant response. In addition, we show that epicatechin reduce ET-1 production *in vivo*, which would collaborate to their beneficial cardiovascular effects.

This study confirms epidemiological evidences and intervention studies about antihypertensive effects and the improvement in endothelial function of flavanols enriched-food (Stensvold *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2004; Hodgson *et al.*, 2003; Taubert *et al.*, 2003; 2007; Matsuyama *et al.*, 2008). Epicatechin, the major bioactive constituent of cocoa and other flavanol-rich food and berages (Schroeter *et al.*, 2006), prevents hypertension, at least in part, by reducing oxidative stress. According to previous studies (Beswick *et al.*, 2001; Ghosh *et al.*, 2004; Elmarakby *et al.*, 2005; Jimenez *et al.* 2007) we also found that oxidative stress is involved in DOCA salt-induced hypertension, since long-term administration of epicatechin at 10 mg kg<sup>-1</sup> to DOCA-salt rats significantly decreased the urinary iso-PGF<sub>2α</sub>, a prostaglandin-like compound produced in a non enzymatic reaction of arachidonic acid and  $O_2^-$ , the plasma MDA levels, a reliable marker for lipid peroxidation and oxidative stress, and the SBP compared with that of rats treated with DOCA-salt alone. However, epicatechin at 2 mg kg<sup>-1</sup>, which was unable to reduce systemic oxidative stress markers, was also unable to prevent the development of hypertension induced by DOCA-salt treatment. Moreover, renal injury characteristic of mineralcorticoid hypertension is associated with oxidative stress and is partly independent of blood pressure (de Gracia *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2006). In our study, proteinuria, a marker for renal damage, was increased in DOCA-salt rats and only epicatechin treatment at the dose which reduces

systemic oxidative stress, also reduced protein excretion at values similar to that found in control rats.

Sustained high blood pressure is a powerful determinant of cardiac and renal hypertrophy development (Frohlich *et al.*, 1992). In fact, DOCA-salt hypertensive rats showed increased cardiac, left ventricular and kidney weight indices as compared to normotensive control rats. However, epicatechin treatment not reduces significantly any of these indices, despite its preventive effect on the development of hypertension. Thus, we found that dissociation between high blood pressure and cardiac hypertrophy exists in this model of hypertension, showing the involvement of another important trophic stimulus, which was unaffected by drugs with antioxidant properties, such as epicatechin (present results), red wine polyphenols or apocynin (Jimenez *et al.*, 2007), or by drugs without antioxidant properties, such as verapamil (Galisteo *et al.*, 2004). In fact, our group reported that rats receiving the same doses of DOCA used in the present study and drinking water not containing salt, were able to develop renal and cardiac hypertrophy without increasing blood pressure (Wangensteen *et al.*, 2002).

ET-1 is involved in the development of oxidative stress and hypertension in DOCA-salt rats, since ET<sub>A</sub> receptor blockade reduced arterial O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels with a concomitant decrease of SBP (Li *et al.*, 2003). Recently, it has been described that epicatechin reduced plasma ET-1 levels in healthy men (Loke *et al.* 2008) and in the apolipoprotein E (ApoE)(-/-) gene-knockout mouse (Loke *et al.* 2010). In agreement with these results, we found that epicatechin 10 mg kg<sup>-1</sup> treatment is able to prevent hypertension reducing plasma ET-1 levels in this low renin model of hypertension. This inhibitory effect could be mediated via Akt- regulation of the ET-1 promoter, as previously suggested (Reiter *et al.*, 2010). In the present study, both doses of epicatechin abolish the increased aortic intracellular O<sub>2</sub><sup>-</sup> content measured by ethidium fluorescence but only the higher dose reduced plasma ET-1 levels in DOCA-salt rats, showing that other mechanisms could be involved in the protective effects of low doses

of epicatechin in vascular oxidative stress, such as, i) interfering the signalling pathway of ET-1-driven  $O_2^-$  generation, and/or ii) increasing vascular antioxidant systems.

It is well established that ET-1 activates NADPH oxidase to produce vascular  $O_2^-$  generation in DOCA-salt hypertensive rats (Beswick *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003), although ET-1 also increased xanthine oxidase and mitochondrial-derived ROS in this model of hypertension (Callera *et al.*, 2006, Viel *et al.*, 2008). We also found that NADPH oxidase activity is increased in the aorta of DOCA-salt hypertensive rats and that this increase is associated with elevated  $O_2^-$  production. The site accounting for  $O_2^-$  generation by NADPH oxidase is unclear. NADPH oxidase is expressed in endothelial cells, vascular smooth muscle cells and cells in the adventitial layer [Lassegue and Clempus, 2003]. In our *in situ* detection of  $O_2^-$  production study, we found that rings from DOCA-salt rats showed marked staining compared to control rats, and it was distributed in all layers of the aortic wall. We have previously described *in vitro* that 10  $\mu$ M epicatechin, a concentration lower than that found in the rat plasma 1 h after oral administration of 50 mg kg<sup>-1</sup> epicatechin (Baba *et al.*, 2001), reduced NADPH oxidase-driven  $O_2^-$  production stimulated by ET-1 in aortic rings, through ERK1/2 inhibition (Lopez-Sepulveda, *et al.*, 2010). In the present study, both doses of epicatechin prevent the increase in vascular  $O_2^-$  content in DOCA-salt. However, only the higher dose inhibited the increased NADPH oxidase activity in these rats, suggesting that low doses of epicatechin might not reduce the increased vascular  $O_2^-$  production but would increase the antioxidant defenses. The increased NADPH oxidase activity in DOCA-salt have been related to changes in NADPH oxidase subunits found in arteries from DOCA-salt rats, such as the increase in p22<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup> expression (Beswick *et al.*, 2001; Callera *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2007) and/or the increase in p47<sup>phox</sup> membrane translocation (Callera *et al.*, 2006). In fact, we found increased protein expression of p22<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup> in DOCA-salt rats, which was prevented only by 10 mg/kg<sup>-1</sup> epicatechin, suggesting that down-regulation of both subunits is involved in the

reduced vascular NADPH oxidase-driven  $O_2^-$  production found in DOCA-salt rats treated with this dose of epicatechin.

Nuclear factor-E2-related factor-2 (Nrf2) is a transcription factor that regulates the expression of numerous reactive oxygen species (ROS) detoxifying and antioxidant genes. Recent studies suggest that the Nrf2/antioxidant response element (ARE) pathway can be activated both pharmacologically and by dietary means (Pearson *et al.*, 2008). Under basal nonactivated conditions, Nrf2 interacts with Kelch-like erythroid cell-derived protein 1 (Keap-1), a cytosolic repressor protein, and limits Nrf2-mediated gene expression. Upon activation, the Keap-1-Nrf2 complex is dissociated and Nrf2 triggers the expression of genes mediated by the ARE to attenuate cellular oxidative stress. When Nrf2 is released from Keap-1 and translocates to the nucleus, it binds to ARE and activates ARE-dependent transcription of phase II and antioxidant defense enzymes, including NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and heme oxygenase-1 (Hmox1). The Nrf2/ARE pathway also controls the expression of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase (GCLC), the rate-limiting enzyme for glutathione (GSH) synthesis. Recently, it has been described that acute treatment with epicatechin (10  $\mu$ M) increased nuclear translocation of Nrf2 and nuclear content of phosphorylated Nrf2 in HepG2 cells (Granado-Serrano *et al.*, 2010). In the present study we showed for the first time that chronic epicatechin increased Nrf2 and Nrf2 target genes (NQO1, GCLC and HMOX) expression in vascular wall. The mechanisms involved in this effect are unclear. ROS seem to play an important role in Nrf2 activation, since low ROS levels induce Nrf2 (Glorie *et al.*, 2006). However, in aorta from control rats treated with epicatechin the increased Nrf2/ARE pathway seems unrelated to changes in ROS production. Additionally, it should be mentioned that increased PI3K/AKT activity has been linked to the activation of Nrf2 induced by epicatechin in astrocytes (Bahia *et al.*, 2008) and HepG2 cells (Granado-Serrano *et al.*, 2010). We also found that chronic epicatechin increased Akt phosphorylation in the aorta, which would be involved in Nrf2 upregulation. In control hypertensive DOCA-salt rats we also found Nrf2 upregulation

as compared to normotensive control rats, despite lower Akt phosphorylation, which is in agreement with increased HMOX in the vasculature in the DOCA-salt model of hypertension in rats (Nath *et al.*, 2007). This increase in Nrf2 pathway is consistent with increased NADPH oxidase-driven  $O_2^-$  generation found in DOCA-salt, and seems to be a countervailing mechanism to protect vessels to the oxidative injury (Nath *et al.*, 2007). In our experiments, epicatechin at dose of  $2 \text{ mg kg}^{-1}$ , which was unable to reduce vascular  $O_2^-$  production, also increases Nrf2 pathway in DOCA-salt rats, leading to reduced  $O_2^-$  content in vessel. However, the increase in Nrf2 activity evoked by  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  epicatechin in control rats would be reduced its inhibitory effects in  $O_2^-$  production in DOCA-salt rats, despite increased AKT phosphorylation found in these vessels. These results suggest that epicatechin is more potent stimulator of Nrf2/ARE pathway than inhibitor of NADPH oxidase-driven  $O_2^-$  production and that the former effect might be modulated the local vascular oxidative status.

Our findings are compatible with previous studies showing that endothelium-dependent vasodilator response induced by acetylcholine is altered in conductance vessels in DOCA-salt hypertension (Somers *et al.*, 2000; Galisteo *et al.*, 2004; Jimenez *et al.*, 2007; Nath *et al.*, 2007). The increase in vascular  $O_2^-$  has been shown to impair endothelium-dependent NO-mediated vascular relaxation by inactivating endogenous NO (Rajagopalan *et al.*, 1996). Thus, the local balance between  $O_2^-$  and NO in the vascular wall may substantially alter vascular tone. Our results confirm the essential role of vascular  $O_2^-$  content in endothelial dysfunction showed by aortic rings from DOCA-salt rats, since chronic epicatechin improves the relaxant response induced by acetylcholine, possibly reducing aortic  $O_2^-$  content and protecting NO from inactivation. Endothelial dysfunction was unrelated with changes in guanylate cyclase-cGMP pathway, since responses to the NO donor, sodium nitroprusside, were unchanged. Alternatively, changes in the expression of endothelial NO synthase induced by chronic epicatechin would be involved in their protective effects in endothelial function in this low-renin mineralcorticoid hypertension. However, we observed that total eNOS

expression was unchanged in aorta from DOCA-salt rats, which were also unaffected by epicatechin. By contrast, in agreement with Lima *et al.*, (2009) phosphorylated eNOS levels were decreased in aortas from DOCA-salt group, and significantly increased in all groups treated with epicatechin. This increase in Akt-eNOS pathway induced by epicatechin would be involved in the increased aortic contraction to phenylephrine found in intact aorta from DOCA-salt rats treated with epicatechin and incubated with the eNOS inhibitor L-NAME, an indirect index of eNOS activity.

In conclusion, these results clearly demonstrate that chronic treatment with the epicatechin reduces hypertension and endothelial dysfunction in this model of DOCA-salt hypertension. The antihypertensive effect is most likely due to the ability of epicatechin to prevent systemic oxidative stress and reduce plasma levels of ET-1. Moreover, epicatechin also improves endothelial function preventing vascular oxidative stress by inhibiting NADPH oxidase activity and/or by increasing Nrf2/ARE-dependent transcription of phase II and antioxidant defence enzymes in hypertensive rats and by increasing Akt-eNOS pathway. These data suggest that the cardiovascular protection associated with diets rich flavonoids-containing food may in part be the result of flavanols intake, such as epicatechin.

### 3. Effects of epicatechin in L-NAME hypertension.

Administration of L-NAME in drinking water induces a progressive increase in arterial blood pressure which is attributed to a reduced synthesis of the vasodilator NO and has been widely used as a model of chronic hypertension (Zatz and Baylis, 1998). The present study shows for the first time that a single oral daily dose of epicatechin (2 or 10 mg kg<sup>-1</sup>) partially or fully prevented most of the effects induced by L-NAME such as a) increases in the left ventricular hypertrophy, b) proteinuria, c) renal histological lesions, d) increased plasma MDA concentrations and urinary iso-PGF<sub>2α</sub> excretion, e) increased endothelium-dependent contraction and COX-2 overexpression, f) increased vascular production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and NADPH oxidase activity, g) increased vascular inflammatory status. In most cases these effects were dose-dependent. However, it did not inhibit the development of hypertension and had only minor effects on the impaired endothelium- and NO-dependent relaxation.

Epicatechin, at concentrations >30 μM, exhibits vasodilator effects *in vitro*, which are partially endothelium- and NO-dependent (Chen *et al.*, 2002). Epicatechin activates eNOS in human coronary artery endothelial cells by i) Ser-633 and Ser-1170 phosphorylation and Thr-495 dephosphorylation, and ii) via Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II pathways, leading to increased NO production (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2010). Moreover, epicatechin and its two *in situ* O-methylated metabolites elevate NO in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase (Steffen *et al.*, 2007). However, it is predictable that this acute effect was absent *in vivo* in animals treated with L-NAME, because: 1) the concentrations of epicatechin in plasma after 2 or 10 mg kg<sup>-1</sup> epicatechin (Piskula and Terao, 1998), are below its active range of concentrations as vasodilators, and 2) its relaxant response would be small under conditions of inhibited eNOS. Therefore, the lack of antihypertensive effect of epicatechin in this model of hypertension may be related, at least in part, to the absence of acute vasodilator effect.

*Renal and cardiac injury*

Renal injury has been consistently reported after chronic inhibition of NO synthesis (Zatz y Baylis, 1998). In our study, the L-NAME group presented moderate/severe kidney injury, especially in the vasculature, and with low tubular casts and mild tubular atrophy. The main and most intense vascular lesion in L-NAME rats was hyaline arteriopathy and thickening of vascular wall (proliferative arteriopathy) with moderate decrease of lumen, which was observed almost always in medium-sized vessels. These histological findings were associated with proteinuria, indicating functional impairment of the glomerular wall barrier. Epicatechin, at higher dose used, partially prevented renal parenchyma and vascular lesions and proteinuria, indicating that epicatechin protects, at least partially, from L-NAME-induced renal injury, despite the lack of antihypertensive effect. A modest left ventricular hypertrophy have also been found in this model of hypertension (Bartunek *et al.*, 2000). In our study, the heart and left ventricular weight indices were significantly increased in L-NAME-treated rats and these effects were significantly prevented by 10 mg kg<sup>-1</sup> epicatechin. These protective effects would be at least partly due to a reduction in ROS and proinflammatory cytokines induced by epicatechin, which are potent stimulus for cardiac growth and renal injury (Li *et al.*, 2002; Vaziri, 2004).

*Endothelial dysfunction, NO and COX-derived vasoconstrictors*

Administration of L-NAME is associated with endothelial dysfunction (Bryan *et al.*, 1995; Zanchi *et al.*, 1995; Moreau *et al.*, 1997; Zatz and Baylis, 1998). As expected, L-NAME treated rats showed reduced endothelium-dependent vasodilator responses induced by acetylcholine in both small arteries and in aorta, with similar endothelium-independent relaxant response to the NO donor nitroprusside. Epicatechin 10 mg kg<sup>-1</sup> only weakly prevented this effect in both vascular beds, without affecting NO sensitivity, since it did not modify the vasodilation induced by nitroprusside.

L-NAME inhibits the constitutive  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NOS isoforms (eNOS and nNOS) and the  $\text{Ca}^{2+}$ -independent inducible NOS isoform (iNOS). However, these inhibitory effects on NOS activity were associated with increased eNOS expression in aortic tissues, which may be viewed as a compensatory mechanism to maintain the production of bioactive NO in the face of increased oxidant stress (Vazziri *et al.*, 1999; Zhen *et al.*, 2008). Epicatechin reduced eNOS gene and protein overexpression, possibly as a result of the reduced vascular superoxide levels in the aortae. Interestingly, we also found an increased eNOS phosphorylation of Ser1177, associated with an increased vascular AKT phosphorylation in both groups of rats treated with epicatechin. These *in vivo* results are consistent with previous *in vitro* observations showing epicatechin-induced eNOS activation via PI3K/AKT-mediated phosphorylation in human endothelial cells (Yamakuchi *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2010).

In addition, increased endothelium-dependent vasoconstriction induced by acetylcholine in the presence of L-NAME in the organ chamber was also observed in aorta from L-NAME treated rats. These contractions have been previously attributed to increased endothelial release of COX-derived vasoconstrictor prostanoids (such as  $\text{PGH}_2$  or  $\text{TXA}_2$ ) (Duarte *et al.*, 2002; Belik *et al.*, 2010). Likewise, COX-2 overexpression was found in aorta from L-NAME-treated rats. Epicatechin  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  reduced acetylcholine-induced vasoconstriction and prevented the increase in COX-2, suggesting that epicatechin inhibits the release of COX-derived metabolites by downregulating COX-2. Thus, although chronic epicatechin prevented the secondary changes in endothelial function (due to increased release of endothelial vasoconstrictors) it was unable to restore the primary endothelial defect (i.e. deficient NO production).

*Systemic and vascular reactive oxygen species and inflammatory markers*

ROS have been suggested to contribute to the genesis of atherosclerosis, diabetes, ischaemic heart disease, heart failure and hypertension. The L-NAME model of hypertension has been also associated with increased systemic oxidative stress (Bauersachs *et al.*, 1998; Usui *et al.*, 1999; Duarte *et al.*, 2002). In fact, plasma MDA values which reflect a general index of the oxidative status and lipid peroxidation and the 24 h urinary levels of isoprostane  $F_{2\alpha}$ , a prostaglandin-like compound produced by the reaction of arachidonic acid and superoxide (Belik *et al.*, 2010), were increased in the present study. Epicatechin *in vitro* is known to possess antioxidant properties (van Acker *et al.*, 1996) and reduces the MDA content in erythrocytes from hypertensive patients (Kumar *et al.*, 2010). In agreement with these data, in our experiment, long-term epicatechin treatment reduced plasma MDA levels and the urinary levels of isoprostanes.

In agreement with other models of hypertension (Rajagolapan *et al.*, 1996; Fukai *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 2006), hypertension induced by chronic blockade of NO production was associated with an overproduction of ROS also within the arterial wall (González *et al.*, 2000). In our *in situ* detection of  $O_2^-$  production study, we found that rings from L-NAME group showed marked staining compared to control rats, and it was distributed in all layers of the aortic wall. This overproduction may be due, at least in part, to an increase in NADPH oxidase activity, as suggested by both NADPH-stimulated lucigenin-enhanced chemiluminescence and an increase in  $p22^{phox}$  expression (present results and González *et al.*, 2000). Epicatechin, at both doses, strongly reduced ethidium fluorescence, NADPH oxidase activity, and  $p22^{phox}$  upregulation in aortic rings from L-NAME-treated rats. Similar results in the vascular wall were also described using a higher dose ( $30 \text{ mg kg}^{-1}$ ) of its stereoisomer catechin in prediabetic OLETF rats (Ihm *et al.*, 2009). In our study, chronic NO inhibition also induced increased ERK1/2 phosphorylation, an effect which was prevented by epicatechin and may be involved in its inhibitory effects on NADPH oxidase activity.

Monocyte recruitment is one of the early steps in hypertension-induced arteriosclerosis and perivascular fibrosis (Nicoletti y Michel, 1999). Chronic NO suppression induced an increase in *ex vivo* monocyte endoluminal adhesion and in *in vivo* perivascular macrophage accumulation, in concert with increases in oxidative stress and inflammatory cytokines in the arterial wall (Luvará *et al.*, 1998; Tomita *et al.*, 1998) IL-1 $\beta$ , ICAM-1 and TNF $\alpha$  mRNA levels were increased in the vascular wall of the L-NAME-treated rats, suggesting that proinflammatory signals come from the arterial wall. The expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines are mainly the products of inducible genes that are usually controlled, at least in part, by the redox-sensitive NF- $\kappa$ B pathway (Brand *et al.*, 1997) The increase in oxidative stress in the vascular wall of L-NAME-treated rats probably activates the NF- $\kappa$ B system, which, in turn, induces the expression of proinflammatory cytokines (Hernández-Presa *et al.*, 1997). Our results further support this hypothesis, since epicatechin, which reduced aortic superoxide levels also inhibited the vascular expression of these proinflammatory and proatherogenic markers.

In conclusion, the present study demonstrates that chronic epicatechin treatment, at doses equivalent to those that can be achieved in the human diet, prevented the cardiac hypertrophy, the renal parenchyma and vascular lesions and proteinuria, and blunted the prostanoid-mediated enhanced endothelium-dependent vasoconstrictor responses in the model of chronic inhibition of NO synthesis with L-NAME. Furthermore, epicatechin also reduced the vascular oxidative stress and proinflammatory status, early events involved in atherosclerosis development.



**Conclusiones.**

---



1. Los polifenoles del vino tinto previenen la disfunción endotelial originada por ET-1 en anillos aórticos de rata. 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<sup>phox</sup>, que conduce a una menor actividad NADPH oxidasa. Estos efectos parecen ser independientes de la activación de ER $\alpha$  y PPAR $\gamma$  y estar relacionados con la inhibición de la proteína cinasa activada por mitógeno, ERK1/2.
2. La epicatequina contenida en la mezcla de polifenoles del vino tinto juega un papel clave en estos efectos protectores, ya que es capaz de reducir por sí sola la sobreexpresión de la subunidad citosólica p47<sup>phox</sup>, que conduce a una menor actividad NADPH oxidasa y a una menor generación de radicales  $O_2^-$ . El efecto preventivo de la epicatequina sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1 se puede deber a su capacidad de inhibir ERK 1/2.
3. El tratamiento crónico con epicatequina a dosis algo superiores a las que se consumen en la dieta humana, previene el desarrollo de hipertensión y disfunción endotelial en ratas tratadas con DOCA-sal. Este efecto protector se debe, posiblemente, a la capacidad de la epicatequina para prevenir el estrés oxidativo sistémico y reducir los niveles plasmáticos de ET-1. La mejora de la función endotelial es consecuencia del aumento en la biodisponibilidad de NO derivado de la reducción del estrés oxidativo vascular. La inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa y/o el incremento de la transcripción dependiente de Nrf2/ARE de enzimas de defensa antioxidante en ratas hipertensas parecen ser los responsables de la reducción del contenido vascular de ROS.

4. El tratamiento crónico con epicatequina en el modelo de hipertensión de inhibición crónica de la síntesis de NO con L-NAME previene la hipertrofia cardíaca y renal, las lesiones vasculares renales y la proteinuria, pero no altera el desarrollo de hipertensión. La epicatequina, además, reduce el estrés oxidativo vascular y el estado proinflamatorio, primeros eventos involucrados en el desarrollo de la aterosclerosis. El déficit de respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio y NO sólo se reduce levemente cuando se administra epicatequina a la dosis de  $10 \text{ mg/Kg}^{-1}$ . Este efecto puede ser consecuencia de la disminución en la producción endotelial de prostanoídes vasoconstrictores derivados de la COX.

**Conclusions.**

---



1. Red wine polyphenols prevent ET-1-induced endothelial dysfunction in rat aortic rings. This effect is related to the reduction of vascular  $O_2^-$  production through down-regulation of the cytosolic subunit p47<sup>phox</sup>, which results in reduced NADPH oxidase activity. These effects seem to be independent of ER $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activation and related to ERK1/2 inhibition. The epicatechin content of RWPs plays a key role in these protective effects.
2. Chronic treatment with epicatechin reduces hypertension and endothelial dysfunction in the model of DOCA-salt hypertension. The antihypertensive effect is most likely due to the ability of epicatechin to prevent systemic oxidative stress and reduce plasma levels of ET-1. Moreover, epicatechin also improves endothelial function preventing vascular oxidative stress by inhibiting NADPH oxidase activity and/or by increasing Nrf2/ARE-dependent transcription of phase II and antioxidant defence enzymes in hypertensive rats and by increasing Akt-eNOS pathway.
3. Chronic epicatechin treatment, at doses equivalent to those that can be achieved in the human diet, prevented the cardiac hypertrophy, the renal parenchyma and vascular lesions and proteinuria, and blunted the prostanoid-mediated enhanced endothelium-dependent vasoconstrictor responses in the model of chronic inhibition of NO synthesis with L-NAME. Furthermore, epicatechin also reduced the vascular oxidative stress and proinflammatory status, early events involved in atherosclerosis development.

---

## **Bibliografía.**

---



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

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.

Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Mostefai HA, Tesse A, Mulder P, Rouet P, Desmoulin F, Heymes C, Martínez MC, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa). *PLoS One.* 2009; 4(5):e5557.

Al-Awwadi NA, Bornet A, Azay J, Araiz C, Delbosc S, Cristol JP, Linck N, Cros G, Teissedre PL. Red wine polyphenols alone or in association with ethanol prevent hypertension, cardiac hypertrophy, and production of reactive oxygen species in the insulin-resistant fructose-fed rat. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52:5593-5597.

Alcacer MA, Marques-Lopes I, Fajo-Pascual M, Foncillas JP, Carmona-Torre F, Martinez-Gonzalez MA. Alcoholic beverage preference and dietary pattern in Spanish university graduates: the SUN cohort study. *Eur J Clin Nutr.* 2008; 62:1178-86.

Aldini G, Carini M, Piccoli A, Rossoni G, Facino RM. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life Sci.* 2003; 73:2883-2898.

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

Álvarez-Sala L, Slowing K, Gomez-Serranillos P, et al. Variabilidad del contenido de polifenoles de distintos tipos de vino y su potencial aplicación al conocimiento de sus efectos biológicos. *Med Clin (Barc).* 2000; 114:331-332.

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.

Andriambeloson E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol*. 1997; 120:1053-8.

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

Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, Beliveau R. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 2002; 1542: 209- 220.

Appeldoorn MM, Venema DP, Peters TH, Koenen ME, Arts IC, Vincken JP, Gruppen H, Keijer J, Hollman PC. Some phenolic compounds increase the nitric oxide level in endothelial cells in vitro. *J Agric Food Chem*. 2009; 57:7693-9.

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.

Araim O, Ballantyne J, Waterhouse A, Sumpio BE. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation with red wine and red wine polyphenols. *J Vasc Surg*. 2002; 35:1226-1232.

Araya J, Rodrigo R, Orellana M, Rivera G. Red wine raises plasma HDL and preserves long-chain polyunsaturated fatty acids in rat kidney and erythrocytes. *Br J Nutr*. 2001; 86:189-195.

Athyros VG, Liberopoulos EN, Mikhailidis DP, Papageorgiou AA, Ganotakis ES, Tziomalos K, et al. Association of drinking pattern and alcohol beverage type with the prevalence of metabolic syndrome, diabetes, coronary heart disease, stroke, and peripheral arterial disease in a Mediterranean cohort. *Angiology*. 2008; 58:689-97.

Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension*. 1990; 15:699-703.

Avellone G, Di Garbo V, Campisi D, et al. Effects of moderate Sicilian red wine consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis. *Eur J Clin Nutr*. 2006; 60: 41-47.

Aviram M, Fuhrman B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 957:146-61.

- 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.
- Baba S, Osakabe N, Natsume M, Muto Y, Takizawa T, Terao J. In vivo comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their mixture in orally administered rats. *J Nutr.* 2001; 131(11):2885-91.
- Babál P, Pechánová O, Bernátová I, Stvrtina S. Chronic inhibition of NO synthesis produces myocardial fibrosis and arterial media hyperplasia. *Histol Histopathol.* 1997; 12(3):623-9.
- Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999; 93:1464 -1476.
- Bae EH, Kim IJ, Ma SK, Kim SW. Rosiglitazone prevents the progression of renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2010; 33:255-62.
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, Ray SD, Sen CK, Preuss HG. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 957:260-70.
- Bahia PK, Rattray M, Williams RJ. Dietary flavonoid (-)epicatechin stimulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent anti-oxidant response element activity and up-regulates glutathione in cortical astrocytes. *J Neurochem.* 2008; 106(5):2194-204.
- 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.
- Bartunek J, Weinberg E, Tajima M, Rohrbach S, Katz SE, Douglas PS, et al. Chronic N<sup>g</sup>-nitro-l-arginine methyl ester-induced hypertension: novel molecular adaptation to systolic load in absence of hypertrophy. *Circulation.* 2000; 101:423-429.
- Bauersachs J, Bouloumié A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G. Hydralazine prevents endothelial dysfunction, but not the increase in superoxide production in nitric oxide-deficient hypertension. *Eur J Pharmacol.* 1998; 362:77-81.
- Baumbach GL, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension.* 1989; 13:968-972.
- Bedard K and Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007; 87:245-313.

Belik J, Gonzalez-Luis GE, Perez-Vizcaino F, Villamor E. Isoprostanes in fetal and neonatal health and disease. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48:177-188.

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.

Bernátová I, Pechánová O, Babál P, Kyselá S, Stvrtina S, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282:H942-8.

Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol.* 2004; 555:589-606.

Bertelli AA, Giovannini L, Giannessi D, Migliori M, Bernini W, Fregoni M, et al. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React.* 1995; 17:1-3.

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.

Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension.* 2001; 38:1107-1111.

Bockman CS, Jeffries WB, Pettinger WA, Abel PW. Enhanced release of endothelium-derived relaxing factor in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension.* 1992; 20:304-313.

Boffetta P, Garfinkel L. Alcohol drinking and mortality among men enrolled in an American Cancer Society prospective study. *Epidem.* 1990; 1:337-339.

Böhm F and Pernow J. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2007; 76:8-18.

- 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 y Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium derived nitric oxide. *J Clin Invest*. 1990; 85:587-90.
- Bousette N, Giaid A. Endothelin-1 in atherosclerosis and other vasculopathies. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003; 81:578-87.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.
- Brand K, Page S, Walli AK, Neumeier D, Baeuerle PA. Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis. *Exp Physiol*. 1997; 82:297-304.
- Brenna O, Pagliarini E. Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *J Agric Food Chem*. 2001; 49:4841-4844.
- Broekmans WM, Klöpping-Ketelaars WA, Kluft C, van den Berg H, Kok FJ, van Poppel G. Fruit and vegetables and cardiovascular risk profile: a diet controlled intervention study. *Eur J Clin Nutr*. 2001; 55:636-42.
- Broncel M, Kozirog M, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Chojnowska-Jeziarska J. Aronia melanocarpa extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit*. 2010; 16:28-34.
- 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.
- Bryan RM Jr, Steenberg ML, Eichler MY, Johnson TD, Swafford MW, Suresh MS. Permissive role of NO in alpha 2-adrenoceptor-mediated dilations in rat cerebral arteries. *Am J Physiol*. 1995; 269(3 Pt 2):H1171-4.
- 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.

Buijsse B, Feskens EJ, Kok FJ, Kromhout D. Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Arch Intern Med.* 2006; 27; 166(4):411-7.

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

Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension.* 2000; 35:746-51.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000; 87:840-844.

Callera GE, Montezano AC, Touyz RM, Zorn TM, Carvalho MH, Fortes ZB, Nigro D, Schiffrin EL, Tostes RC. ETA receptor mediates altered leukocyte-endothelial cell interaction and adhesion molecules expression in DOCA-salt rats. *Hypertension.* 2004; 43:872-9.

Callera GE, Tostes RC, Yogi A, Montezano AC, Touyz RM. Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. *Clin. Sci. (Lond.)* 2006; 110:243-253.

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.

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.

Carbonneau MA, Leger CL, Monnier L, Bonnet C, Michel F, Fouret G, Dedieu F, Descomps B. Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein Cu(2+)-oxidizability: possible explanation by phenolic location. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1997; 51:682- 690.

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.

Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:622-629.

Castilla P, Echarri R, Davalos A, Cerrato F. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 84:252-262.

Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2</sup> mobilization. *Circ Res.* 1997; 81:885-892.

Cediel E, Sanz-Rosa D, Oubina MP, de las Heras N, González Pacheco FR, Vegazo O, Jiménez J, Cachofeiro V, Lahera V. Effect of AT1 receptor blockade on hepatic redox status in SHR: possible relevance for endothelial function? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 285:R674-81.

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.

Chalopin M, Tesse A, Martínez MC, Rognan D, Arnal JF, Andriantsitohaina R. Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium. *PLoS One.* 2010; 5:e8554.

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.

Chan SL, Tabellion A, Bagrel D, Perrin-Sarrado C, Capdeville-Atkinson C, Atkinson J. Impact of chronic treatment with red wine polyphenols (RWP) on cerebral arterioles in the spontaneous hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008; 51:304-10.

Chatziantoniou C, Daniels FH, Arendshorts WJ. Exaggerated renal vascular reactivity to angiotensin and thromboxane in young genetically hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1990; 259:F372-F382.

Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension*. 2001; 38:606-611.

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.

Chen ZY, Yao XQ, Chan FL, Lau CW, Huang Y. (-)epicatechin induces and modulates endothelium-dependent relaxation in isolated rat mesenteric artery rings. *Acta Pharmacol Sin*. 2002; 23(12):1188-92.

Cishek MB, Galloway MT, Karim M, German JB, Kappagoda CT. Effect of red wine on endothelium-dependent relaxation in rabbits. *Clin. Sci. (Lond.)*. 1997; 93:507- 511.

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.

Cordellini S, Carvalho MH, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D. Indirect evidence for an endothelium-derived contracting factor release in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens*. 1990; 8:53-60.

Cordellini S. Endothelial dysfunction in DOCA-salt hypertension: possible involvement of prostaglandin endoperoxides. *Gen Pharmacol*. 1999; 32:315-20.

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

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

Criqui MH, Ringel BL. Does diet or alcohol explain the French paradox? *Lancet*. 1994; 344:1719-23.

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.

Cuman RKN, Nigro D, Carvalho MHC, Scivoletto R, Fortes ZB. Influence of enalapril treatment on the vascular reactivity of DOCA-salt hypertensive rats. *Endothelium*. 1994; 2, 105-111.

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.

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, 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.

Dávalos A, de la Peña G, Sánchez-Martín CC, Teresa Guerra M, Bartolomé B, Lasunción MA. Effects of red grape juice polyphenols in NADPH oxidase subunit expression in human neutrophils and mononuclear blood cells. *Br J Nutr*. 2009; 19:1-11.

Davignon J and Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 15;109(23 Suppl 1):III27-32.

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

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 Gracia MC, Osuna A, O'Valle F, del Moral RG, Wangenstein R, del Rio CG, Vargas F. Deoxycorticosterone suppresses the effects of losartan in nitric oxide-deficient hypertensive rats. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2000; 11:1995-2000.

De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Boucher F, Paillard F, de Leiris J. Wine drinking and risks of cardiovascular complications after recent acute myocardial infarction. *Circulation*. 2002; 106:1465-9.

De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*. 1999; 99:779-85.

De Lorimier AA. Alcohol, wine, and health. *Am J Surg.* 2000; 180:357-61.

Deckert, V., Persegol, L., Viens, L., Lizard, G., Athias, A., Lallemand, C., Gamber, P., Lagrost, L. Inhibitors of arterial relaxation among components of human oxidized low-density lipoproteins. Cholesterol derivatives oxidized in position 7 are potent inhibitors of endothelium-dependent relaxation. *Circulation.* 1997; 95, 723- 731.

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.

Demrow HS, Slane PR, Folts JD. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation.* 1995; 91:1182-1188.

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.

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

Di Castelnuovo A, Rotondo S, Iacoviello L, Donati MB, de Gaetano G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation.* 2002; 105:2836-44.

Diebolt M, Bucher B, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension.* 2001; 38:159-65.

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, Galisteo M, Ocete MA, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J: effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2001a; 221:155-160.

Duarte J, Jiménez R, O'Valle F, Galisteo M, Pérez-Palencia R, Vargas F, Pérez-Vizcaíno 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, Pérez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Pérez-Vizcaíno F, Zarzuelo A, et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2001b; 133:117-124.

Duarte J, Pérez-Vizcaíno F, Utrilla P, Jiménez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol.* 1993; 24:857-862.

Duarte J, Pérez-Vizcaíno F, Zarzuelo A, Jiménez J, Tamargo J. Vasodilator effects of quercetin on isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1993; 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, 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.

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.

Duthie GG, Pedersen MW, Gardner PT, Morrice PC, Jenkinson AM, McPhail DB, Steele GM. The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1998; 52, 733- 736.

Dworkin LD, Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM. Hemodynamic basis for glomerular injury in rats with desoxycorticosterone-salt hypertension. *J Clin Invest.* 1984; 73:1448-1461.

El Bedoui J, Oak MH, Anglard P, Schini-Kerth VB. Green tea extract strongly prevents thrombin-induced pro-MMP-2 expression and its conversion to MMP-2 by directly inhibiting MT1-MMP in vascular smooth muscle cells. *Fund. Clin. Pharmacol.* 2004; 18, 243.

El Benna J, Faust LP, Babior BM. The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem.* 1994; 269:23431-6.

Elijovich F, Laffer CL, Amador E, Gavras H, Bresnahan MR, Schiffrin EL. Regulation of plasma endothelin by salt in salt-sensitive hypertension. *Circulation.* 2001; 103:263-268.

Elmarakby AA, Loomis ED, Pollock JS, Pollock DM. NADPH oxidase inhibition attenuates oxidative stress but not hypertension produced by chronic ET-1. *Hypertension.* 2005; 45:283-287.

El-Mohsen M, Bayele H, Kuhnle G, Gibson G, Debnam E, Kaila Srani S, Rice-Evans C, Spencer JP. Distribution of [<sup>3</sup>H]trans-resveratrol in rat tissues following oral administration. *Br J Nutr.* 2006; 96:62-70.

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.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation product: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Method Enzymol.* 1990; 186: 407-421.

Fang Z, Carlson SH, Chen YF, Oparil S, Wyss JM. Estrogen depletion induces NaCl-sensitive hypertension in female spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 281: R1934-R1939.

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.

Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291:H985-1002.

Femia R, Natali A, L'Abbate A, Ferrannini E. Coronary atherosclerosis and alcohol consumption: angiographic and mortality data. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:1607-12.

Fenoy FJ, Milicic I, Smith RD, Wong PC, Timmermans PB, Roman R. Effects of dup 753 on renal function of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1991; 4:321-326.

Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem*. 1996; 271:22810 -22814.

Ferrara, N., Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev*. 1997; 18:4- 25.

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.

Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J Hypertens*. 2003; 21(12):2281-6.

Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am. J. Physiol*. 1993; 265:H774-H778.

Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Ricci T, Jantzen P, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995; 26:90-5.

Flesch M, Rosenkranz S, Erdmann E, Böhm M. Alcohol and the risk of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2001; 96:128-35.

Flesch M, Schwarz A, Böhm M: effects of red wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. *Am J Physiol*. 1998; 275: h1183-h1190.

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

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

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.

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet.* 1993; 341:454-7.

Freedman JE, Parker C III, Li L, et al. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation.* 2001; 103:2792-2798.

Friedman LA, Kimball AW. Coronary heart disease mortality and alcohol consumption in Framingham. *Am J Epidemiol.* 1986; 124:481-9

Frohlich ED, Apstein C, Chobanian AV, Devereux RB, Dustan HP, Dzau V, Fauad-Tarazi F, Horan MJ, Marcus M, Massi B, Pfefer M, Re R, Roccella E, Savage D, Shub C. The heart in hypertension. *N. Engl. J. Med.* 1992; 327:998-1008.

Fu M, Zhang J, Zhu X, Myles DE, Willson TM, Liu X, Chen YE. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with Smad3. *J Biol Chem.* 2001; 276:45888-94.

Fuhrman B, Aviram M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2001; 12:41-48.

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

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

Fukuhara K, Miyata N. Resveratrol as a new type of DNA cleaving-agent. *Bioorg Med Chem Lett.* 1998; 8:3187-3192.

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.

Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 299:818-824.

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

Galisteo M, García-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, García-Saura MF, Jiménez R, Villar IC, Zarzuelo A, Vargas F, Duarte J. Effects of chronic quercetin treatment on antioxidant defence system and oxidative status of deoxycorticosterone acetate-salt-hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2004b; 259(1-2):91-9.

García-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.

Gavras H, Brunner HR, Laragh JH, Vaughan ED Jr, Koss M, Cote LJ, Gavras I. Malignant hypertension resulting from deoxycorticosterone acetate and salt excess: role of renin and sodium in vascular changes. *Circ. Res.* 1975; 36:300-309.

Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:14138-14143.

Ghosh M, Wang HD, McNeill JR. Role of oxidative stress and nitric oxide in regulation of spontaneous tone in aorta of DOCA-salt hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 2004; 141:562-573.

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.* 1993; 328:1732-9.

Gilligan DM, Badar DM, Panza JA, Quyyumi AA, Cannon RO III. Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation.* 1994; 90:786 -791.

Givertz MM, Colucci WS. New targets for heart-failure therapy: endothelin, inflammatory cytokines, and oxidative stress. *Lancet.* 1998; 352:SI34-38.

Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 2006; 30;72(11):1493-505.

Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation.* 2002; 105:1567-72.

Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, Vita JA. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41:1769-75.

Gómez-Amores L, Mate A, Miguel-Carrasco JL, Jiménez L, Jos A, Cameán AM, Revilla E, Santa-María C, Vázquez CM. L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. *J Nutr Biochem.* 2007; 18:533-40.

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

Gonthier MP, Cheynier V, Donovan JL, Manach C, Morand C, Mila I, Lapiere C, Remesy C, Scalbert A. Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J. Nutr.* 2003; 133:461-467.

Gonzalez W, Fontaine V, Pueyo ME, Laquay N, Messika-Zeitoun D, Philippe M, Arnal JF, Jacob MP, Michel JB. Molecular plasticity of vascular wall during N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation of proinflammatory signals. *Hypertension.* 2000; 36:103-109.

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.

Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N; HERS Research Group. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA*. 2002; 288:49 -57.

Graham RM, Pettinger WA, Sagalowsky A, Brabson J, Gandler T. Renal alpha-adrenergic receptor abnormality in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1982; 4:881-7.

Granado-Serrano AB, Martín MA, Haegeman G, Goya L, Bravo L, Ramos S. Epicatechin induces NF-kappaB, activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor erythroid 2p45-related factor-2 (Nrf2) via phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and extracellular regulated kinase (ERK) signalling in HepG2 cells. *Br J Nutr*. 2010; 103(2):168-79.

Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Method Enzymol*. 1996; 268: 142-151.

Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81(3):611-4.

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

Green DM, Coleman DH, McCabe M. Mechanisms of desoxycorticosterone action; relation of sodium chloride intake to fluid exchange pressor effects and survival. *Am J Physiol*. 1948; 154:465-474.

Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation*. 1997; 96:3264-3265.

Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 1993; 87:1816 -1828.

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

Gronbaek M, Becker U, Johansen D, Gottschau A, Schnohr P, Hein HO, et al. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer. *Ann Intern Med.* 2000; 133:411-9.

Gronbaek M. Alcohol, type of alcohol, and all-cause and coronary heart disease mortality. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 957:16-20.

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

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

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.

Hall CE, Hall O. Methylandrostenediol hypertension induced without salt excess: observations on organ changes and serum composition. *Am J Pathol.* 1969; 54:489-505.

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.

Harrison, D.G. Endothelial function and oxidant stress. *Clin. Cardiol.* 1997; 20:11- 17.

Hashimoto M, Kim S, Eto M, Iijima K, Ako J, Yoshizumi M, Akishita M, Kondo K, Itakura H, Hosoda K, Toba K, Ouchi Y. Effect of acute intake of red wine on flow-mediated vasodilatation of the brachial artery. *Am J Cardiol.* 2001; 88:1457-60.

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.

Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kuzuya M, Satake S, Ishikawa T, Hidaka H, Iguchi A. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 214:847-855.

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

Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA.* 2003; 27;290(8):1030-1.

Hernández-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation.* 1997; 18;95(6):1532-41.

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.

Hirata K, Shimada K, Watanabe H, Otsuka R, Tokai K, Yoshiyama M, Homma S, Yoshikawa J. Black tea increases coronary flow velocity reserve in healthy male subjects. *Am J Cardiol.* 2004; 1;93(11):1384-8.

Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett.* 1995; 360:291-293.

Hodgson JM, Devine A, Puddey IB, Chan SY, Beilin LJ, Prince RL. Tea intake is inversely related to blood pressure in older women. *J Nutr.* 2003; 133(9):2883-6.

Hodgson JM, Puddey IB, Burke V, Watts GF, Beilin LJ. Regular ingestion of black tea improves brachial artery vasodilator function. *Clin Sci (Lond).* 2002; 102:195-201.

Hollman P, Katan MB. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radical Res.* 1999; 31:S75-S80.

Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76(4):798-804.

Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid 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.

Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol.* 1981; 241:85-93.

Howard A, Chopra M, Thurnham D, Strain J, Fuhrman B, Aviram M. Red wine consumption and inhibition of LDL oxidation: what are the important components? *Med Hypotheses.* 2002; 59:101-4.

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.

Hsieh, T.C., Juan, G., Darzynkiewicz, Z., Wu, J.M. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21(WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. *Cancer Res.* 1999; 59:2596- 2601.

Hu, J.P., Calomme, M., Lasure, A., De Bruyne, T., Pieters, L., Vlietinck, A., Vanden Berghe, D.A. Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. *Biol. Trace Elem. Res.* 1995; 47:327-331.

Huang Y, Chan NW, Lau CW, Yao XQ, Chan FL, Chen ZY. Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-) epicatechin. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 19;1427(2):322-8.

Huang Y, Zhang A, Lau CW, Chen ZY. Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci.* 1998; 63(4):275-83.

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.

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- $\alpha$  and - $\gamma$  activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:45- 51.

Ihm SH, Lee JO, Kim SJ, Seung KB, Schini-Kerth VB, Chang K, Oak MH. Catechin prevents endothelial dysfunction in the prediabetic stage of OLETF rats by reducing vascular NADPH oxidase activity and expression. *Atherosclerosis.* 2009; 206(1):47-53.

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; 101:805-811.

Iijima K, Yoshizumi M, Ouchi Y. Effect of red wine polyphenols on vascular smooth muscle cell function—molecular mechanism of the “French Paradox.” *Mech Aging Dev.* 2002; 123:1033-1039.

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.

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.

Ito S, Carretero OA. Impaired response to acetylcholine despite intact endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide in isolated microperfused afferent arterioles of the spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992; 12:S187-9.

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

Jaimes EA, DeMaster EG, Tian RX, et al. Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1031-1036.

Janszky I, Ericson M, Blom M, Georgiades A, Magnusson JO, Alinagizadeh H, Ahnve S. Wine drinking is associated with increased heart rate variability in women with coronary heart disease. *Heart*. 2005; 91(3):314-8.

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(3):462-73

Jin L, Beswick RA, Yamamoto T, Palmer T, Taylor TA, Pollock JS, Pollock DM, Brands MW, Webb RC. Increased reactive oxygen species contributes to kidney injury in mineralocorticoid hypertensive rats. *J. Physiol. Pharmacol*. 2006; 57:343-357.

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.

Kahler, J.; Mendel, S.; Weckmuller, J.; Orzechowski, H.D.; Mittmann, C.; Koster, R.; Paul, M.; Meinertz, T.; Munzel, T. Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2000; 32:1429-1437.

Kalin R, Righi A, Del Rosso A, Bagchi D, Generini S, Cerinic MM, Das DK. Activin, a grape seed-derived proanthocyanidin extract, reduces plasma levels of oxidative stress and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin) in systemic sclerosis. *Free Radic Res*. 2002; 36:819-25.

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-S90.

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.

Kane MO, Etienne-Selloum N, Madeira SV, Sarr M, Walter A, Dal-Ros S, Schott C, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Endothelium-derived contracting factors mediate the Ang II-induced endothelial dysfunction in the rat aorta: preventive effect of red wine polyphenols. *Pflugers Arch*. 2010; 459:671-9.

- 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.
- Katusić ZS, Shepherd JT. Endothelium-derived vasoactive factors: II. Endothelium-dependent contraction. *Hypertension.* 1991; 18:86-92.
- Keaney JF Jr, Shwaery GT, Xu A, Nicolosi RJ, Loscalzo J, Foxall TL, Vita JA. 17 beta-estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. *Circulation.* 1994; 89:2251-2259.
- Kedzierski RM y Yanagisawa M. Endothelin System: The double-edged sword in health and disease. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41:851-76.
- Keen CL, Holt RR, Oteiza PI, Fraga CG, Schmitz HH. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(1 Suppl):298S-303S.
- Keevil JG, Osman HE, Reed JD, et al. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr* 2000; 130:53-56.
- Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AL. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Hytochem.* 2000; 55:77-85.
- Khan NQ, Lees DM, Douthwaite JA, Carrier MJ, Corder R. Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. *Clin. Sci.* 2002; 103:72S-75S.
- Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Inada Y, Wada T, Ishimura Y, Chatani F, Iwao H. Role of angiotensin II in renal injury of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension.* 1994; 24:195-204.
- Kinlay S, Behrendt D, Fang JC, Delagrangé D, Morrow J, Witztum JL, Rifai N, Selwyn AP, Creager MA, Ganz P. Long-term effect of combined vitamins E and C on coronary and peripheral endothelial function. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43:629-34.
- 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.
- Kitamoto S, Egashira K, Kataoka C, Usui M, Koyanagi M, Takemoto M, Takeshita A. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats increases aortic superoxide anion production via the action of angiotensin II. *J. Hypertens.* 2000; 18:1795-1800.

Kitts DD, Yuan YV, Godin DV. Plasma and lipoprotein lipid composition and hepatic antioxidant status in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998; 76:202-209.

Klatsky AL, Armstrong MA, Friedman GD. Alcohol and mortality. *Ann Intern Med.* 1992; 117:646-54.

Klatsky AL, Armstrong MA, Friedman GD. Red wine, white wine, liquor, beer, and the risk for coronary artery disease hospitalization. *Am J Cardiol.* 1997; 80:416-20.

Klatsky AL, Friedman GD, Siegelau AB. Alcohol use and cardiovascular disease: the Kaiser-Permanente experience. *Circulation.* 1981; 64:32-41

Koga H, Terasawa H, Nunoi 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.

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.

Konieczkowski M, Dunn MJ, Stork JE, Hassid A. Glomerular synthesis of prostaglandins and thromboxane in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1983; 5:446-452.

Korsgaard N, Christensen KL, Mulvany MJ. Cellular morphology in mesenteric resistance vessels from antihypertensive treated spontaneously hypertensive rats. *Basic Res Cardiol.* 1991; 1:33-41.

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.

Kozararevic D, McGee D, Vojvodic N, Racic Z, Dawber T, Gordon T, Zukel W. Frequency of alcohol consumption and morbidity and mortality: The Yugoslavia Cardiovascular Disease Study. *Lancet.* 1980; 1:613-6.

Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:15-21.

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.

Kuhlmann D, Ragan C, Ferrebee JW, Atchley DW, Loeb RF. Toxic effects of desoxycorticosterone esters in dogs. *Science*. 1939; 90:496-497.

Kumar KV, Das UN. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commun*. 1993; 19:59-66.

Kumar N, Kant R, Maurya PK. Concentration-dependent effect of (-) epicatechin in hypertensive patients. *Phytother Res*. 2010; 24:1433-1436.

Kuneš J, Hojná S, Kadlecová M, Dobešová Z, Rauchová H, Vokurková M, Loukotová J, Pecháňová O, Zicha J: altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: the role of relative NO deficiency. *Physiol Res*. 2004; 53: S23-S34.

Lacour C, Canals F, Galindo G, Cazaubon C, Segondy D, Nisato D. Efficacy of SR 47436 (BMS-186295), a non-peptide angiotensin AT1 receptor antagonist in hypertensive rat models. *Eur. J. Pharmacol*. 1994; 264:307-316.

Lahera V, Navarro J, Biondi ML, Ruilope LM, Romero JC. Exogenous cGMP prevents decrease in diuresis and natriuresis induced by inhibition of NO synthesis. *Am J Physiol* 1993; 264:F344-F347.

Lancaster JR. Nitric oxide in cell. *Am Sci*. 1992; 80: 248-249.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003; 111:1201-9.

Landmesser U, Harrison DG. Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Ox marks the spot. *Circulation*. 2001; 104:2638-2640.

Laplante MA, Wu R, El Midaoui A, de Champlain J. NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. 2003; 21(5):927-36.

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.

- Larivière R, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1993; 21:294-300.
- Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003; 285:R277-R297.
- Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation*. 2002; 106:1614-1617.
- Letizia C, Cerci S, De Toma G, D'Ambrosio C, De Ciocchis A, Coassin S, Scavo D. High plasma endothelin-1 levels in hypertensive patients with low-renin essential hypertension. *J. Hum. Hypertens*. 1997; 11:447-451.
- Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J. Pathol.* 2000; 190:244-254.
- Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension*. 2002; 40:477-484.
- Li JM, Shah AM. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem*. 2003; 278:12094-12100.
- Li L, Fink GD, Watts SW, Northcott CA, Galligan JJ, Pagano PJ, Chen AF. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation*. 2003a; 107:1053-1058.
- Li L, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. Vasopressin induces vascular superoxide via endothelin-1 in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*. 2003b; 41:663-668.
- Li L, Watts SW, Banes AK, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced vasoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*. 2003c; 42:316-321.
- Liang YC, Tsai SH, Tsai DC, Lin-Shiau SY, Lin LK. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett*. 2001; 496:12-8.

Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Walsh BW, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, Creager MA. Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Ann Intern Med.* 1994; 121:936-941.

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.

Lima VV, Giachini FR, Choi H, Carneiro FS, Carneiro ZN, Fortes ZB, Carvalho MH, Webb RC, Tostes RC. Impaired vasodilator activity in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is associated with increased protein O-GlcNAcylation. *Hypertension.* 2009; 53(2):166-74.

Liu JC, Chen JJ, Chan P, Cheng CF, Cheng TH. Inhibition of cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression by resveratrol. *Hypertension.* 2003; 42:1198-1205.

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

Loke WM, Hodgson JM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Puddey IB, Croft KD. Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88:1018-25.

Loke WM, Proudfoot JM, Hodgson JM, McKinley AJ, Hime N, Magat M, Stocker R, Croft KD. Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(4):749-57.

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.

Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden Lopez-Ongil S, Saura M, Zaragoza C, Gonzalez-Santiago L, Rodriguez-Puyol M, Lowenstein CJ, Rodriguez-Puyol D. Hydrogen peroxide regulation of bovine endothelin-converting enzyme-1. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 32:406-413.

López-Sepúlveda R, Jiménez R, Romero M, Zarzuelo MJ, Sánchez M, Gómez-Guzmán M, Vargas F, O'Valle F, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Wine polyphenols improve endothelial function in large vessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2008; 51(4):1088-95.

Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*. 1999; 99:779-85.

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

Lückhoff A, Pohl U, Mülsch A, Busse R. Differential role of extra and intracellular calcium in the release of edrf and prostacyclin from cultured endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 1988; 95:189-196.

Lüscher TF, Raij L, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. *Hypertension*. 1987; 9:157-63.

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

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

Luvarà G, Pueyo ME, Philippe M, Mandet C, Savoie F, Henrion D, Michel JB. Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotensin II antagonism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18(9):1408-16.

Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology*. 2006; 21:269-80.

Maiti, T.K., Chatterjee, J., Dasgupta, S. Effect of green tea polyphenols on angiogenesis induced by an angiogenin-like protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2003; 308, 64- 67.

Makino A, 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-242S.

Marmot MG, Rose G, Shipley MJ, Thomas BJ. Alcohol and mortality: explaining the U-shaped curve. *Lancet.* 1981; 1:580-583

Marques-Vidal P, Cambou JP, Nicaud V, et al. Cardiovascular risk factors and alcohol consumption in France and Northern Ireland. *Atherosclerosis.* 1995; 115:225-232.

Martin S, Andriambelason E, Takeda K, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *Br J Pharmacol.* 2002; 135: 1979-1987.

Martín-Carrón N, Goñi I, Larrauri JA, et al. Reduction in serum total and LDL cholesterol concentrations by a dietary fiber and polyphenol-rich grape product in hypercholesterolemic rats. *Nutr Res.* 1999; 19:1371-1381.

Maschio G, Oldrizzi L, Tessitore N, D'Angelo A, Valvo E, Lupo A, Loschiavo C, Fabris A, Gammaro L, Rugiu C, Panzetta G. Effects of dietary protein and phosphorus restriction on the progression of early renal failure. *Kidney Int.* 1982; 22:371-376.

Matsuyama T, Tanaka Y, Kamimaki I, Nagao T, Tokimitsu I. Catechin safely improved higher levels of fatness, blood pressure, and cholesterol in children. *Obesity (Silver Spring).* 2008; 16(6):1338-48.

Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet. Agric.* 1994; 344:193-4.

Mehta JL, Hu B, Chen J, Li D. Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:2203-8.

Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science.* 2005; 308:1583-1587.

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

Middleton 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.

Miguel-Carrasco JL, Monserrat MT, Mate A, Vázquez CM. Comparative effects of captopril and l-carnitine on blood pressure and antioxidant enzyme gene expression in the heart of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2010; 632:65-72.

Miller VM y 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.

Mitchell JA, Kohlhaas KL, Sorrentino R, Warner TD, Murad F, Vane J. Induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat mesentery: lack of effect on action of vasoconstrictors. *Br J Pharmacol.* 1993; 109:265-270.

Miyamoto Y, Akaike T, Yoshida M, Goto S, Horie H, Maeda H. Potentiation of nitric oxide-mediated vasorelaxation by xantine oxidase inhibitors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996; 211:366-376.

Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol.* 1999; 61:391-415.

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

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

Moreau P, Takase H, Kung CF, Shaw S, Luscher TF. Blood pressure and vascular effects of endothelin blockade in chronic nitric oxide-deficient hypertension. *Hypertension.* 1997; 29:763-769.

Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol.* 1996; 51:1-9.

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.* 2003; 60:S2-S12.

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

Mulvany MJ, Baandrup U, Gundersen HJ. Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector. *Circ Res.* 1985; 57:794-800.

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.

Nagao T, Hase T, Tokimitsu I. A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity (Silver Spring).* 2007 Jun;15(6):1473-83.

Nagao T, Illiano S, Vanhoutte PM. Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am J Physiol.* 1992a; 263:H1090-H1094.

Nagao T, Vanhoutte PM. Hyperpolarisation as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J Physiol.* 1992b; 445:355-67.

Naissides M, Mamo JCL, James AP, et al. The effect of chronic consumption of red wine on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *Atherosclerosis.* 2006; 185:438-445.

Nakano D, Itoh C, Ishii F, Kawanishi H, Takaoka M, Kiso Y, Tsuruoka N, Tanaka T, Matsumura Y. Effects of sesamin on aortic oxidative stress and endothelial dysfunction in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26:1701-5.

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.

Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch Pharm Res.* 2009; 32(8):1103-8.

Nardini M, Scaccini C, Packer L, et al. In vitro inhibition of the activity of phosphorylase kinase, protein kinase C and protein kinase A by caffeic acid and a procyanidin-rich pine bark (*Pinus maritima*) extract. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1474:219-225.

Nath KA, d'Uscio LV, Juncos JP, Croatt AJ, Manriquez MC, Pittock ST, Katusic ZS. An analysis of the DOCA-salt model of hypertension in HO-1<sup>-/-</sup> mice and the Gunn rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293(1):H333-42.

Navarro-Cid J, Maeso R, Perez-Vizcaino F, Cachafeiro V, Ruilope LM, Tamargo J, Lahera V. Effects of losartan on blood pressure, metabolic alterations, and vascular reactivity in the fructose-induced hypertensive rat. *Hypertension.* 1995; 26(6 Pt 2):1074-8.

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.

Ndiaye M, Chataigneau T, Lobysheva I, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols induce endothelium-dependent NO-mediated relaxation in the isolated porcine coronary artery by inducing a PI3kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO synthase. *FASEB J.* 2005; 19:455-7.

Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 2003; 42:29-42.

Nickenig G, Bäumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stäblein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Böhm M. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation.* 1998; 97:2197-2201.

Nicod L, Rodriguez S, Jacqueson A, Viollon-Abadie C, Berthelot A, Richert L. Clofibric acid or diethylmaleate supplemented diet decrease blood pressure in DOCA-salt treated male Sprague Dawley rats--relation with liver antioxidant status. *Mol Cell Biochem.* 2000; 213:65-73.

Nicoletti A, Michel JB. Cardiac fibrosis and inflammation: interaction with hemodynamic and hormonal factors. *Cardiovasc Res.* 1999; 41:532-543.

Nigdikar SV, Williams NR, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68:258-265.

Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH, Scivoletto R. Chronic but not acute treatment with hydralazine reverses the decreased endothelium-dependent responses in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 1989; 11:573-586.

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 74:418- 425.

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; 274:2999-3005.

Numaguchi Y, Harada M, Osanai H, Hayashi K, Toki Y, Okumura K, Ito T, Hayakawa T. Altered gene expression of prostacyclin synthase and prostacyclin receptor in the thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 1999; 41:682-8.

Nunes VW, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH, Zorn TM, Scivoletto R. Influence of enalapril on the endothelial function of DOCA-salt hypertensive rats. *Gen Pharmacol.* 2000; 34:117-125.

Núñez-Córdoba JM, Martínez-González MA, Bes-Rastrollo M, Toledo E, Beunza JJ, Alonso A. Alcohol consumption and the incidence of hypertension in a Mediterranean cohort: the SUN study. *Rev Esp Cardiol.* 2009; 62:633-41.

O'Brien RF, Robbins RJ, McMurtry IF. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J Cell Physiol.* 1987; 132:263-70.

Oak MH, Chataigneau M, Keravis T, Chataigneau T, Beretz A, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, Chang SJ, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenolic compounds inhibit vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003a; 23:1001-1007.

Oak MH, El Bedoui J, Schini-Kerth VB. The red wine anthocyanins, delphinidin and cyanidin, strongly inhibit PDGF $\alpha$ B induced VEGF expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of p38 MAPK pathway. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 2003b; 23:1001-7.

Ogita H, Liao J. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium.* 2004; 11(2):123-32. Review.

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

Ohta K, Kim S, Hamaguchi A, Yukimura T, Miura K, Takaori K, Iwao H. Role of angiotensin II in extracellular matrix and transforming growth factor-beta 1 expression in hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1994; 269, 115-119.

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

Orallo, F., Alvarez, E., Camina, M., Leiro, J.M., Gomez, E., Fernandez, P. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol. Pharmacol.* 2002; 61:294- 302.

Ortíz MC, Fortepiani LA, Ruiz-Marcos FM, Atucha NM, García-Estañ J. Role of AT1 receptors in the renal papillary effects of acute and chronic nitric oxide inhibition. *Am J Physiol.* 1998; 274:R760-6.

Oskarsson HJ, Heistad DD. Oxidative stress produced by angiotensin too. Implications for hypertension and vascular injury. *Circulation.* 1997; 95:557-559.

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

Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, et al. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta.* 1995; 236:207-219.

Pace-Asciak CR, Rounova O, Hahn SE, et al. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin Chim Acta*. 1996; 246:163-182.

Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997; 94:14483-14488.

Pallosi A, Fragasso G, Piatti P, Monti LD, Setola E, Valsecchi G, Galluccio E, Chierchia SL, Margonato A. Effect of oral L-arginine on blood pressure and symptoms and endothelial function in patients with systemic hypertension, positive exercise tests, and normal coronary arteries. *Am J Cardiol*. 2004; 93:933-5.

Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, Mendelsohn ME. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res*. 2002; 90:1087-1092.

Park JW, Choi YJ, Jang MA, et al. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells. *Cancer Lett*. 2001; 163:43-49.

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.

Pasterkamp, G., Schoneveld, A.H., Hijnen, D.J., de Kleijn, D.P., Teepen, H., van der Wal, A.C., Borst, C. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis*. 2000; 150:245- 253.

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 B-E, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 2001; 22:153-83.

Pearson KJ, Lewis KN, Price NL, Chang JW, Perez E, Cascajo MV, Tamashiro KL, Poosala S, Csiszar A, Ungvari Z, Kensler TW, Yamamoto M, Egan JM, Longo DL, Ingram DK, Navas P, de Cabo R. Nrf2 mediates cancer protection but not longevity induced by caloric restriction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 2325-2330.

Pechánová O, Bernatova I, Babal P, Martinez MC, Kysela S, Stvrtina S, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols prevent cardiovascular alterations in L-NAME-induced hypertension. *J. Hypertens.* 2004; 22:1551-1559.

Pechánová O, Zicha J, Paulis L, Zenebe W, Dobesová Z, Kojsová S, Jendeková L, Sládková M, Dovinová I, Simko F, Kunes J. The effect of N-acetylcysteine and melatonin in adult spontaneously hypertensive rats with established hypertension. *Eur J Pharmacol.* 2007; 561:129-36.

Pedro-Botet J, Covas MI, Martín S, Rubiés-Prat J. Decreased endogenous antioxidant enzymatic status in essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2000; 14:343-5.

Peng N, Clark JT, Wei CC, Wyss JM. Estrogen depletion increases blood pressure and hypothalamic norepinephrine in middle-aged spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2003; 41:1164 -1167.

Perret B, Ruidavets JB, Vieu C, et al. Alcohol consumption is associated with enrichment of high-density lipoprotein particles in polyunsaturated lipids and increased cholesterol esterification rate. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002; 26:1134-1140.

Pershadsingh HA, Szollosi J, Benson S, Hyun WC, Feuerstein BG, Kurtz TW. Effects of ciglitazone on blood pressure and intracellular calcium metabolism. *Hypertension.* 1993; 21:1020-3.

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

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

Piech A, Dessy C, Havaux X, Feron O, Balligand JL. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2003; 57: 456 - 467.

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3:639-50.

Pignatelli P, Di Santo S, Buchetti B, et al. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J* 2006; 20:1082-1089.

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.

Poolman TM, Ng LL, Farmer PB, et al. Inhibition of the respiratory burst by resveratrol in human monocytes: correlation with inhibition of PI3K signaling. *Free Radic Biol Med.* 2005; 39:118-132.

Price SF, et al. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *Am J Enol Viticulture.* 1995; 46:187-94.

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, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W, Nawroth PP. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes.* 2000; 49:1561-1570.

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.

Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, et al. Resveratrol arrests cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem Biophys Res Comm.* 1998; 250:53-58.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996; 97:1916-1923.

Ramírez-Sánchez I, Maya L, Ceballos G, Villarreal F. (-)-Epicatechin Activation of Endothelial Cell Endothelial Nitric Oxide Synthase, Nitric Oxide, and Related Signaling Pathways. *Hypertension.* 2010; 55:1398-1405.

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

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.

Reiter CE, Kim JA, Quon MJ. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate reduces endothelin-1 expression and secretion in vascular endothelial cells: roles for AMP-activated protein kinase, Akt, and FOXO1. *Endocrinology.* 2010; 151(1):103-14.

Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992; 339:1523-1526.

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.

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

Rivard A, Andres V. Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases. *Histol Histopathol.* 2000; 15:557-571.

Romero M, Jiménez R, Hurtado B, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, López-Sepúlveda R, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaino F, Tamargo J, Vargas F, Duarte J. Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2010; 10;627(1-3):242-50.

Romero M, Jiménez R, Sánchez M, López-Sepúlveda R, Zarzuelo A, Tamargo J, et al. Vascular superoxide production by endothelin-1 requires Src non receptor protein tyrosine kinase and MAPK activation. *Atherosclerosis.* 2010; 212(1):78-85.

Romero M, Jiménez R, Sánchez M, López-Sepúlveda R, Zarzuelo MJ, O'Valle F, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis.* 2009; 202:58-67.

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.

Rotondo S, Di Castelnuovo A, de Gaetano G. The relationship between wine consumption and cardiovascular risk: from epidemiological evidence to biological plausibility. *Ital Heart J.* 2001; 2:1-8.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol.* 1986; 250:H815-821.

Ruef J, Moser M, Kubler W, Bode C. Induction of endothelin-1 expression by oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Pathol.* 2001; 10:311-315.

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.

Russo A, Palumbo M, Aliano C, et al. Red wine micronutrients as protective agents in Alzheimer-like induced insult. *Life Sci.* 2003; 72:2368-2379.

Saavedra JM, Groebecker H, Axelrod J. Changes in central catecholaminergic neurons in the spontaneously (genetic) hypertensive rat. *Circ Res.* 1978; 42:529-534.

Sainz J, Wangenstein R, Rodriguez Gomez I, Moreno JM, Chamorro V, Osuna A, Bueno P, Vargas F. Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition. *Am. J. Hypertens.* 2005; 18:871-877.

Saito N, Mukaino S, Ogino K, Kawai C. Vascular lesions in hypertensive rats under salt loading: kidney renin and lysosomal enzymes. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 1976; 3:49s-51s.

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.

Sakurai T, Goto K. Endothelins. Vascular actions and clinical implications. *Drugs.* 1993; 46:795-804.

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.

Sánchez M, Lodi F, Vera R, et al. Quercetin and isorhamnetin prevent endothelial dysfunction, superoxide production, and overexpression of p47phox induced by angiotensin II in rat aorta. *J Nutr.* 2007; 137:910-915.

Sarr M, Chataigneau M, Martins S, Schott C, El Bedoui J, Oak MH, Muller B, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res.* 2006; 71:794-802.

Saucier CT, Waterhouse AL. Synergetic activity of catechin and other antioxidants. *J Agric Food Chem.* 1999; 47:4491-4.

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.

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

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

Schiffrin EL. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2001; 38:S3-S6.

Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vasc Pharmacol* 2005; 43:19-29.

Schramm D, Pearson D, German J. Endothelial cell basal PGI release is stimulated by wine in vitro: One mechanism that may mediate the vasoprotective effects of wine. *The Journal of Nutritional Biochemistry,* 1997; 8:647-651.

Schröder H, Ferrández O, Jimenez Conde J, Sánchez-Font A, Marrugat J. Cardiovascular risk profile and type of alcohol beverage consumption: a population-based study. *Ann Nutr Metab.* 2005; 49:100-6.

Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M. (-)-epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(4):1024-9.

Schuldt EZ, Ckless K, Simas ME, Farias MR, Ribeiro-Do-Valle RM: butanolic fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq. relaxes rat thoracic aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 35: 234-239.

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.

Seifi B, Kadkhodae M, Karimian SM, Zahmatkesh M, Shams S, Bakhshi E. Reduction of kidney damage by supplementation of vitamins C and E in rats with deoxycorticosterone-salt-induced hypertension. *Iran J Kidney Dis.* 2009; 3:197-202.

Seigneur M, Bonnet J, Dorian B, et al. Effect of the consumption of alcohol, white wine, and red wine on the platelet function and serum lipids. *J Appl Cardiol.* 1990; 5:215-222.

Selye H, Hall CE, Rowley EM. Malignant Hypertension Produced by Treatment with Desoxycorticosterone Acetate and Sodium Chloride. *Can Med Assoc J.* 1943; 49(2):88-92.

Sen CK, Bagchi D. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract. *Mol Cell Biochem.* 2001; 216:1-7

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.

Sesso HD, Cook NR, Buring JE, Manson JE, Gaziano JM. Alcohol consumption and the risk of hypertension in women and men. *Hypertension.* 2008; 51:1080-7.

Seyle H, Hall CE, Rowley EM. Malignant hypertension produced by treatment with desoxycorticosterone acetate and sodium chloride. *Can. Med Assoc.* 1943; 49:88-92.

Seyle H, Hall CE. Pathologic changes induced in various species by overdosage with desoxycortisone. *Arch. Pathol.* 1943; 36:19-31.

Seyle H, Hall, CE. Production of nephrosclerosis and cardiac hypertrophy in the rat by desoxycorticosterone acetate overdosage. *Am. Heart J.* 1944; 27:338-344.

Shaper AG, Wattamethee G, Walker M. Alcohol and mortality in British men: explaining the U-shaped curve. *Lancet.* 1988; 1:1267-273.

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.

Shimada K, Wanatabe H, Hosoda K, Takeuchi K, Yoshikawa J. Effect of wine in coronary flow-velocity reserve. *Lancet.* 1999; 354:1002.

Sies H, Schewe T, Heiss C, Kelm M. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(1 Suppl):304S-312S.

Silver AE, Beske SD, Christou DD, Donato AJ, Moreau KL, Eskurza I, Gates PE, Seals DR. Overweight and obese humans demonstrate increased vascular endothelial NAD(P)H oxidase-p47(phox) expression and evidence of endothelial oxidative stress. *Circulation.* 2007; 115:627-37.

Soares de Moura R, Costa Viana FS, Souza MAV, Kovary K, Guedes DC, Oliviera EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmao Correia ML. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of vinifera grape-skin extract. *J. Pharm. Pharmacol.* 2002; 54:1515-1520.

Somers MJ, Mavromatis K, Galis ZS, Harrison DG. Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation.* 2000; 101:1722-8.

Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, et al. Superoxide production and expression of NOX family proteins in human atherosclerosis. *Circulation.* 2002; 105, 1429-1435.

Sparwel J, Vantler M, Caglayan E, Kappert K, Fries JW, Dietrich H, et al. Differential effects of red and white wines on inhibition of the platelet-derived growth factor receptor: impact of the mash fermentation. *Cardiovasc Res.* 2009; 81:758-70.

Spencer JP. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J Nutr.* 2003; 133(10):3255S-3261S.

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

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.

Stensvold I, Tverdal A, Solvoll K, Foss OP. Tea consumption. relationship to cholesterol, blood pressure, and coronary and total mortality. *Prev Med.* 1992; 21(4):546-53.

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.

Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.* 2004; 500:299-313.

Stolk J, Rossie W, Dijkman JH. Apocynin improves the efficacy of secretory leukocyte protease inhibitor in experimental emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150:1628-31.

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.

Sumi D, Hayashi T, Matsui-Hirai H, Jacobs AT, Ignarro LJ, Iguchi A. 17beta-estradiol inhibits NADPH oxidase activity through the regulation of p47phox mRNA and protein expression in THP-1 cells. *Biochim. Biophys. Acta* . 2003; 1640, 113-118.

Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000; 101:948-54.

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

Swingle WT, Haller HL, Siegler EH, Swingle MC. A chinese insecticidal plant, *tripterygium wilfordii*, introduced into the united states. *Science*. 1941; 93:60-61.

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.

Takaoka M, Kobayashi Y, Yuba M, Ohkita M, Matsumura Y. Effects of alpha-lipoic acid on deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension in rats.. *Eur J Pharmacol*. 2001; 424, 121-129.

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; 33:1367-1369.

Taubert D, Berkels R, Roesen R, Klaus W. Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. *JAMA*. 2003; 27;290(8):1029-30.

Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schömig E. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2007a; 4;298(1):49-60.

Taubert D, Roesen R, Schömig E. Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007b; 9;167(7):626-34.

Thorn, G.W., Dorrance, S.S., DAY, E. Addison's disease: evaluation of synthetic desoxycorticosterone acetate therapy in one hundred and fifty-eight patients. *Ann. Intern. Med.*, 1942; 16:1053-1096.

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.

Tomita H, Egashira K, Kubo-Inoue M, Usui M, Koyanagi M, Shimokawa H, Takeya M, Yoshimura T, Takeshita A. Inhibition of NO synthesis induces inflammatory changes and monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat hearts and vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998a; 18(9):1456-64.

Tomita H, Egashira K, Ohara Y, Takemoto M, Koyanagi M, Katoh M, Yamamoto H, Tamaki K, Shimokawa H, Takeshita A. Early induction of transforming growth factor- $\beta$  via angiotensin II type 1 receptors contributes to cardiac fibrosis induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension.* 1998b; 32: 273-279.

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

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.

Toth KM, Berger EM, Beehler CJ, Repine JE. Erythrocytes from cigarette smokers contain more glutathione and catalase and protect endothelial cells from hydrogen peroxide better than do erythrocytes from nonsmokers. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 134:281-4.

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, Schiffrin EL. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens.* 2001; 19:1245-1254.

Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:981–7.

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signalling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.* 2004; 44:248-252.

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

Truelsen T, Gronbaek M, Schnohr P, Boysen G. Intake of beer, wine, and spirits and risk of stroke : the Copenhagen city heart study. *Stroke.* 1998; 29:2467-72.

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.

Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, et al. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37WHO MONICA Project populations. *Lancet.* 1999; 353:1547-1557.

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

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.

Ulker S, McKeown PP, Bayraktutan U. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension.* 2003; 41:534-9.

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.

Usui M, Egashira K, Kitamoto S, Koyanagi M, Katoh M, Kataoka C, et al. Pathogenic role of oxidative stress in vascular angiotensin-converting enzyme activation in long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension.* 1999; 34:546-551.

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, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20:331-342.

Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol* 2005; 144:449-458.

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.

Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.* 2003; 63:179-85.

Vaziri ND, Wang XQ. cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide. *Hypertension.* 1999; 34:1237-1241.

Vaziri ND. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2004; 13(1):93-9.

Vendrov AE, Hakim ZS, Madamanchi NR, et al. Atherosclerosis is attenuated by limiting superoxide generation in both macrophages and vessel wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27:2714-2721.

Vera R, Galisteo M, Villar IC, Sanchez M, Zarzuelo A, Perez-Vizcaino F, Duarte J. Soy isoflavones improve endothelial function in spontaneously hypertensive rats in an estrogen-independent manner: role of nitric oxide synthase, superoxide, and cyclooxygenase metabolites. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 314:1300-1309.

Vera R, Jiménez R, Lodi F, Sa´nchez M, Galisteo M, Zarzuelo A, Perez-Vizcaino F, Duarte J. Genistein restores caveolin-1 and AT-1 receptor expression and vascular function in large vessels of ovariectomized hypertensive rats. *Menopause.* 2007; 14:933-940.

Vericel E, Narce M, Ulmann L, Poisson JP, Lagarde M. Age-related changes in antioxidant defense mechanisms and peroxidation in isolated hepatocytes from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Mol Cell Biochem.* 1994; 132: 25-29.

Versteeg DH, Palkovits M, Van der Gungten, Wijnen HL, Smeets GW, de Jong W. Catecholamine content of individual brain regions of spontaneously hypertensive rats (SH-rats). *Brain Res* 1976; 112:429-434.

Vieira, O., Escargueil-Blanc, I., Meilhac, O., Basile, J.P., Laranjinha, J., Almeida, L., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 123, 565- 573.

Viel EC, Benkirane K, Javeshghani D, Touyz RM, Schiffrin EL. Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295:H281-8.

Vinson JA, Hontz BA. Phenol antioxidant index: Comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *J Agric Food Chem.* 1995; 43:401-403.

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, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Gennazzani A, Buralli S, Taddei S, Salvetti A. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation.* 2000; 101:2258 - 2263.

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

Vitaglione P, Ottanelli B, Milani S, Morisco F, Caporaso N, Fogliano V. Dietary trans-resveratrol bioavailability and effect on CCl<sub>4</sub>-induced liver lipid peroxidation. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 24:618-22.

Vitrac X, Desmoulière A, Brouillaud B, Krisa S, Deffieux G, Barthe N, Rosenbaum J, Mérillon JM. Distribution of [<sup>14</sup>C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.* 2003; 72:2219-2233.

Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res.* 1991; 5:3867-73.

Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res.* 1991; 1;51(15):3867-73.

Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Forstermann U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002; 106:1652- 1658.

Wallerath T, Poleo D, Li H, Forstermann 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- 478.

Wangensteen R, O'Valle F, Del Moral R, Vargas F, Osuna A. Chronic alpha1-adrenergic blockade improves hypertension and renal injury in L-NAME and low-renin L-NAME-DOCA hypertensive rats. *Med. Sci. Monit.* 2002; 8:BR378-BR384.

Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper G, Whincup PH, Rumley A, Walker M, Lennon L. The effects of different alcoholic drinks on lipids, insulin and haemostatic and inflammatory markers in older men. *Thromb Haemost.* 2003; 90(6):1080-7.

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 K, Wassmann S, Nickenig G. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circ Res.* 2005; 97:1046 -1054.

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

Waterhouse AL, German J, Walzem R, et al. Is it time for a wine trial? *Am J Clin Nutr.* 1998; 68:220-221.

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

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.

Wiinber N, Hoegholm A, Christensen HR, Bang LE, Mikkelsen KL, Nielsen PE, Svendsen TL, Kampmann JP, Madsen NH, Bentzon MW. 24-h Ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender. *Am J Hypertens.* 1995; 8:978 -986.

Winternitz JL. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Br Heart J* 1993; 69:S12-S18.

Wong PC, Price WA Jr, Chiu AT, Carini DJ, Duncia JV, Johnson AL, Wexler RR, Timmermans PB. Hypotensive action of DuP 753, an angiotensin II antagonist, in spontaneously hypertensive rats. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: X. *Hypertension* 1990; 15:459-468.

Woodward M, Tunstall-Pedoe H. Coffee and tea consumption in the Scottish Heart Health Study follow up: conflicting relations with coronary risk factors, coronary disease, and all cause mortality. *J Epidemiol Community Health.* 1999; 53:481-7.

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.

Wu R, Millette E, Wu L, de Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2001; 19:741-748.

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.

Xu HL, Galea E, Santizo RA, Baughman VL, Pelligrino DA. The key role of caveolin-1 in estrogen-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase function in cerebral arterioles in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21:907-913.

Xu JW, Ikeda K & Yamori Y. Genistein inhibits expressions of NADPH oxidase p22phox and angiotensin II type 1 receptor in aortic endothelial cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2004; 27:675-683.

Yang CS, Hong J, Hou Z, Sang S. Green tea polyphenols: antioxidative and prooxidative effects. *J Nutr.* 2004; 134(11):3181S.

Yarnell JW, Evans AE. The Mediterranean diet revisited--towards resolving the (French) paradox. *QJM.* 2000; 93:783-5.

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.

Ying CJ, Xu JW, Ikeda K, et al. Tea polyphenols regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunit expression and ameliorate angiotensin II-induced hyperpermeability in endothelial cells. *Hypertens Res.* 2003; 26:823-828.

Yogi A, Callera GE, Montezano AC, Aranha AB, Tostes RC, Schiffrin EL, et al. 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.

Zanchi A, Aubert JF, Brunner HR, Waeber B. Vascular acetylcholine response during chronic NO synthase inhibition: *in vivo* versus *in vitro*. *Cardiovasc Res.* 1995; 30:122-129.

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

Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 1998; 32:958-964.

Zavillová I, Capíková d, Pechánová O, Bernátová I. Wine polyphenols increase NO synthase activity in both normotensive and hypertensive rats. *Physiol Res* 2001; 50: 41p.

Zenebe W, Pechánová O, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. *Physiol Res.* 2003; 52:425-32.

Zenebe W, Pechanova O. Effects of red wine polyphenolic compounds on the cardiovascular system. *Bratisl Lek Listy.* 2002; 103:159-65.

Zhan CD, Sindhu RK, Pang J, Ehdaie A, Vaziri ND. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. *J Hypertens.* 2004; 22:2025-33.

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.

Zhao, X., Gu, Z., Attele, A.S., Yuan, C.S. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 67:279-285.

Zhen J, Lu H, Wang XQ, Vaziri ND, Zhou XJ. Upregulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression by reactive oxygen species. *Am J Hypertens.* 2008; 21(1):28-34.

Zheng J and Ramírez VD. Inhibition of mitochondrial proton F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br J Pharmacol* 2003; 130:1115-23.

Zhou MS, Jaimes EA, Raij L. Atorvastatin prevents end-organ injury in saltsensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress. *Hypertension.* 2004; 44:186-90.

Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgin J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science.* 2002; 295:505-508.

Zicha J, Dobesová Z, Kunes J. Relative deficiency of nitric oxide-dependent vasodilation in salt-hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions. *J Hypertens.* 2001; 19:247-54.

Zou J, Huang Y, Cao K, et al. Effect of resveratrol on intimal hyperplasia after endothelial denudation in an experimental rabbit model. *Life Sci.* 2000; 68:153-163.

Zou JG, Wang ZR, Huang YZ, Cao KJ, Wu JM. Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Int. J. Mol. Med.* 2003; 11:317- 320.