

UNIVERSIDAD DE GRANADA.
MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA.



Tesis Doctoral

**Efectos de la quercetina a nivel endotelial:
correlación con la actividad β -glucuronidasa.**

Almudena Pérez Marfil.

2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Almudena Pérez Marfil
ISBN: 978-84-9163-771-4
URI: <http://hdl.handle.net/10481/49482>

El doctorando **ALMUDENA PÉREZ MARFIL** y los directores de la tesis **Dr. ANTONIO OSUNA ORTEGA y Dr. JUAN MANUEL DUARTE PÉREZ**, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada 7 de Noviembre de 2017.

Director/ es de la Tesis

Doctorando

Fdo:

Fdo:

Fdo:

Publicaciones:

Los resultados parciales obtenidos en el trabajo actual se encuentran en la siguiente publicación:

The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: Correlation with beta-glucuronidase activity. Pharmacological Research. 2014; 89: 11–18.

Congresos:

Los resultados parciales obtenidos en el trabajo actual han sido presentados en el siguiente congreso:

Efectos de quercetina sobre la función cardiovascular en individuos sanos. XLII Congreso Nacional de la SEN, 2012.

RESUMEN.

Los flavonoides comprenden un amplio grupo de compuestos polifenólicos presentes en alimentos de origen vegetal, principalmente frutas y verduras, que incluyen varias subclases, tales como: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonoles y chalconas. Entre ellos, la quercetina es el flavonol más abundante de la dieta y ampliamente distribuido en la naturaleza.

Son numerosos los estudios epidemiológicos que han encontrado una asociación inversa entre la ingesta de flavonoides y el riesgo de enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas e incluso, neoplasias.

La quercetina ejerce efectos vasodilatadores, antiplaquetarios y antiproliferativos. Además, reduce la presión arterial, el estado oxidativo y el daño de los órganos diana tanto en modelos animales como en humanos hipertensos.

Los flavonoides se encuentran mayoritariamente como glicósidos, pero también pueden aparecer como forma libre (aglicona), en suplementos nutricionales.. Los principales metabolitos de la quercetina en plasma humano son: quercetina-3-O-glucurónido (Q3GA), quercetina-3-O-sulfato e isorhamnetina-3-O-glucurónido (3-metil-quercetina-3-O-glucurón). Estos metabolitos son normalmente menos activos que la aglicona e incluso, a menudo, son totalmente inactivos cuando son analizados in vitro durante periodos cortos de tiempo. Sin embargo, los metabolitos glucurono-conjugados de la quercetina pueden ser hidrolizados por la β -glucuronidasa en varios tejidos, liberando la aglicona que se acumula intracelularmente, responsable del efecto biológico.

Planteamos como hipótesis que la administración de la quercetina oral en humanos podría inducir efectos vasodilatadores y que podrían estar relacionados con la desconjugación de la quercetina-3-O-glucurónido (Q3GA).

Diseño del estudio: ensayo doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo. Participaron quince voluntarios sanos (26 ± 5 años, 6 mujeres) a los que se les suministró una cápsula que contenía placebo, 200 o 400 mg de quercetina, de forma aleatoria, durante tres semanas consecutivas. A las 2 h, se observó un aumento dosis-dependiente de Q3GA en plasma ($\sim 0,4$ y 1 M para 200 y 400 mg, respectivamente) con niveles menores de quercetina e isorhamnetina. No se observaron cambios en la presión arterial con ninguna de las dosis suministrada. A las 5 h, la quercetina aumentó el diámetro de la arteria braquial, que se correlacionaba con el producto de los niveles de Q3GA por la actividad β -glucuronidasa del plasma. Hubo un aumento en los niveles urinarios de glutation, pero no hubo aumento de nitritos más nitratos. La quercetina y la isorhamnetina también ejercieron un efecto vasodilatador en las arterias umbilicales humanas in vitro, mientras que Q3GA no tuvo efecto.

Como conclusión, la quercetina ejerce efectos vasodilatadores agudos in vivo en sujetos normotensos y normocolesterolémicos. Estos resultados son consistentes con los efectos que se deben a la desconjugación del metabolito Q3GA.

ABREVIATURAS.

AA - Araquidónico.

ACh - Acetilcolina.

ADMA - Dimetil arginina asimétrica.

ADN - Ácido desoxirribonucleico.

Akt - Proteína quinasa B.

AMPc - Adenosín monofosfato cíclico.

Ang II - Angiotensina II.

AP-1 - Proteína activadora.

ARNm - Ácido ribonucleico mensajero.

ATP - Adenosín trifosfato.

b FGF - Factor de crecimiento de fibroblastos básico.

β gluc - β -glucosidasa.

BH2 - Dihidrobiopterina.

BH4 - Tetrahidrobiopterina.

Bk - Bradikinina.

β TGF - Factor de crecimiento transformante β .

Ca²⁺ - Calcio.

Cam - Calmodulina.

Cat - Catalasa.

CBG - β - glucosidasa citosólicas.

CE - Energía de colisión

Cl⁻ - Cloro.

CMLV - Célula del músculo liso vascular.

CO₂ - Dióxido de carbono.

COMT - Catecol-o-metil transferasa.

COX - Ciclooxygenasa.

CPK - Creatina quinasa.

CuZn-SOD - SOD dependiente de cobre y cinc.

DAD - Detector de matriz de diodo.

DM - Diabetes Mellitus.

DMSO - Dimetilsulfóxido.

DOCA - Acetato de deoxicorticosterona.

DP - Potencial de descomposición.

EDHF - Factor hiperpolarizante derivado de endotelio.

EDRF - Factor relajante derivado de endotelio.

ELAM-1 - Molécula de adhesión leucocitaria al endotelio.

eNOS - Óxido nítrico sintasa endotelial.

EP - Potencial de entrada.

ERC - Enfermedad renal crónica.

ERO - Especies reactivas de oxígeno.

ET-1 - Endotelina 1.

ET-2 - Endotelina 2.

ET-3 - Endotelina 3.

ET-4 - Endotelina 4, isoforma murina de la endotelina-2.

ET_A - Receptor de endotelina A.

ET_B - Receptor de endotelina B.

FA - Fosfatasa alcalina.

FAD - Flavín adenín dinucleótido.

Fe - Hierro.

FMN - Flavín mononucleótido.

GCs - Guanilato ciclase soluble.

GGT - Gamma glutamiltransferasa.

GLUT - Transportador de glucosa.

GMPc - Guanosín monofosfato cíclico.

GOT - Aspartato transaminasa.

G-6-P - Glucosa-6- fosfato.

GPT - Alanina transaminasa.

GPx - Glutathion peroxidasa.

GSH - Glutathion reducido.

GSSG - Glutathion oxidado.

GTP - Guanosín trifosfato.

HDL - Lipoproteínas de alta densidad.

H₂O₂ - Peróxido de hidrógeno.

HOO· - Radical hidroperoxilo.

HTA - Hipertensión arterial.

ICAM-1 - Molécula de adhesión intracelular 1.

IMC - Índice de Masa Corporal.

iNOS - Óxido nítrico sintetasa inducible.

IP3 - Inositol trifosfato.

8-iso-PGF₂α - 8-iso-prostaglandina F₂ alfa

iv - Vía intravenosa

JNK - Quinasa c-jun-NH₂-terminal.

K⁺ - Potasio.

KCl - Cloruro potásico.

LDH - Lactatodeshidrogenasa.

LDL - Lipoproteínas de baja densidad.

L-NAME - N ω -nitro-L-arginina metil éster.

LO[•] - Radical lipídico.

LOO[•] - Radical lipídico.

LOX - Lipooxigenasa.

LPH - Lactasa floricina hidrolasa.

MAPA - Registro de presión arterial ambulatoria.

MAPKs - Proteín kinasas activadas por mitógeno.

MCP-1 - Proteína quimiotáctica de monocitos.

MDA - Malonildialdehido.

MDRD-4 - "Modification of Diet in Renal Disease Study".

Mn-SOD - SOD dependiente de manganeso.

MRP - Proteína de resistencia a múltiples fármacos.

MS - Espectómetro de masas.

Na⁺- Sodio.

NA - Noradrenalina.

NADPH - Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato.

NKCC1 - Cotransportador Na⁺-k⁺-2Cl⁻ 1.

nNOS - Óxido nítrico sintetasa neuronal.

NO - Óxido nítrico.

NO₂ - Nitritos.

NO₃ - Nitratos.

NOS - Óxido nítrico sintetasa.

NOX - Nitritos y nitratos

O²⁻ - Anión superóxido.

OH[·] - Radical hidroxilo.

ONOO⁻ - Peroxinitrito.

PAI-1 - Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1.

PAM - Presión arterial media

PCR -Proteína C Reactiva.

PDEs - Fosfodiesterasas.

PDGF - Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PGs - Prostaglandinas

PGG₂ - Prostaglandina G₂

PGH₂ - Prostaglandina H₂.

PGI₂ - Prostaciclina.

PI3K - Fosfatidil inositol-3-quinasa.

PK - Proteína kinasa.

PKA - Proteín kinasa A.

PKB - Proteín kinasa B = Akt.

PKC - Proteín kinasa C.

Quer - Quercetina.

Q3GA - Quercetin-3-O- Glucurónido.

Rac- Proteína G de bajo peso molecular.

ROO[·] - Radical peróxilo.

ROS - Especies reactivas de oxígeno.

SEM - Error estándar de la media.

SGLT1 - Transportador de glucosa sodio dependiente.

SHR - Rata espontáneamente hipertensa.

SOD - Superóxido dismutasa.

SRAA - Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.

SULT- Sulfotransferasa.

TAD - Tensión arterial diastólica

TAS - Tensión arterial diastólica

TNF- α - Factor de necrosis tumoral α .

tPA - Activador del plasminógeno tisular.

TXA2 - Tromboxano A2.

TXB2 - Tromboxano B2.

UGT - Enzima uridina 5'-difosfato glucuroniltransferasa.

VCAM-1 - Molécula de adhesión de las células vasculares 1.

VEGF - Factor de crecimiento del endotelio vascular.

VMF - Vasodilatación mediada por flujo.

VP - Vasopresina.

XO - Xantina oxidasa.

INTRODUCCIÓN	1
1. Introducción: Enfermedad cardiovascular y prevención primaria.....	1
1.1. Efectos de la dieta sobre la morbimortalidad cardiovascular.....	2
2. Endotelio vascular.....	4
2.1. Funciones del endotelio.....	5
2.1.1. Barrera selectiva.....	5
2.1.2. Regulación del tono vascular.....	6
2.1.2.1. Sustancias vasodilatadoras.....	6
Óxido nítrico.....	6
Prostaciclina.....	10
Factor hiperpolarizante derivado de endotelio....	11
2.1.2.2. Sustancias vasoconstrictoras.....	13
Endotelina-1.....	13
Tromboxano A2 y PGH2.....	15
Isoprostanos.....	15
2.1.3. Regulación de la proliferación, crecimiento y migración de las células musculares lisas.....	16
2.1.4. Regulación de la coagulación y fibrinólisis.....	16
2.2. Disfunción endotelial. Concepto.....	17
2.2.1. Disfunción endotelial y estrés oxidativo.....	19
2.2.1.1. Fuentes enzimáticas de ERO.....	21
Papel de la NADPH oxidasa.....	21
Xantina oxidasa.....	23
Papel de la eNOS desacoplada.....	24
2.2.1.2. Enzimas antioxidantes.....	25
Superóxido dismutasa.....	26
Glutación peroxidasa.....	26
Catalasa.....	26
2.2.1.3. Antioxidantes no enzimáticos.....	27
Glutación.....	27
Vitamina E.....	29

Vitamina C.....	29
Otros antioxidantes.....	29
2.2.2. Disfunción endotelial y enfermedad cardiovascular.....	30
2.3. Remodelado vascular.....	31
3. Flavonoides. Generalidades.....	35
3.1. Flavonoides, disfunción endotelial y estrés oxidativo.....	39
3.2. Flavonoides e hipertensión.....	44
3.3. Flavonoides y aterosclerosis.....	48
3.4. Flavonoides y plaquetas.....	50
3.5. Flavonoides y cardiopatía isquémica.....	51
3.6. Biodisponibilidad de los flavonoides.....	52
3.6.1. Absorción.....	57
3.6.2. Metabolismo.....	60
3.6.3. Distribución.....	62
3.6.4. Excreción.....	65
3.6.5. Propiedades de los metabolitos conjugados.....	66
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	69
1. Justificación e hipótesis de estudio.....	70
2. Objetivos.....	72
2.1. Objetivos generales.....	72
2.2. Objetivos específicos.....	72
MATERIAL Y METODOS.....	73
1. Estudio de la función endotelial in vivo.....	74
1.1. Selección de los sujetos.....	74
1.2. Tipo de estudio.....	75
1.3. Descripción del tratamiento.....	75
1.4. Diseño del estudio.....	76
1.5. Variables.....	77
1.5.1. Variables clínicas.....	77
1.5.2. Variables bioquímicas.....	77

1.5.3. Variables hematológicas.....	79
1.6. Medición de diámetro y flujo de la arteria braquial.....	79
1.7. Medición de la presión arterial.....	81
1.8. Análisis plasmático de quercetina y metabolitos.....	81
1.9. Determinación de la actividad β -glucuronidasa.....	85
1.10. Mediciones de glutatión, nitritos y nitratos e isoprostanos....	85
2. Contractilidad vascular in vitro.....	86
3. Análisis estadístico.....	87
4. Aprobación por el Comité de Ética.....	88
RESULTADOS	89
1. Resultados del estudio in vivo.....	89
1.1. Descripción de la muestra.....	90
1.2. Características basales, clínicas y analíticas.....	92
1.3. Perfil de metabolitos plasmáticos tras dosis oral única de quercetina.....	95
1.4. Efectos de la quercetina en la presión sanguínea, flujo sanguíneo y diámetro de la arteria braquial.....	97
1.5. Efectos de la quercetina en el glutatión total plasmático y niveles de isoprostanos, nitritos y nitratos en orina.....	101
2. Efectos de la quercetina, isorhamnetina y Q3GA in vitro en arterias umbilicales humanas.....	103
DISCUSIÓN	106
1. Efectos sobre la presión arterial.....	108
2. Efectos sobre el flujo sanguíneo.....	110
3. Efectos sobre el tono vascular.....	111
4. Metabolitos plasmáticos tras la administración aguda de quercetina.....	112
5. Efectos de Q3GA sobre el tono vascular.....	116
6. Efectos de quercetina: correlación con la actividad β -glucuronidasa.....	117

CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFÍA	121

INTRODUCCIÓN.

1. Introducción. Enfermedad cardiovascular y prevención primaria.

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de mortalidad en el mundo, según datos recogidos por la Organización Mundial de la Salud, y su prevalencia continúa creciendo (Sacco *et al.*, 2016), siendo la cardiopatía isquémica junto con los accidentes cerebrovasculares, responsables de casi un tercio de las muertes en Europa. El tratamiento farmacológico, aunque es efectivo en parte de la población, en otros casos es claramente insuficiente, ya que sólo un 50% de la población logra el control de sus cifras de presión arterial (<140/90mmHg) (Egan *et al.*, 2010). Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de una estrategia preventiva dirigida a reducir de manera precoz los factores de riesgo cardiovascular (Ludt *et al.*, 2014). Dentro de éstos, nos encontramos dos tipos: modificables y no modificables. Entre los factores de riesgo no modificables se incluye la edad, el sexo, factores genéticos/historia familiar y entre los modificables: la hipertensión arterial (HTA), tabaquismo, hipercolesterolemia, diabetes mellitus (DM) y sobrepeso/obesidad (particularmente la obesidad abdominal o visceral), frecuentemente unidos a la inactividad física. Son sobre estos últimos, donde debemos actuar de forma precoz, ya que juegan un papel importante en la morbimortalidad cardiovascular (Greenland *et al.*, 2003; Bejarano *et al.*, 2011).

1.1. Efectos de la dieta sobre la morbimortalidad cardiovascular.

Los efectos de la dieta sobre la génesis y prevención de la enfermedad cardiovascular, es un hecho conocido desde antiguo. Sin embargo, no es hasta el siglo XX cuando empieza a ganar protagonismo, realizándose numerosos estudios con el fin de conocer cómo actúan los diferentes micronutrientes a nivel molecular.

Hoy en día, la dieta forma parte del manejo integral del riesgo cardiovascular. Se sabe que una dieta rica en grasas saturadas aumenta la concentración de colesterol sérico, uno de los principales factores de riesgo cardiovascular. Sin embargo, más que la cantidad total ingerida, tiene mayor importancia la composición de la grasa de la dieta, destacando la reducción del riesgo cardiovascular asociada al consumo de ácidos grasos poliinsaturados y el efecto pernicioso de los ácidos grasos trans de origen industrial (*Rodríguez Artalejo et al., 2002*).

Las dietas ricas en frutas y verduras también han demostrado, tanto en estudios epidemiológicos como de intervención, que reducen la morbi-mortalidad cardiovascular (*Broekmans et al., 2001*). El efecto beneficioso de estas dietas se ha atribuido, al menos en parte, a la presencia de antioxidantes. Así, estudios epidemiológicos encontraron una asociación entre la ingesta de antioxidantes de origen vegetal, principalmente vitaminas C y E, y una menor mortalidad cardiovascular (*Ascherio et al., 1999*). Sin embargo, en estudios de intervención donde se administraron suplementos con vitamina D, vitamina C, vitamina K, betacarotenos, magnesio o zinc, no se ha demostrado una reducción del riesgo cardiovascular de manera significativa (*Saremi et al., 2010; Al-Khudairy et al., 2017*), incluso se ha observado efectos perjudiciales, como es el caso de los suplementos de vitamina A y un mayor riesgo de cáncer (*Schwingshackl et al., 2017*). A pesar de que se han descrito ciertos beneficios con determinados suplementos, sin embargo, la

heterogeneidad de los diferentes tipos, las dosis y para las indicaciones que se han empleado hasta ahora, limitan su uso hoy en día, ya que no se ha encontrado suficiente evidencia de que el aporte de muchos de estos micronutrientes sea beneficioso en la prevención primaria del riesgo cardiovascular (*Vivekananthan et al., 2003*) si bien, en todas las guías clínicas de prevención de riesgo cardiovascular, se aconseja una dieta rica en fruta y verduras.

En los últimos años, son numerosos los estudios que han descrito las propiedades de otro grupo de micronutrientes, los flavonoides, presentes en la dieta, con efectos beneficiosos en un gran número enfermedades, no sólo cardiovasculares, sino también en enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias e incluso en neoplasias. Estos efectos, son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes, que pueden justificar sus acciones vasodilatadoras y vasoprotectoras, así como sus acciones antitrombóticas, antilipémicas, antiateroscleróticas, antiinflamatorias y antiapoptóticas (*Landete, 2012*). Sin embargo, algunas cuestiones con respecto a eficacia, mecanismo de acción y biodisponibilidad de los flavonoides no están todavía resueltas.

2. Endotelio vascular.

El endotelio es un tejido de origen mesodérmico constituido por una capa continua de células planas que cubren la superficie interna del sistema vascular. En el humano, el endotelio lo forman aproximadamente 10 trillones de células endoteliales y ocupa una superficie que mide entre 300 a 1000 m², con un peso aproximado de 1kg. Estos datos morfológicos nos indican que las células endoteliales juegan un papel estructural y funcional importante en el organismo.

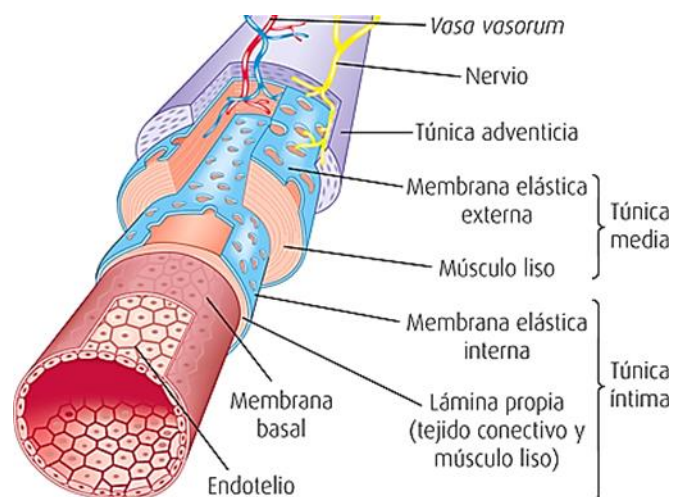


Fig.1. Estructura de la pared del vaso sanguíneo.

Una de las características de las células endoteliales es su heterogeneidad, ya que su estructura varía en función del lecho vascular considerado, pudiendo ser continuo (cerebro, corazón, etc.), fenestrado (glomérulo renal, glándulas exócrinas y endocrinas, etc.) o discontinuo (sinusoides hepáticos). Además, no sólo expresan diferentes

antígenos de superficie y receptores, sino que pueden generar distintas respuestas frente al mismo estímulo (*Gallagher y Sumpio, 1997*).

El endotelio vascular ejerce un control preciso de la homeostasis cardiovascular a través de la liberación de sustancias paracrinas, autocrinas y endocrinas implicadas en diversos procesos vasoactivos, metabólicos e inmunitarios (*Shimokawa, 2014*). Sintetiza tanto agentes vasodilatadores como vasoconstrictores (*Féléto M.et al2010*), además de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante β (TGF β), el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el activador del plasminógeno tisular (t-PA), el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), especies reactivas de oxígeno, interleuquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión de monocitos (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, E-selectina). Todos estos factores modulan numerosas funciones biológicas, entre las que destacan el mantenimiento de una interfase sangre-tejido no trombogénica, la regulación del tono vascular, del flujo sanguíneo tisular y de la presión arterial.

2.1. Funciones del endotelio:

Las principales funciones ejercidas por el endotelio son las siguientes.

2.1.1. Barrera selectiva.

El endotelio constituye la frontera de los compartimentos intra y extravascular y actúa como una barrera de permeabilidad selectiva, según tamaño y carga eléctrica, para macromoléculas y partículas lipídicas, a través de las uniones intercelulares. La permeabilidad del endotelio puede ser modificada en respuesta a diferentes estímulos, que

provocan la apertura de las uniones intercelulares y cambios en la forma de las células endoteliales (*Mombouli y Vanhoutte, 1999, Mann et al., 2003*).

2.1.2. Regulación del tono vascular.

El endotelio es considerado un tejido paracrino, ya que es capaz de modular el tono vascular, manteniendo un equilibrio entre los factores vasodilatadores, como el óxido nítrico (NO), la prostaciclina (PGI₂) y el factor hiperpolarizante dependiente de endotelio (EDHF), y los factores vasoconstrictores, como la endotelina 1 (ET-1), y el tromboxano A₂ (TXA₂) y derivados prostanoides (PGH₂) (*Bauer V. et al., 2010*).

2.1.2.1. Sustancias vasodilatadoras.

De los tres factores relajantes producidos por el endotelio, el NO se considera el más importante debido a la capacidad de ejercer un efecto tónico vasodilatador sobre la pared vascular, equilibrar las acciones de factores vasoconstrictores de acción local y de agentes con acción sistémica como la Angiotensina II, las catecolaminas y la vasopresina (VP) (*Jaffe, 1996*).

➤ Óxido Nítrico.

En 1980, Furchgott y Zawadzki, descubrieron el papel fundamental del endotelio como regulador de la vasodilatación, al describir el fenómeno de la relajación del músculo liso vascular dependiente de endotelio. Demostraron que anillos arteriales de aorta

de conejo, previamente contraídos, se podían relajar en respuesta a la acetilcolina, sólo si las células endoteliales estaban intactas. Eliminando el endotelio, anulaban la vasodilatación producida por acetilcolina, lo cual sugería que estaba mediada por alguna sustancia derivada de endotelio, que se denominó factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (*Furchgott y Zawadzki, 1980*). Posteriormente, se identificó el EDRF como óxido nítrico.

El NO se produce a partir de L-arginina a través del sistema de enzimas conocido como óxido nítrico sintetasas (NOS) que convierte L-arginina y oxígeno en NO y L-citrulina (*Li et al., 2005*). En el ser humano, se distinguen tres isoformas de NOS, dos de ellas constitutivas, la isoforma endotelial (eNOS), que se encuentra mayoritariamente en las células endoteliales de la pared de los vasos y la isoforma neuronal (nNOS), localizada principalmente en la médula espinal, cerebro y sistema nervioso periférico. Estas isoformas se expresan en condiciones fisiológicas o patológicas y son dependientes de calcio. La isoforma inducible (iNOS), se encuentra presente en macrófagos y células inflamatorias (*Godó et al., 2016*) y su producción es independiente de la concentración de calcio intracelular. En condiciones fisiológicas, la isoforma inducible se expresa en muy bajas concentraciones y su transcripción puede ser inducida por estímulos inmunológicos o inflamatorios permitiendo la liberación de grandes cantidades de NO (*Nathan et al., 1994*).

Para que la eNOS pueda ser activa, se ha de producir el acoplamiento inverso entre dos monómeros. Cada monómero presenta a su vez dos dominios, uno con actividad oxigenasa y otro con actividad reductasa, que actúan de manera independiente. La tetrahidrobiopterina (BH4) 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 BH4, y el grupo hemo (Fe) en la porción N-terminal (dominio con actividad oxigenasa). En las NOS

constitutivas, hay además lugares para la fosforilación por proteínas quinasas (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 flavín mononucleótido (FMN), flavín adenín dinucleótido (FAD) y nicotinamín adenín dinucleótido fosfato (NADPH) en la porción C-terminal (dominio con actividad reductasa) (*Li H et al., 2005*).

La expresión de la eNOS puede verse incrementada en respuesta a diversos estímulos como la trombina, ADP, bradicinina, sustancia P, agonistas muscarínicos, roce tangencial y corriente circular. El aumento de actividad de eNOS, producto del roce tangencial de la sangre contra la capa endotelial (shear stress), contribuye a la vasodilatación mediada por flujo, siendo éste un importante mecanismo de autorregulación. De manera opuesta, la eNOS puede ser inhibida competitivamente por derivados estructurales como el N-monometil-L-arginina (L-NMMA), NG-nitro-L-arginina metilester (L-NAME) y otros (*Palmer et al., 1988*).

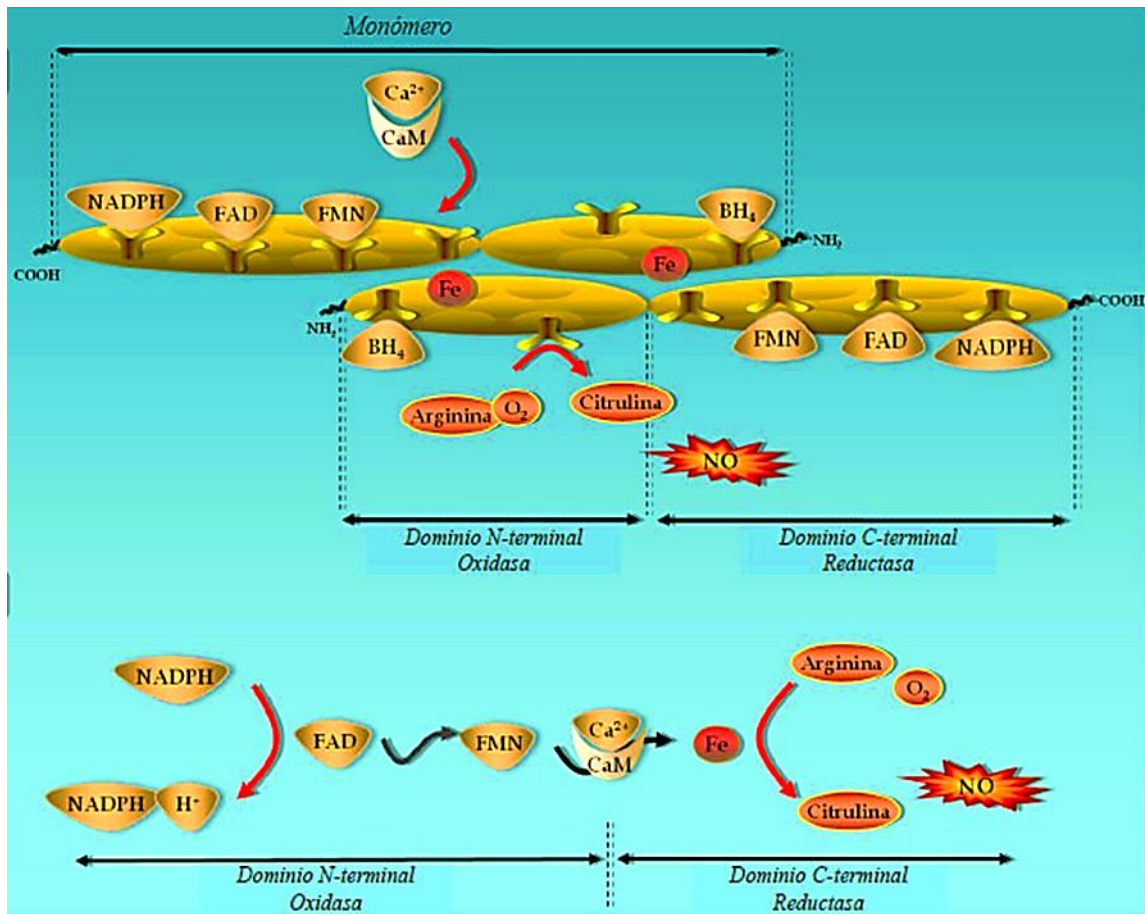


Fig. 2. Modelo dimérico de la eNOS, donde se muestra el acoplamiento entre dos monómeros de la enzima para formar el dímero activo. El flujo de electrones comienza en la porción C-terminal con actividad reductasa, desde el nicotinamín adenín dinucleótido fosfato (NADPH), hacia el flavín adenín dinucleótido (FAD), y el flavín mononucleótido (FMN), que lleva el electrón (e⁻) al hierro del grupo Hemo (Fe), en el dominio oxigenasa. Cerca del centro del péptido, se encuentra una secuencia de unión a la calmodulina (Cam), una vez activada por calcio, que controla el flujo de electrones. La tetrahydrobiopterina (BH₄) parece ser esencial para el proceso de donación de electrones del grupo hemo a la L-arginina y el O₂ para formar óxido nítrico (NO) y L-citrulina en condiciones fisiológicas normales.

Una vez producido, el NO difunde desde la célula endotelial al músculo liso adyacente, activando al sistema enzimático de guanilatociclasa soluble, que al unirse al NO aumenta la concentración de GMPc, conduciendo a la vasodilatación (Su, 2015). El GMPc genera disminución en la concentración de calcio intracelular, a través de activación de proteínas quinasas sensibles a GMPc, que fosforilan proteínas claves como canales iónicos, bombas y enzimas, que llevan a la relajación del músculo liso adyacente (Murad, 2006). De este modo, la vía NO-GMPc es la mediadora de los efectos relajadores de muchas hormonas, incluyendo histamina, nitro-vasodilatadores, acetilcolina, estrógenos, isoproterenol e insulina. Además del NO, existen otros factores vasodilatadores, como la prostaciclina y el factor hiperpolarizante, que son antagonizados por factores vasoconstrictores, también liberados por el endotelio, tales como, endotelina-1, tromboxano y prostaglandina H₂ (Mombouli y Vanhoutte et al., 1999).

Además de la regulación del tono vascular, el NO ejerce otras acciones, como la inhibición de la agregación plaquetaria, la inhibición del crecimiento y la proliferación de las células del músculo liso, además de la inhibición de la adhesión de monocitos y leucocitos al endotelio. Como consecuencia, el NO desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la función, estructura e integridad vascular (Romero et al., 1992).

➤ **Prostaciclina.**

La prostaciclina (PGI₂) es sintetizada en las células endoteliales vasculares a partir del ácido araquidónico (AA), mediante la acción del complejo enzimático COX-PGI₂ sintetasa. También se sintetiza en CMLV y plaquetas, contribuyendo a regular el estado de agregación

plaquetaria. Parte de la acción de la prostaciclina, se debe a su unión a receptores específicos en la superficie de las CMLV, que se encuentran acoplados a la adenilato ciclasa a través de proteínas G, lo que conlleva a un aumento de los niveles intracelulares de AMPc (adenosín monofosfato cíclico) y posterior relajación del músculo liso (*Gorman et al., 1977; Furchgott y Vanhoutte 1989; Vanhoutte, 1993*).

La PGI₂ tiene un efecto vasodilatador a bajas concentraciones, sin embargo, a elevadas concentraciones el efecto es vasoconstrictor (*Williams et al., 1994*). La vida media de la PGI₂ es corta, ya que no se almacena en la célula, sino que se sintetiza y se libera en respuesta a diversos estímulos. Entre los factores que estimulan la síntesis y liberación de PGI₂ están la Ang II, la ACh o la Bk, así como productos derivados de las plaquetas como la serotonina y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (*Mitchel et al., 1992*).

A diferencia de otras PGs, que en su mayoría son degradadas por enzimas al pasar por la circulación pulmonar, la PGI₂ se inactiva mediante una degradación no enzimática al metabolito estable 6-ceto-PGF_{1α}, que puede aparecer en la circulación general. Este hecho, ha servido para suponer que la PGI₂ sería la única PGs que tendría efectos vasculares con cierta relevancia sistémica (*Waldman et al., 1978*).

La edad, la arteriosclerosis y la diabetes mellitus, sin embargo, disminuyen la capacidad para sintetizar PGI₂, lo que sugiere la existencia de un nexo entre la síntesis de PGI₂ en el endotelio y su vulnerabilidad en episodios de trombosis y aterosclerosis.

➤ **Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio (EDHF).**

El endotelio libera otro factor vasodilatador, llamado EDHF, que produce la relajación del músculo liso vascular al inducir hiperpolarización de su membrana celular (*Rubanyi y Vanhoutte, 1986*).

En los vasos sanguíneos de varias especies animales se observó que esta hiperpolarización era resistente a los inhibidores de la NOS y de la COX, por lo que la relajación endotelio dependiente no se debía sólo al NO o a la PGI₂ (Corriu *et al.*, 1996), sugiriendo la existencia de otro factor responsable de dicha relajación. La naturaleza y función del EDHF no se conoce con exactitud. Durante un tiempo se consideró la posibilidad de que el EDHF fuera un metabolito del ácido araquidónico formado por la acción del citocromo P450 (Cohen y Vanhoutte, 1995). Sin embargo, en los vasos sanguíneos de algunas especies, los inhibidores del citocromo P450 no afectan a la hiperpolarización dependiente de endotelio. Se sugiere que el proceso vasodilatador que genera esta sustancia, se produciría por hiperpolarización del músculo liso vascular, mediante la apertura de los canales de K⁺ en respuesta a la acción de determinados agonistas, tales como acetilcolina y bradiquinina, o de estímulos físicos. En general, la hiperpolarización del músculo liso produce vasodilatación por la disminución en la apertura de canales de Ca⁺⁺ voltaje-dependientes y de la concentración intracelular de fosfatidil inosoles, reduciendo así la concentración de calcio intracelular (Nelson *et al.*, 1990).

La contribución del EDHF a la relajación dependiente de endotelio varía en función de la arteria que se trate así como del calibre de la misma. Este factor actúa principalmente sobre la microvasculatura y los vasos de resistencia, por lo que parece jugar un papel importante en la regulación local de las resistencias vasculares periféricas. Diversos estudios sugieren además, que el EDHF participa especialmente en la circulación coronaria y en el lecho vascular mesentérico, ya que aproximadamente el 60% y el 70% respectivamente de la respuesta a agentes vasodilatadores dependientes de endotelio está mediada por el EDHF (Maeso *et al.*, 1998, Vázquez-Pérez *et al.*, 2001).

2.1.2.2. Sustancias vasoconstrictoras.

La regulación del tono vascular viene determinada por el equilibrio entre fuerzas vasoconstrictoras y vasodilatadoras, generadas a nivel del endotelio. Dentro de las vasoconstrictoras nos encontramos varias, como son la endotelina, productos derivados de la vía de la ciclooxigenasa (COX) como aniones superóxido (O₂⁻), tromboxanoA₂ (TXA₂) y prostaglandina H₂ (PGH₂), siendo la endotelina la más importante de todas ellas, tanto por su potencia como por su localización, al ejercer su acción sobre el músculo vascular liso.

➤ **Endotelina-1.**

Las endotelinas constituyen una familia de péptidos endógenos de 21 aminoácidos. Se han descrito 4 tipos de endotelinas (endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2), endotelina-3 (ET-3), así como una isoforma murina de ET-2, denominada endotelina-4 (ET-4), distribuidas en una variedad de células y tejidos, con diferentes niveles de expresión, donde actúan como moduladores del tono vasomotor, proliferación celular, producción hormonal, balance del sodio, neurotransmisión y desarrollo de la cresta neural (*Kedzierski, 2001; Jugdutt, 2004*). La ET-1 es la isoforma más importante y se caracteriza por ser la única sintetizada en las células endoteliales (*Ma, 1995*).

La ET-1 está implicada, de modo importante, en el proceso de remodelado vascular y regulación de la proliferación celular. Se trata de una sustancia mitogénica muy potente, que produce hiperplasia e hipertrofia del músculo liso vascular, encontrándose de manera elevada en la disfunción endotelial y en pacientes con insuficiencia renal (*Brunner et al 2006, Tostes et al., 2008*).

Los factores que estimulan la síntesis de ET-1 son múltiples como, hormonas vasoactivas, factores de crecimiento, radicales libres,

endotoxinas, factores metabólicos pero, son la hipoxia, la fuerza de cizallamiento y la isquemia, los más potentes. De forma opuesta, el NO, péptidos natriuréticos, inhibidores de PKC, la heparina y quelantes del calcio disminuyen la expresión de la ET-1 (*Kurtel et al., 1999*).

La ET-1 ejerce sus acciones a través de la activación de dos tipos de receptores, el receptor de endotelina A (ET_A) y el B (ET_B). Los receptores ET_A se encuentran fundamentalmente en las CMLV, donde estimulan el crecimiento y proliferación de dichas células, y en cardiomiocitos, fibroblastos, hepatocitos, adipocitos, osteoblastos y neuronas, donde median respuestas mitogénicas y proinflamatorias. Los receptores ET_B tienen dos subtipos, el subtipo ET_{B1}, que media vasodilatación y ET_{B2} vasoconstricción (*Ohlstein et al., 1996*). Los receptores ET_{B1} se localizan principalmente en las células endoteliales, dando lugar a respuestas vasodilatadoras y antipoptóticas, tras la liberación de NO y prostaciclina (PGI₂) (*Rosendorff, 1997*). En situaciones patológicas como aterosclerosis, hipertensión o resistencia a la insulina disminuye la distribución de los receptores ET_B a nivel endotelial y aumenta en la media vascular (*Iglarz y Clozel, 2007*).

La ET-1 es capaz de producir una vasoconstricción sostenida concentrada en el endotelio independiente en anillos vasculares de varias especies (*O'Brien et al., 1987*). Puede reducir la biodisponibilidad del NO mediante la inhibición de la eNOS a través de la caveolina-1, con mayor aumento de ésta en situaciones patológicas.

Diversos estudios han demostrado la implicación de la ET-1 en la patogénesis inicial de las enfermedades cardiovasculares, siendo predictor de disfunción endotelial. La implicación de la ET-1 observada en la aterosclerosis ha sido demostrada en ratones deficientes de apoE. En este tipo de ratones, se ha constatado que, el desarrollo de placas de ateroma, se podría prevenir tras bloquear de manera crónica los receptores de ET_A (*Barton et al, 1998; d'Uscio LV et al., 2002*).

➤ **Tromboxano A2 y PGH2.**

Otros factores vasoconstrictores del endotelio son algunos metabolitos del ácido araquidónico (AA) como el tromboxano (TXA2) o un endoperóxido inestable, la PGH2, con el que comparte receptor. La COX cataliza la formación de endoperóxidos cíclicos tales como prostaglandina G2 (PGG2) y PGH2 por oxigenación y ciclación del AA. La conversión de esta última en otros compuestos puede variar en los diferentes tejidos. En el endotelio vascular a partir de PGG2 se forma sobre todo PGI2 que tiene actividad vasodilatadora además de antiagregante.

En los sujetos hipertensos estos pasos metabólicos pueden estar alterados existiendo un aumento de la producción de PGH2 que tiene actividad vasoconstrictora y que puede así mismo convertirse en otro compuesto vasoconstrictor, el TXA2.

La liberación del TXA2 y otras prostaglandinas vasoconstrictoras puede ser estimulada por distintos agentes vasoconstrictores como la propia ET, la serotonina, la NA y la Ang II (*Manabe et al., 1989, Taddei y Vanhoutte, 1993*), así como por agentes vasodilatadores (Ach), sustancias como la nicotina y por acciones mecánicas sobre el mismo endotelio.

➤ **Isoprostanos.**

En la década de los noventa, se descubrieron unos compuestos denominados isoprostanos, cuya estructura química era parecida a la de las prostaglandinas y que son el producto de la peroxidación no enzimática del ácido araquidónico catalizada por radicales libres. De todos los isoprostanos existentes, el de mayor importancia es el 8-iso-PGF2 α , ya que produce importantes respuestas biológicas en diferentes tipos celulares como endotelio, plaquetas, CMLV, epitelio y células inflamatorias. En el endotelio, el 8-iso-PGF2 α induce la síntesis de ADN

y la proliferación celular, la expresión del ARNm y de la proteína de la ET-1, la síntesis de TXA₂, la formación de IP₃ y el aumento de calcio intracelular. En las CMLV, los isoprostanos, producen vasoconstricción, siendo el 8-iso-PGF₂ α el de mayor efecto contráctil.

Los isoprostanos, y en particular el 8-iso-PGF₂ α se generan de manera moderada en personas fumadores, alérgicas, asmáticas así como en patologías cardiovasculares (renales, cerebrales, miocárdicas, la enfermedad coronaria, el ictus isquémico agudo, la hipercolesterolemia, la aterosclerosis y la preeclampsia) (*Milne et al., 2015*).

2.1.3. Regulación de la proliferación, crecimiento y migración de las células musculares lisas.

El endotelio regula la capacidad de proliferación de las células del músculo liso vascular mediante la liberación de numerosos factores estimuladores e inhibidores del crecimiento que actúan localmente, bien aisladamente o en combinación, modulando su capacidad proliferativa y migratoria (*Scottburden y Vanhoutte, 1993*).

2.1.4. Regulación de la coagulación y fibrinólisis.

El endotelio participa en la regulación de la coagulación y fibrinólisis para mantener la fluidez sanguínea normal y evitar problemas trombóticos. En condiciones normales, el endotelio tiene carácter no trombogénico, aunque en determinadas situaciones fisiológicas y fisiopatológicas, el endotelio es capaz de liberar sustancias que promueven la adhesión y la agregación de plaquetas y la coagulación (*Wu y Thiagarajan, 1996*).

2.2. Disfunción endotelial. Concepto.

El endotelio vascular desempeña su función reguladora mediante la preservación del equilibrio entre la secreción de sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras, factores procoagulantes y anticoagulantes, y agentes estimulantes y depresores de la proliferación celular (*Masaki et al., 1992*).

Podemos definir, por tanto, la disfunción endotelial como el desequilibrio, ya sea en condiciones basales o de estimulación, entre la síntesis, liberación o efecto de los factores endoteliales vasodilatadores y el de las sustancias vasoconstrictoras sintetizadas en las células endoteliales.

Cuando existe deterioro endotelial pueden afectarse además otras funciones, favoreciéndose la interacción de las plaquetas y los leucocitos con la pared vascular, así como el crecimiento y la migración de las CMLV (*Endemann et al., 2004*), lo que conlleva a un estado proinflamatorio y protrombótico asociado a una capacidad vasodilatadora disminuida.

La disfunción endotelial se considera en la actualidad, una de las primeras manifestaciones de la enfermedad cardiovascular y la aterosclerosis (*Godo et al., 2016*). Tanto la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus, la hipertensión, la hiperhomocisteinemia y el hábito de fumar cursan con disfunción endotelial, considerada a su vez, como un marcador precoz e independiente de mal pronóstico de los factores de riesgo cardiovascular (*Schächinger et al., 2000; Widlansky et al., 2003*).

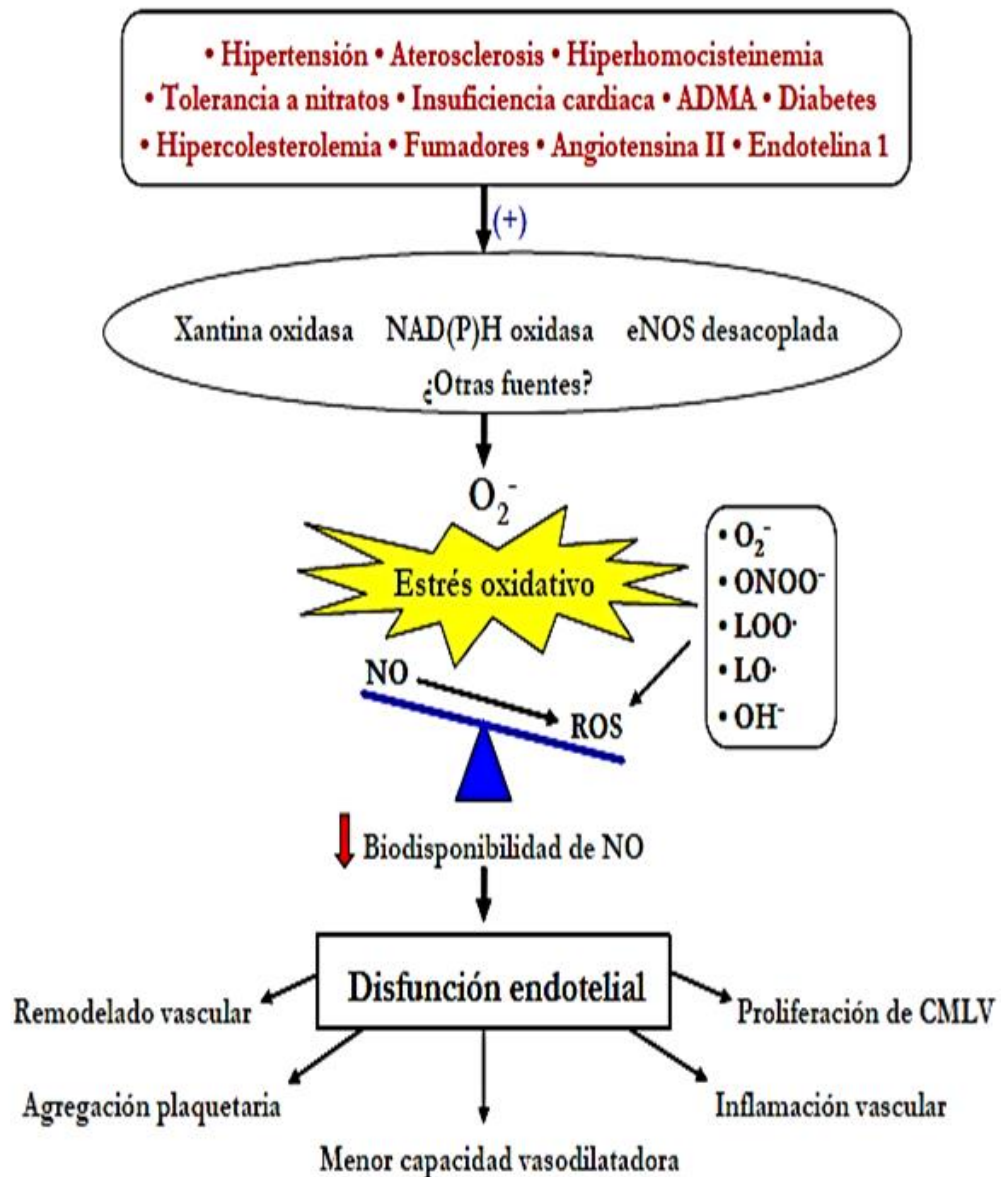


Fig.3. Mecanismos causantes de la disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares.

Distintos agentes, como enfermedades cardiovasculares (hipertensión, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis), factores de riesgo (hipercolesterolemia, fumar, tolerancia a nitratos, diabetes, dimetil arginina asimétrica (ADMA), hiperhomocisteinemia) y agentes vasoconstrictores (angiotensina II, endotelina 1), pueden activar diferentes sistemas enzimáticos, como la NAD(P)H oxidasa vascular, la

xantina oxidasa, o la eNOS desacoplada, que producen un potente agente oxidante y precursor de otros oxidantes, el anión superóxido (O_2^-), generando así un estrés oxidativo (altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ERO), entre ellas O_2^- , peroxinitrito ($ONOO^-$), radicales lipídicos (LOO^\cdot y LO^\cdot) o radical hidroxilo (OH^\cdot) principalmente), que disminuye la biodisponibilidad del agente vasodilatador óxido nítrico (NO) al aumentar su degradación por las ERO. Esto produce la denominada disfunción endotelial, donde se observa un estado vascular proinflamatorio, proagregante plaquetario y con alteración en el tono vascular, debido a que se produce un remodelado vascular, un aumento de la agregación plaquetaria, inflamación vascular, la proliferación de células del músculo liso vascular (CMLV) y una menor capacidad vasodilatadora.

2.2.1. Disfunción endotelial y estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se produce como consecuencia de la alteración del equilibrio entre las especies oxidantes y los antioxidantes, bien debido a un exceso de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), a una deficiencia de agentes antioxidantes o bien, a una suma de ambas.

Se define como radical libre a cualquier molécula o átomo que contenga uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, derivados del oxígeno molecular (especies reactivas de oxígeno). Las especies reactivas de oxígeno de mayor relevancia en la biología vascular incluyen el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot), los hidroperóxidos lipídicos, los radicales hidroperóxilos (HOO^\cdot) y el radical peróxilo (ROO^\cdot) junto con compuestos no radicales, tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) que, aunque no sean radicales, son biológicamente activos.

ESPECIES REACTIVAS	FÓRMULA	FORMACIÓN
Radicales libres		
<i>Radical superóxido</i>	$\cdot\text{O}_2^-$	Reducción de un electrón del oxígeno molecular en estado basal
<i>Radical hidroperoxilo</i>	$\text{HOO}\cdot$	Protonación del radical superóxido
<i>Radical hidroxilo</i>	$\cdot\text{OH}$	Reducción de un electrón del peróxido de hidrógeno y reducción de 3 electrones del oxígeno molecular en estado basal
<i>Óxido nítrico o monóxido de nitrógeno</i>	NO	Reducción de un electrón del nitrito
<i>Radical alcóxido</i>	$\text{RO}\cdot$	Reducción de un electrón del hidroperoxido
<i>Radical peroxilo</i>	$\text{ROO}\cdot$	Oxidación de un electrón del hidroperoxido
Especies no radicales		
<i>Oxígeno singlete</i>	$^1\text{O}_2$	Excitación del oxígeno molecular en estado basal
<i>Peróxido de hidrógeno</i>	H_2O_2	Reducción de 2 electrones del oxígeno molecular en estado basal, seguida de protonación del ión peróxido
<i>Peroxinitrito</i>	$\text{ONOO}\cdot$	Reacción del NO con $\cdot\text{O}_2^-$
<i>Hidroperoxido</i>	ROOH	Autooxidación y oxigenación con $^1\text{O}_2$ de compuestos insaturados
<i>Ácido hipocloroso</i>	HClO	Hidrólisis del cloro molecular
<i>Ozono</i>	O_3	Oxidación del oxígeno molecular en estado basal con oxígeno atómico formado por fotólisis del oxígeno molecular en estado basal

Tabla 1. Principales Especies Reactivas de Oxígeno.

Los radicales libres están implicados en la fisiopatología de diversas enfermedades y procesos patológicos, como la aterosclerosis y la hipertensión (Li y Shah, 2004; Taniyama y Griending, 2003; Valgimigli et al., 2003). Además de su papel oxidante, los radicales libres tienen otras funciones fisiológicas, siendo efectores de la

respuesta inflamatoria (acción bactericida e inmunitaria) y moduladores de la proliferación celular y angiogénesis.

En el endotelio vascular, el aumento de estrés oxidativo, principalmente por generación excesiva de O_2^- , altera diferentes funciones fisiológicas como la regulación del flujo sanguíneo, la inhibición de la agregación plaquetaria, la inhibición de la adhesión leucocitaria, y el control del crecimiento celular. Estos fenómenos modulan en última instancia el diámetro de los vasos, el remodelado y la formación de las lesiones vasculares (*Alexander, 1995; Harrison, 1997*).

2.2.1.1. Fuentes enzimáticas de Especies Reactivas de Oxígeno en el endotelio.

Las fuentes enzimáticas potencialmente productoras de especies reactivas del oxígeno en las células vasculares incluyen, la NAD(P)H oxidasa, la xantina oxidasa, la eNOS desacoplada, la mieloperoxidasa, la lipooxigenasa, la hemoxigenasa, la peroxidasa, metales de transición y la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Las tres primeras fuentes enzimáticas son consideradas las principales productoras de ERO y por tanto, objeto de estudio científico en los últimos años.

➤ Papel de la NAD(P)H oxidasa.

En la disfunción endotelial juega un papel importante, como se ha comentado previamente, el aumento de la producción vascular de ERO, como el radical superóxido (O_2^-), ya que éste reacciona rápidamente con el NO, inactivándolo.

En la pared vascular se identifican diferentes enzimas productoras de ERO como la nicotinamínadenínucleótido fosfato (NAD(P)H) oxidasa,

óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) desacoplada, xantina oxidasa y ciclooxigenasa entre otras, aunque la principal producción de ERO es generada por la NA(P)DH oxidasa (*Zalba G.et al. 2001*). Esta enzima se encuentra presente, además de en la pared vascular, en leucocitos fagocíticos. Se trata de un complejo multi-enzimático formado por un citocromo b558 formado por dos subunidades, gp91phox y gp 22 phox o sus análogos vasculares nox-1, nox-2 y diversos componentes citoplasmáticos: la proteína rac y las subunidades p40phox, p47phox y p67phox o nox-4 (*Touyz et al., 2002*). Para la activación de este complejo enzimático se debe producir la translocación de los componentes citoplasmáticos a la membrana plasmática. La fosforilación de la subunidad p47phox permite el desplazamiento y unión del resto de subunidades citoplasmáticas, a las subunidades de membrana del enzima, iniciándose la cascada de activación. Una vez activada la NAD(P)H oxidasa, se produce la transferencia de electrones del NADPH citosólico al oxígeno del espacio extracelular generando O_2^- , principalmente extracelular (*Cross y Segal , 2004*).

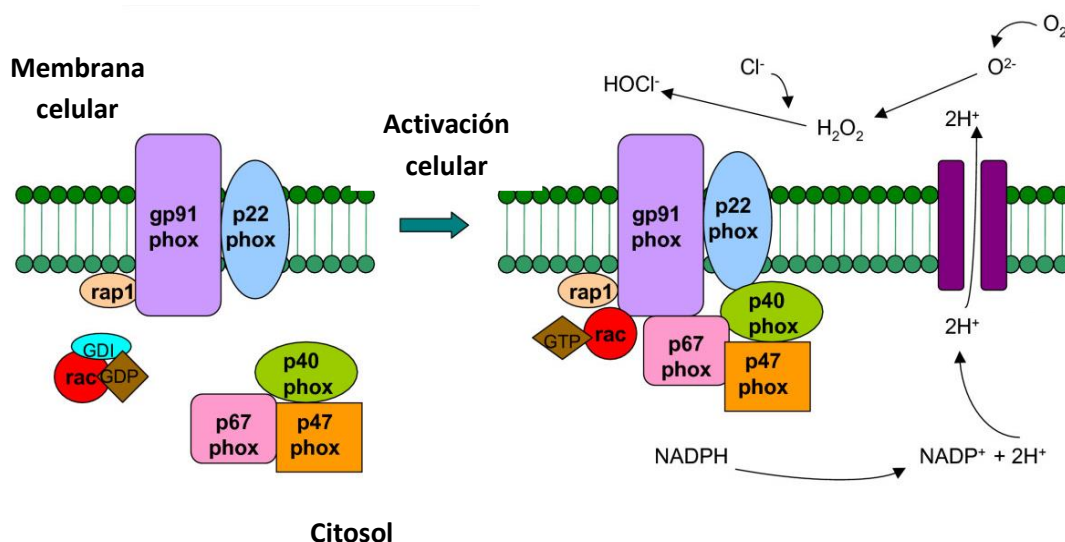


Fig. 4. Mecanismo de activación NAD(P)H oxidasa. La activación de diferentes receptores en la membrana celular promueve la fosforilación de p47 phox y su posterior unión, y la del resto de subunidades

citoplasmáticas, a las subunidades de membrana. El desplazamiento de rac, una vez unida a GTP gracias a la acción de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3-K) a la membrana, contribuye también a la activación de la enzima, que a partir de NADPH y O_2 produce, mediante un sistema redox de transporte electrónico en el dominio reductasa formado por las subunidades gp 91 phox y p22 phox, NADPH, H^+ y anión superóxido, O_2^- .

La NAD(P)H oxidasa posee una actividad constitutiva, pero puede ser regulada tanto por factores humorales como la angiotensina II, factor de crecimiento, trombina y glucocorticoides, así como por factores físicos como el roce tangencial (shear stress) (Zalba et al., 2001). La activación de la NAD(P)H oxidasa por la angiotensina II constituye uno de los mecanismos fundamentales en la fisiopatología de la disfunción endotelial asociada a hipertensión, junto con la eNOS desacoplada (Mollnau et al., 2002, Endemann et al. 2004).

La expresión de algunas subunidades de la NAD(P)H oxidasa en el sistema vascular y, la implicación del O_2^- generado por este complejo multienzimático como segundo mensajero de la señalización celular en algunas patologías vasculares (Touyz et al. 2002), han puesto de manifiesto la importancia de este sistema enzimático en pacientes con disfunción endotelial, arteriosclerosis y otros factores de riesgo cardiovascular.

➤ **Xantina oxidasa.**

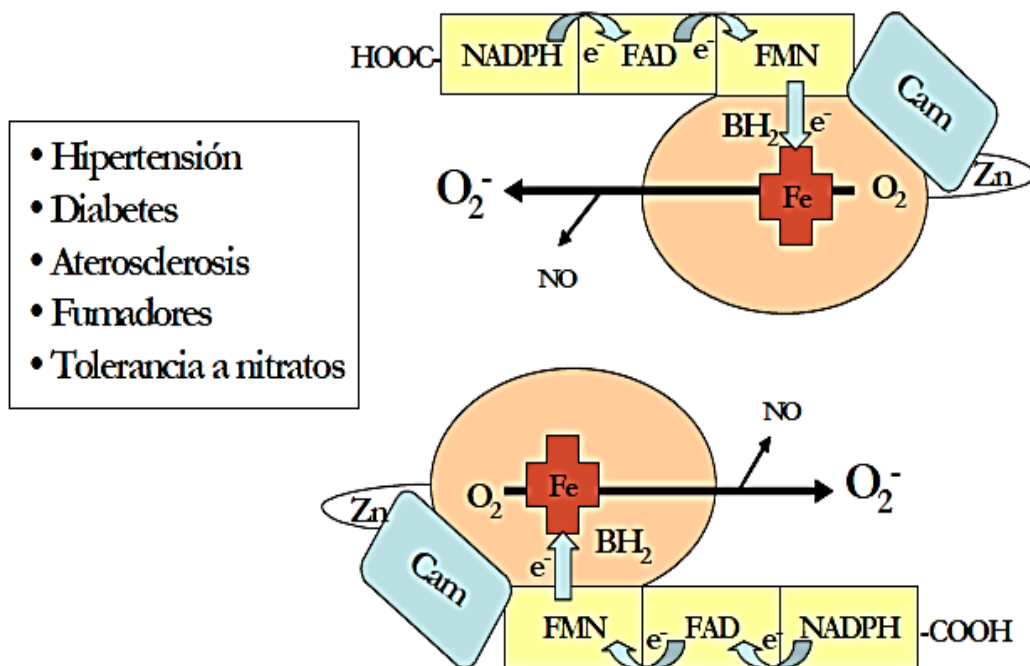
Es una enzima citosólica que genera O_2^- y H_2O_2 durante la oxidación de hipoxantina a xantina en el proceso del metabolismo de las purinas. En condiciones normales, este enzima se presenta como una deshidrogenasa, la xantina deshidrogenasa, pero en situaciones de hipoxia, el enzima sufre una conversión a xantina oxidasa, que emplea

oxígeno molecular como aceptor de electrones, con la consiguiente producción de xantina, O_2^- y H_2O_2 (Andrade, 2000).

En algunos estudios se ha descrito que la inhibición de la XO con oxipurinol o alopurinol, puede mejorar la disfunción endotelial (Mervaala *et al.*, 2001; Butler *et al.*, 2000).

➤ **Papel de la eNOS desacoplada.**

La eNOS desacoplada constituye, junto con la NAD(P)H oxidasa, una de las fuentes principales de ERO. Una deficiencia en el sustrato, L-arginina, o en alguno de los cofactores del enzima, como la BH₄, está asociada con un desacoplamiento de la vía, lo que produce una reducción de la cantidad de NO y un aumento de la presencia de radicales anión superóxido y peroxinitrito (Landmesser *et al.*, 2003, Forstermann, 2006). De esta forma, el desacoplamiento de la eNOS es también un mecanismo crítico en la disfunción endotelial experimental y clínica (Vasquez-Vivar *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la disfunción de la eNOS no sólo altera la vasodilatación endotelio dependiente (Kawasima; 2004), sino que además, acelera la formación de lesiones ateroscleróticas (Kawashima S y Yokoyama M; 2004).



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

Fig. 5. Desacoplamiento de la eNOS. La enzima en forma de monómero o en condiciones de de baja biodisponibilidad de L-arginina, o tetrahidrobiopterina (BH_4) (por aumento de su oxidación a dihidrobiopterina [BH_2]) que puede ser debido a diversos factores como hipertensión, diabetes, aterosclerosis, adicción al tabaco o tolerancia a los nitratos, se encuentra en un estado que se denomina “desacoplada”, en el que en lugar de producir NO , produce mayoritariamente O_2^- .

2.2.1.2. Enzimas antioxidantes.

En condiciones fisiológicas normales, el organismo neutraliza las ERO a través de varios mecanismos antioxidantes que involucran la producción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y otras, para prevenir el daño oxidante.

➤ **Superóxido Dismutasa (SOD).**

Es la primera línea defensiva frente a la producción de radicales superóxidos convirtiéndolos en oxígeno y peróxido de hidrógeno. En el ser humano y otros mamíferos existen tres isoenzimas, en función del ión metálico acoplado al sitio catalítico. La SOD que contiene cobre y zinc (CuZn-SOD) localizada en el citosol de las células eucariotas, mientras que la SOD que contiene manganeso (Mn-SOD) se encuentra en la matriz mitocondrial. En mamíferos, la mayor actividad SOD se encuentra en el hígado, seguida de riñón, cerebro, adrenal y corazón (Fig. 6).

➤ **Glutación Peroxidasa (GPx).**

La Glutación Peroxidasa (GPx) cataliza la reducción del H_2O_2 y los hidroperóxidos orgánicos a H_2O y alcohol, respectivamente, usando glutatión reducido (GSH) como donante de electrones. Su actividad es alta en el hígado y los eritrocitos y moderada en cerebro, riñón y corazón. La expresión de su gen está regulada por factores como la tensión de oxígeno, la tasa metabólica, el crecimiento, y las toxinas y xenobióticos (Fig. 6).

➤ **Catalasa (CAT).**

Este enzima cataliza la descomposición de H_2O_2 a H_2O . Se localiza principalmente en los peroxisomas, y su distribución tisular es similar a la de SOD. Tiene una amplia distribución en el organismo humano, y se localiza a nivel celular en las mitocondrias, peroxisomas y citosol (Fig. 6).

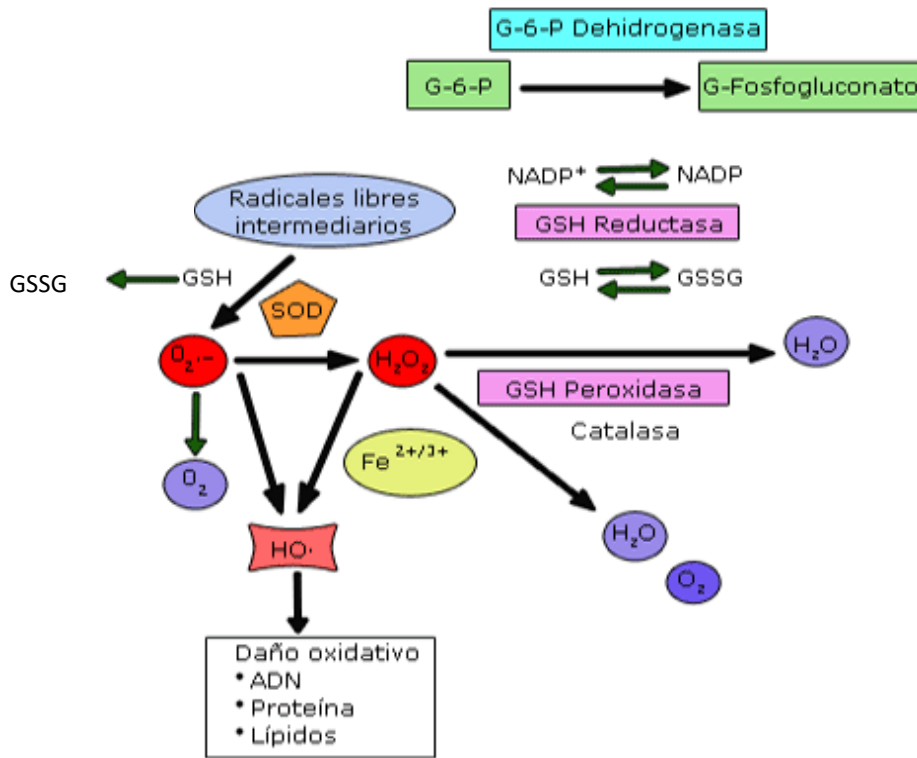


Fig. 6. Principales procesos enzimáticos antioxidantes.

2.2.1.3. Antioxidantes no enzimáticos.

➤ Glutati3n (GSH).

El GSH es un tripéptido ti3lico presente en la mayoría de las células de animales y plantas. Está constituido por tres aminoácidos: glutámico, cisteína y glicina. Puede encontrarse en dos formas, bien como glutati3n reducido (GSH) o como glutati3n oxidado (GSSG), según su estado de óxido-reducci3n. El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metab3licas. Es uno de los antioxidantes más abundante de la célula, reaccionando directamente con los radicales libres, sin necesidad de intervenci3n enzimática, o bien, por medio de la GPx. Además, protege frente al efecto nocivo de las radiaciones. También parece intervenir en la reducci3n de diversos antioxidantes

celulares, como la vitamina E. El hígado es el órgano más importante que participa en la regulación del metabolismo redox sistémico, y en la producción del agente sistémico antioxidante más importante, ya que proporciona aproximadamente el 90% del GSH circulante en condiciones fisiológicas (Halliwell y Gutteridge, 1995). Cuando se da una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio de la enzima glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere NADPH como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6- fosfatodeshidrogenasa.

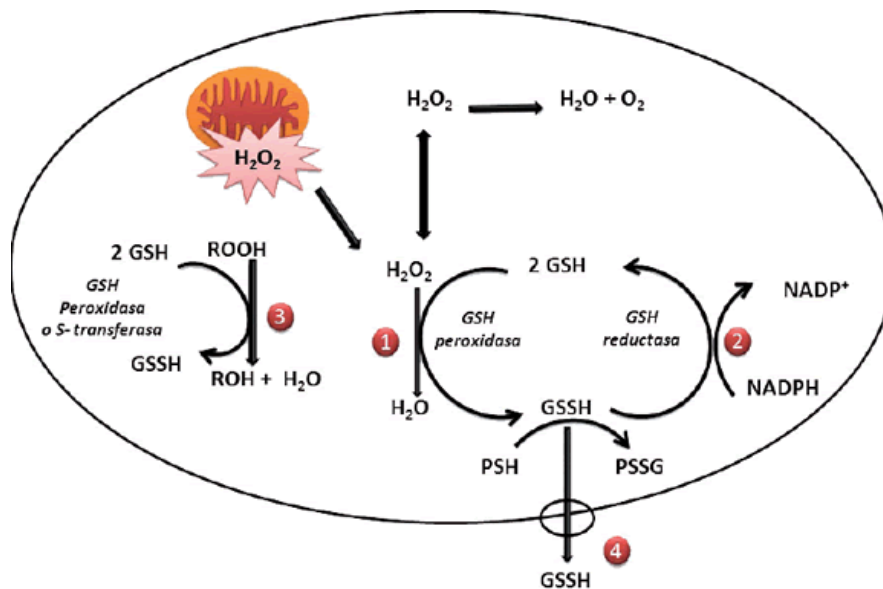


Fig. 7. Función antioxidante del glutatión. 1. El peróxido de hidrógeno formado por el metabolismo aeróbico es metabolizado por la enzima GSH peroxidasa formando GSSG. 2. GSSG formado en la reacción anterior es reducido por la enzima GSH reductasa utilizando NADPH como cofactor. 3. Los peróxidos orgánicos formados pueden ser reducidos por GSH peroxidasa. 4. El GSSG formado durante el estrés oxidativo que no puede ser reducido a GSH es exportado de la célula para mantener el equilibrio redox.

➤ **Vitamina E.**

Se trata de una familia de compuestos fenólicos altamente lipofílicos, por lo que tienden a concentrarse en las membranas biológicas y lipoproteínas plasmáticas, especialmente en la membrana mitocondrial interna, jugando un papel fundamental en la protección frente a peroxidación lipídica de las membranas celulares. Se encuentra en hígado, corazón, pulmón y tejido adiposo, especialmente en el tejido adiposo pardo. El organismo no puede sintetizar esta molécula, así que su presencia en el organismo depende exclusivamente de la ingesta. Las principales fuentes alimentarias de vitamina E son los aceites vegetales (girasol, maíz, soja, algodón) y sus productos derivados, las nueces, el germen de trigo y algunos vegetales de hojas verdes.

➤ **Vitamina C.**

A diferencia de la vitamina E, la vitamina C o ácido ascórbico es una molécula hidrosoluble presente en el citoplasma de las células y en el fluido extracelular. Aunque puede interaccionar directamente con los radicales O_2^- y OH^- , parece que su principal función es participar en el reciclaje de la vitamina E. En determinadas condiciones, puede actuar como pro-oxidante in vitro. Al igual que la vitamina E, no puede ser sintetizada por los humanos, por lo que ha de ser adquirida por la ingesta de alimentos como las frutas (especialmente los cítricos, las cerezas y el melón) y algunos vegetales (tomates, coliflor, col, brócoli).

➤ **Otros antioxidantes.**

Los carotenoides, procedentes de la dieta (tomate, zanahoria, cítricos, espinacas, maíz) son capaces de neutralizar al O_2^- y de inhibir la peroxidación lipídica. Además, participan en el sistema antioxidante el ácido úrico, la bilirrubina y la coenzima Q10.

2.2.2. Disfunción endotelial y enfermedad cardiovascular.

La disfunción endotelial, caracterizada por una alteración en la regulación del tono vascular ocasionado por un desequilibrio entre sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras, se encuentra presente en diferentes enfermedades cardiovasculares como la hipertensión (*Panza et al., 1990; Higashi et al., 1995*), la diabetes mellitus (*Ting et al., 1996; Adams et al., 1996*), la enfermedad coronaria (*Levine et al., 1996; Hambrecht et al., 2000*), la insuficiencia cardiaca congestiva (*Landmesser et al., 2002*) y la insuficiencia renal (*Yildiz et al., 2003; Bolton et al., 2001*).

En los pacientes con hipertensión arterial, la disfunción endotelial contribuye a una pérdida de vasodilatación dependiente de endotelio, y por tanto, a un incremento de la resistencia vascular periférica. En diferentes modelos experimentales de hipertensión también se confirma dicha pérdida vasodilatadora, demostrada en varios lechos vasculares, incluyendo los pequeños vasos de resistencia (*Park et al., 2001; Schiffrin et al., 2000*).

Factores de riesgo cardiovascular como la dislipemia (*Creager et al., 1990; Gilligan et al., 1994*), la obesidad (*Raitakari et al., 2004*), el tabaco (*Oida et al., 2003*) o el sedentarismo (*Green et al., 2003*) están asociados con la disfunción endotelial, que a su vez, son frecuentes en los pacientes con hipertensión arterial. Esto ha puesto de manifiesto que la disfunción endotelial no sólo es una consecuencia de la enfermedad cardiovascular sino que puede preceder a ésta.

Diferentes estudios han demostrado disfunción endotelial en individuos normotensos descendientes de familias con alta incidencia de hipertensión esencial, lo que sugiere una participación de la

disfunción endotelial en la patogenia de la enfermedad (*Taddei et al., 1996; Horning et al., 1997, Rizzoni et al., 1998*).

En diabéticos tipo 2 con resistencia a la insulina, también se ha detectado una elevación de los marcadores de disfunción endotelial antes de que la enfermedad se manifieste (*Balletshofer et al., 2000*).

Por tanto, la disfunción endotelial es considerada marcador pronóstico de la enfermedad cardiovascular, al contribuir en el desarrollo y progresión de la misma.

2.3. Remodelado vascular.

Se define como un proceso activo de alteración estructural que involucra cambios en los procesos celulares de crecimiento, muerte, migración y producción-degradación de matriz extracelular. Depende de una interacción dinámica entre factores de crecimiento local, sustancias vasoactivas y estímulos hemodinámicos.

El remodelado vascular da lugar a cambios estructurales que alteran el diámetro vascular, desde la constricción (estenosis) al alargamiento (aneurisma) de la pared (*Michel et al., 2007*).

Este remodelado puede ser hipertrófico o eutrófico:

- Hipertrófico, es el que presentan las grandes arterias y disminuye el diámetro de la luz asociado a un incremento del grosor de la pared del vaso.
- Eutrófico, disminuye el diámetro de la luz sin cambios en el grosor la pared del vaso y predomina en los vasos de resistencia de menor calibre, durante las etapas iniciales de la

hipertensión, por migración y reordenamiento celular (*Bellido et al., 2003*), donde el SRAA puede jugar un papel importante.

La presión intravascular provoca un aumento del estrés de la pared que va a estimular algunos procesos hipertróficos originando un aumento en el grosor de la pared. Un aumento en el flujo sanguíneo aumenta el diámetro del vaso y provoca un engrosamiento de la pared.

Un pilar importante, en el proceso de remodelado vascular, lo constituye el SRAA (*Touyz et al. 2001*), en especial, la Angiotensina II, capaz de estimular el crecimiento de la pared vascular facilitando la producción y la acción de factores mitogénicos como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor plaquetario de crecimiento (PDGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) o el factor de crecimiento tumoral (β TGF), que favorecen la proliferación de las células musculares lisas y la síntesis de proteínas. Como consecuencia, se produce un engrosamiento en el espacio subintimal y en la capa media, así como acumulación de colágeno en la adventicia (*Laheira et al., 2000*), contribuyendo al desarrollo de la hipertensión y al daño en órganos diana (*Feihl et al. 2008, Mathiassen et al. 2007, Rizzoni et al. 2003*).

Los componentes de la matriz extracelular también pueden contribuir al funcionamiento anormal de las arterias de resistencia, debido a los cambios en los componentes de la matriz y los correspondientes receptores de adhesión, que interactúan entre las células del músculo liso y las proteínas de la matriz, dando lugar a un reordenamiento de las células musculares lisas y posterior reestructuración de la pared vascular (*Intengan et al., 2000*)

Los pacientes hipertensos presentan, por tanto, un aumento de la resistencia vascular periférica, debido a alteraciones estructurales, secundarias al estrechamiento de los vasos pequeños (*Intengan et al., 2000; Mulvany, 2003; Bund et al., 2003; Condezo-Hoyos et al., 2012*), y a alteraciones funcionales, ya que se acompaña de un deterioro de la

respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio atribuido a una reducción en la biodisponibilidad del NO, lo que conlleva a una vasoconstricción y posterior incremento de la resistencia vascular periférica (Sagach et al., 2006; Lee et al., 2008).

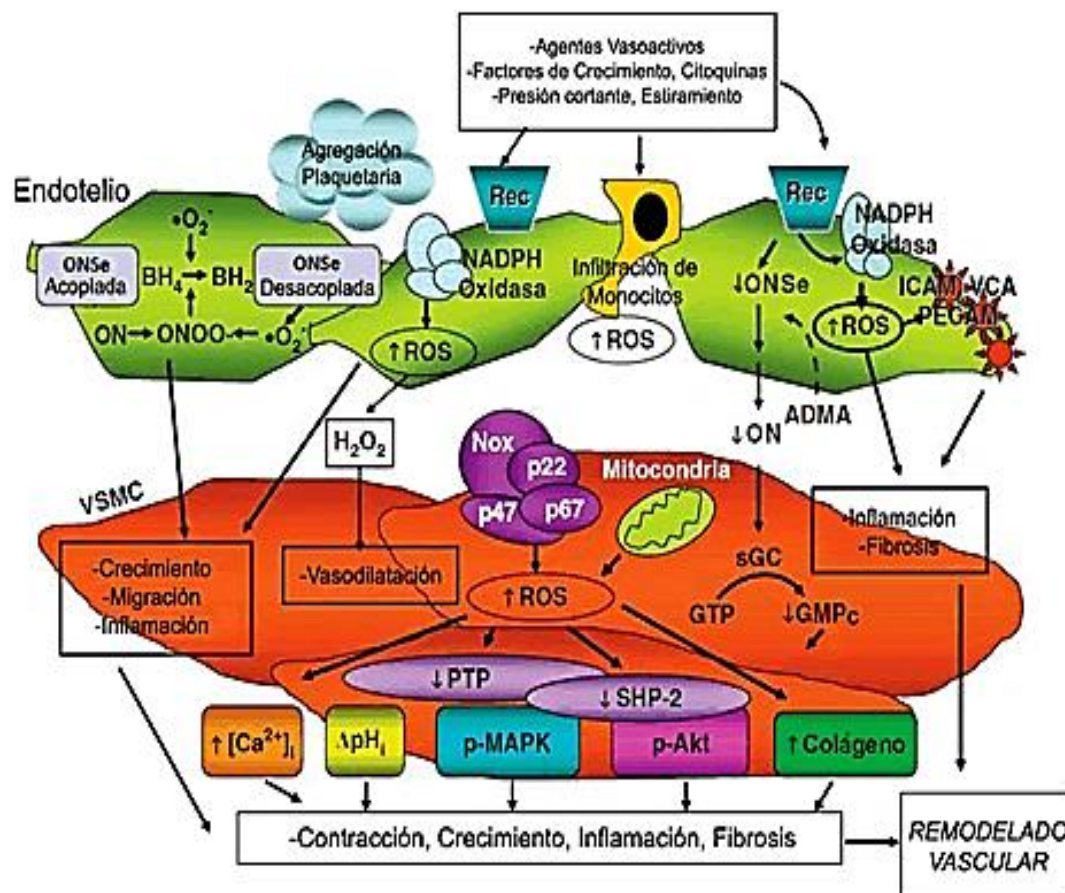


Fig. 8. Remodelado vascular inducido por estrés oxidativo. (Modificada de Touyz y Briones, 2011).

La activación de las enzimas generadas de ERO, como la NAD(P)H oxidasa, la eNOS desacoplada, las enzimas mitocondriales en el endotelio y las células musculares lisas vasculares conlleva a la disminución de la producción de NO y a una generación aumentada de

O₂⁻ y H₂O₂, los cuales influyen sobre moléculas de señalización sensibles a los cambios oxidativos como las MAPKs, p-Akt, los canales iónicos, factores de transcripción que inducen la expresión de las moléculas de adhesión proinflamatoria (ICAM), las moléculas de adhesión de la célula vascular y moléculas de adhesión plaquetaria al endotelio. Estos procesos conducen al crecimiento vascular, fibrosis contracción/dilatación, inflamación y la agregación de plaquetas, los cuales sustentan el daño vascular y la remodelación estructural en la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares.

3. Flavonoides. Generalidades.

Los flavonoides (del latín flavus, “amarillo”) son sustancias producidas como metabolitos secundarios de las plantas, principalmente frutas y verduras. Fueron descubiertos en 1930s por Albert Szent-Györgyi, quien aisló a partir de la cáscara del limón, la citrina, considerada inicialmente como vitamina, siendo denominada vitamina P por sus efectos en la permeabilidad capilar. Sin embargo, el interés en estos componentes decayó en los años 40, al demostrarse que no eran requeridos como micronutrientes para la salud humana. No es hasta los años 90, a partir del trabajo de Hertog, cuando son clasificados como antioxidantes (*Serafini et al.; 1994*), tras demostrarse en diversos estudios epidemiológicos, un descenso en la incidencia y mortalidad tanto de las enfermedades cardiovasculares como del cáncer tras un aumento del consumo de flavonoides (*Hertog et al. 1997, Arai et al, 2000*).

Los flavonoides se encuentran presentes en cantidades apreciables en múltiples alimentos tales como cebollas, ciruelas, arándanos, manzanas, naranjas, fresas, espinacas además de en chocolate amargo, los frutos secos, el vino tinto, los derivados de la soja y el té (*Aherne et al. 2002*). La presencia de estos micronutrientes, en un gran número de alimentos de origen vegetal, podría explicar en parte el efecto beneficioso de las dietas ricas en frutas y verduras.

Los flavonoides comprenden un amplio grupo de compuestos polifenólicos que poseen un núcleo básico de flavano con dos anillos aromáticos (A y B), los cuales se encuentran interconectados por un anillo heterocíclico de 3 átomos de carbono (anillo C), el cual, a su vez puede estar unido al anillo B en C-2 (flavona), en C-3 (isoflavona) o en C-4 (neoflavano). Debido a la diversidad de modificaciones que pueden presentarse en los 3 anillos, los flavonoides representan uno de los

grupos más amplios de compuestos (*Middleton et al., 2000; Van Hoorn et al., 2003*) dando lugar a distintas subfamilias, entre las que destacan: antocianos, flavonas, flavonoles, flavanoles, isoflavonas, chalconas, flavanonas y dihidrochalconas.

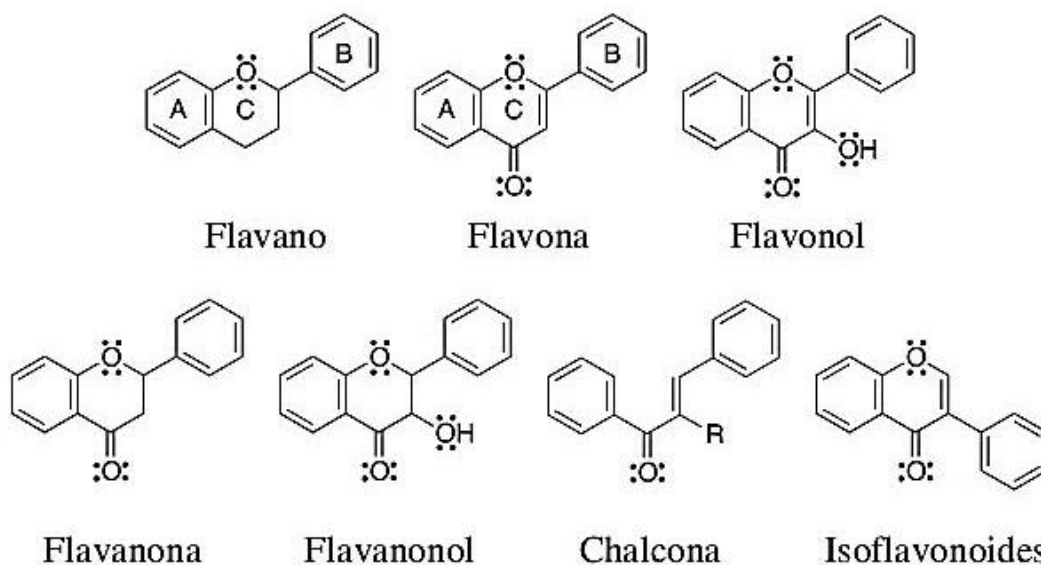


Fig. 9. Estructura química de las subclases de flavonoides más frecuentes.

Los flavonoides se encuentran mayoritariamente como glicósidos, pero también pueden aparecer como forma libre (aglicón). Los flavonoles se encuentran en los alimentos, principalmente, en forma de diversos glicósidos, mientras que los flavanoles lo están habitualmente en forma de aglicones, siendo muy escasas sus formas glicosiladas. Estos últimos existen tanto en forma de monómeros (catequinas) como de polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). Los flavonoles son los flavonoides más ubicuos en los alimentos, siendo la quercetina con diferencia el flavonol más abundante en la dieta (*Hertog et al., 1996*), representando alrededor de un 60-75%. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de la ingesta

de flavonoides se estima en 20-35 mg/ día (*Hertog et al., 1996; Manach et al., 2004*), existiendo amplias variaciones interindividuales y entre poblaciones, en cuanto a cantidad y tipo de flavonoides consumidos (*Arts et al., 2001*), así por ejemplo, en Italia el consumo medio de flavonoles se encuentra entre 5 y 125 mg al día, en Finlandia se consume en torno a 82 mg, llegando a alcanzar hasta 200 mg de antocianidinas, y en Alemania varía el consumo de flavonoles más flavonas de 4 a 100 mg al día (*Sampson et al., 2002; Heinonen 2001; Pietta et al., 1996*). El vino tinto, por ejemplo, contiene 1,8 g/l de polifenoles, entre los que los flavonoides forman el grupo mayoritario, con concentraciones entre 1,36-1,5 g/l (*Waterhouse, 2002*). Debido a su ubicuidad en la dieta y disponibilidad como suplementos dietéticos, quercetina y catequina son los compuestos más comúnmente utilizados en los estudios de biodisponibilidad y actividad de flavonoides.

Son numerosos los estudios que han avalado las propiedades biológicas de los polifenoles (*Middleton et al.; 2000; Schroeter et al., 2006; Potenza et al., 2007; Pérez- Vizcaíno et al., 2009*). Un meta-análisis de siete estudios prospectivos de cohorte sobre la ingesta de flavonoides dietéticos concluyó, que los individuos que se encontraban en el tercio superior de ingesta diaria de flavonoles se asociaba a un menor riesgo de mortalidad por enfermedad cardíaca coronaria, con respecto a los incluidos en el tercio inferior, después del ajuste para los factores de riesgo conocidos y otros componentes dietéticos (*Huxley y Neil, 2003*).

Los efectos de los flavonoides son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes lo que justifica sus acciones vasodilatadoras y vasoprotectoras, así como sus acciones antiagregantes, antilipémicas, antiinflamatorias y antiapoptóticas. Tales propiedades explicarían su acción beneficiosa en la patología cardiovascular (*Duarte et al., 2001, Jumar y Schmieder, 2016; Lee et al., 2016, Pang et al., 2016; Santos y Lima, 2016*).

Además de los efectos descritos, los flavonoides son capaces de modular la actividad de un gran número de enzimas implicadas en el control de diferentes procesos fisiológicos, incluyendo el control del tono vascular y la proliferación celular.

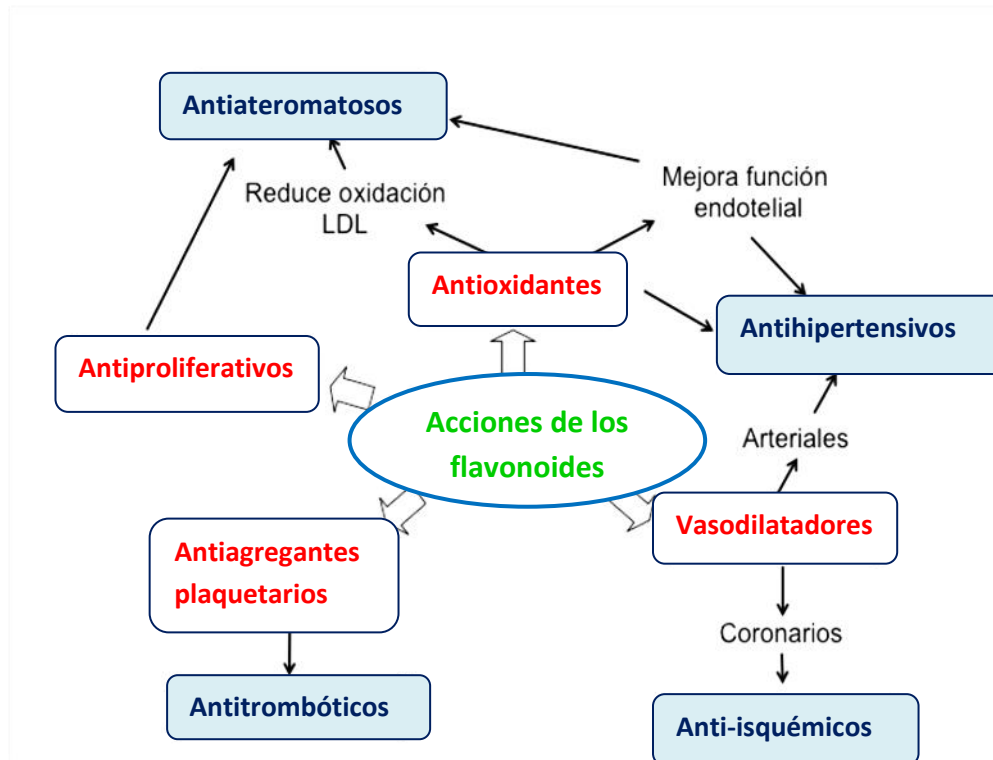


Fig. 10. Acciones cardiovasculares de los flavonoides (Modificado de Duarte et al.; 2015).

Existen también evidencias indirectas de que diversos flavonoides pueden proteger contra el daño de macromoléculas celulares (lípidos, proteínas, ADN), lo que apoya su papel en la prevención de enfermedades en las que el estrés oxidativo es un componente importante de la enfermedad (Meydani, 2001).

3.1. Flavonoides, disfunción endotelial y estrés oxidativo.

La disfunción endotelial se caracteriza por un deterioro en la vasodilatación dependiente de endotelio, la reducción de la actividad de la eNOS y un estado protrombótico y proinflamatorio de las células endoteliales.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la quercetina es capaz de prevenir o revertir la disfunción endotelial, siendo éste, un mecanismo fundamental implicado en los efectos protectores de los flavonoides sobre la salud cardiovascular (*Pérez- Vizcaíno et al., 2006*).

La quercetina ejerce efectos vasodilatadores agudos directos en arterias aisladas de animales (*Duarte et al., 1993*). En los vasos sanos, estos efectos son independientes del endotelio y se producen de manera semejante, en arterias pre-contraídas con diferentes estímulos, aunque con diferente potencia (*Pérez-Vizcaíno et al., 2002*). Algunos grupos, sin embargo, han descrito que los efectos de la quercetina son parcialmente dependientes del endotelio y relacionados con la liberación del factor de relajación del endotelio (*Ajay et al., 2003; Khoo et al., 2010*) y otros, que tales efectos son dependientes de endotelio, tanto en ratas hipertensas (SHR), tras la administración crónica de quercetina (*Machha y Mustafa, 2005*) como en ratas sanas, tras una única dosis (*Benito et al., 2002*).

Los efectos sobre la función endotelial, tanto de la quercetina como de sus metabolitos, son además más intensos en las arterias de resistencia que en los vasos de conductancia (como la aorta), así como en las arterias de animales hipertensos que en las de normotensos (*Pérez- Vizcaíno et al., 2002, Ibarra et al., 2003*).

Se ha observado como la quercetina revierte la disfunción endotelial en aortas de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) tanto *in vivo*, tras administrar una dosis de 10 mg/Kg día, durante 5 semanas (*Duarte et al., 2001a; Sánchez et al., 2006*) como *in vitro*, al añadirla al

baño de órgano (*Ibarra et al., 2003*). Un efecto similar tiene lugar en diversos modelos experimentales de hipertensión en ratas, como la hipertensión producida por la inhibición crónica de la síntesis de NO con L-NAME (*Duarte et al., 2002*), la producida por la administración de glucocorticoides más NaCl (DOCA-sal) (*Galisteo et al., 2004*) o la producida por la nefrectomía unilateral y estenosis de la arterial renal contralateral (modelo Goldblatt) (*García-Saura et al., 2005*, *Choi et al. 2016*), así como en modelos de diabetes tipo I (*Ajay et al., 2006*).

Estudios realizados en humanos, también observaron que la administración de diferentes alimentos ricos en flavonoides tenía un efecto beneficioso a nivel endotelial. Así, la administración durante dos semanas de zumo de uva, rico en flavonoides, a pacientes con cardiopatía isquémica producía una mejoría de la función endotelial (*Stein et al., 1999*) un efecto similar al observado con zumo de pomelo, en pacientes hipertensos (*Reshef et al., 2005*) o con cacao en fumadores (*Heiss et al., 2005*).

En la disfunción endotelial juega un papel importante el aumento de la producción vascular de ERO, como marcador de enfermedad cardiovascular. Todos los modelos experimentales de hipertensión se han asociado a un aumento del estrés oxidativo tanto a nivel plasmático, vascular como hepático, tal y como confirman los niveles de malonilaldehído (MDA) y de isoprostanos detectados en plasma, en tejidos y en la orina procedentes de estos animales. Se ha demostrado que tras la administración de la quercetina, los niveles de estos metabolitos disminuyen de forma significativa (*Duarte et al., 2001a*; *Galisteo et al., 2004*; *García-Saura et al., 2005*; *Sánchez et al., 2006*). Por tanto, la administración crónica de la quercetina, en los diferentes modelos experimentales de hipertensión, previene el deterioro de la función vasodilatadora endotelial, además de detectarse un aumento paralelo de los NOX (nitratos más nitritos, principales metabolitos de NO) en la orina. En varones sanos, la quercetina aumenta los niveles

plasmáticos de S-nitrosotioles, nitritos, y las concentraciones urinarias de nitrato, que de forma indirecta señalan un aumento de NO endotelial (Loke et al., 2008).

En un estudio realizado recientemente, en pacientes prehipertensos, la suplementación con quercetina disminuyó diversos marcadores de disfunción endotelial, como la E selectina y la interleucina-1, así como parámetros inflamatorios, lo que sugiere un efecto beneficioso en la prevención de la enfermedad cardiovascular (Dowers et al., 2015).

Sin embargo, las acciones de la quercetina sobre el NO son complejas, al obtenerse en diferentes estudios, en ausencia de estrés oxidativo, datos contradictorios, observándose tanto un aumento como una disminución de NO (Tauber et al., 2002; López-López et al., 2004).

En determinadas circunstancias, la quercetina puede tener una acción pro-oxidante al comportarse como un captador de NO (Van Acker et al., 1995; Haenen et al., 1999), sin embargo, en presencia de superóxido, la quercetina es un captador más efectivo de superóxido que de NO (López-López et al., 2004).

No obstante, en situaciones de estrés oxidativo, la quercetina se comporta como un barredor de O_2^- , siendo diversos los mecanismos involucrados (Pérez- Vizcaíno et al., 2006):

➤ *Efecto antioxidante directo:*

La quercetina disminuye los niveles de superóxido intracelular y es capaz de proteger al NO del ataque del radical superóxido actuando como un barredor de O_2^- (López-López et al., 2004) explicando así, el efecto agudo observado *in vitro* (Ibarra et al., 2006). En modelos de isquemia-reperfusión, se ha detectado que la quercetina reduce las concentraciones del radical superóxido aumentando los niveles de NO (Huk et al., 1998; Shutenko et al., 1999).

➤ *Inhibición de fuentes enzimáticas:*

A nivel vascular, se ha observado que la quercetina inhibe de manera competitiva la actividad de la xantina oxidasa y la NAD(P)H oxidasa de membrana, ambas, fuentes vasculares de especies reactivas de oxígeno, e inhibe la disfunción endotelial inducida por la administración exógena de NAD(P)H (*Chang et al, 1993, Tauber et al, 1984*).

➤ Pueden evitar la oxidación de la tetrahidrobiopterina (BH4) y el desacoplamiento de la eNOS (*Romero et al., 2009*), debido a sus propiedades antioxidantes.

➤ *Pueden inhibir las vías de señalización:*

Son capaces de modificar el patrón de expresión génica a nivel vascular alterando la expresión de la subunidad reguladora p47phox de la NAD(P)H oxidasa, observado tanto en el modelo SHR como tras inducción con angiotensina II in vitro y, la expresión de la NO sintetasa endotelial y de la caveolina-1 (*Sánchez et al. 2006*).

Además, inhibe la actividad de la fosfatidilinositol-3 kinasa (PI-3 kinasa) y de la proteína kinasa C (PKC), siendo la inhibición de ésta uno de los mecanismos más importantes a través de los cuales los flavonoides ejercen su efecto vasodilatador (*Middleton et al., 2000*).

También se ha descrito la interacción de la quercetina con miembros de la familia de las proteína kinasas activadas por mitógenos (MAP kinasas, ERK y JNK) (*Yoshizumi et al. 2002; Moon et al., 2003*). Ambas kinasas estimulan la expresión de diversas proteínas inducibles y se activan en respuesta a estímulos inflamatorios y aterogénicos como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina-1 β , el estado oxidativo y la hipertensión arterial (*Chakraborti et al., 1998*). Así, la

inhibición de ERK y/o JNK se ha involucrado en los efectos inhibitorios de la quercetina sobre la síntesis de DNA y la hipertrofia de células musculares lisas vasculares en presencia de estímulos proinflamatorios como el TNF- α (Moon *et al.*, 2003) o la angiotensina II (Yoshizumi *et al.*, 2002).

La quercetina, además, puede prevenir el deterioro de NO inducido por la angiotensina II y la endotelina-1 (Romero *et al.*, 2009). El efecto preventivo de quercetina sobre la disfunción endotelial inducida por endotelina-1 parece estar relacionado con la regulación a la baja de p47 phox a través de la inhibición de la proteína kinasa (PKC) (Romero *et al.*, 2009). Se ha demostrado como la quercetina es capaz de inhibir la liberación de ET-1 del endotelio de la vena umbilical humana y de las células endoteliales de aorta bovina (Khan *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 1999). In vivo, la quercetina también reduce los niveles de ET-1 en la orina de los ratones ApoE (Loke *et al.*, 2010) y en humanos sanos (Loke *et al.*, 2008).

En las células del músculo liso vascular (CMVL), el NO ejerce su efecto vasodilatador mediante la activación de la guanilatociclasa soluble y el posterior aumento de guanosínmonofosfato cíclico (GMPc). A su vez, el GMPc es metabolizado por las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDEs) y, por tanto, la actividad del NO y la relajación dependiente del endotelio van a supeditarse en gran medida a la actividad de las PDEs, por lo que su inhibición podría prevenir la disfunción endotelial en ciertas circunstancias (Vlachopoulos *et al.*, 2004). Se ha observado que varios flavonoides pueden inhibir varias isoformas de PDEs, lo que explicaría el efecto preventivo de éstos sobre la disfunción endotelial. La quercetina, además, mejora de forma selectiva la relajación dependiente de GMPc mediante un mecanismo no relacionado con la inhibición de PDEs (Suri *et al.*, 2010).

Otro aspecto interesante, es el posible efecto sinérgico de la quercetina con otros flavonoides importantes de la dieta como la

catequina y que co-existen en múltiples alimentos. Se ha descrito que ambos flavonoides actúan de forma sinérgica para inhibir la actividad NAD(P)H oxidasa y la producción de NO en plaquetas, un efecto que podría también tener lugar a nivel vascular (*Pignatelli et al., 2006*).

3.2. Flavonoides e hipertensión.

La hipertensión es uno de los factores de riesgo más importantes en la aparición de los accidentes cerebrovasculares, la cardiopatía isquémica, la insuficiencia cardíaca, la insuficiencia renal y la arteriopatía periférica. Uno de los objetivos del tratamiento y prevención de la enfermedad cardiovascular es la disminución de las cifras de presión arterial, ya que se ha demostrado que una reducción de dichas cifras se acompaña de una disminución del riesgo cardiovascular (*Turnbull, 2003*).

El tratamiento de la hipertensión incluye tanto medidas higiénico-dietéticas (dieta baja en sal, pérdida de peso, ejercicio...) como farmacológicas. El tratamiento farmacológico, eficaz en la mayor parte de la población, puede no ser suficiente y estar asociado a efectos secundarios (*Larson et al., 2012*). En cuanto a las medidas dietéticas, se ha observado que el consumo de frutas y verduras, tanto en estudios experimentales como epidemiológicos, se encuentra relacionado con una disminución de la presión arterial (*Dauchet et al., 2009*). Curiosamente, esta reducción de presión arterial es mayor en los pacientes hipertensos que en los normotensos (*Margetts et al.; 1986*).

En los últimos años, los flavonoides, presentes en frutas y hortalizas, han recibido especial atención como micronutrientes, por sus efectos beneficiosos sobre la enfermedad cardiovascular (*Erdman et al., 2007*).

Los flavonoides producen un efecto vasodilatador directo en vasos arteriales y venosos aislados (Duarte et al., 1993; Pérez-Vizcaíno et al., 2002). Además, su potencia vasodilatadora es mayor en arterias coronarias (Ibarra et al., 2003) y en arterias procedentes de ratas hipertensas que en sus respectivos controles normotensos (Pignatelli et al., 2006). Uno de los primeros trabajos que estudió los efectos antihipertensivos de la quercetina se llevó a cabo en ratas SHR, modelo genético de hipertensión multifactorial y considerada similar a la hipertensión esencial en humanos (Duarte et al., 1993). Este estudio fue confirmado en sucesivos posteriores (Carlstrom et al., 2007, Romero et al., 2010; Sánchez et al., 2006) y seguido de otros trabajos realizados en diversos modelos experimentales de hipertensión en rata, tales como la hipertensión producida por la inhibición de la NO sintetasa con L-NAME (Duarte et al., 2002), en el modelo inducido por desoxicorticosterona (DOCA-sal)(Galisteo et al., 2004) o en el modelo de hipertensión por estenosis unilateral de la arteria renal o modelo de ratas Goldblatt (García-Saura et al., 2005; Choi et al., 2016) Otros grupos han descrito también efectos similares en el modelo genético sensible a la sal (ratas Dahl)(Aoi et al., 2004) o tras la coartación de la aorta(Jalili et al., 2006). Además, la quercetina también redujo la presión arterial en modelos de animales de resistencia a la insulina y de síndrome metabólico, como las ratas Zucker obesas (Rivera et al., 2008) y en ratas alimentadas con un alto contenido de grasas y una dieta rica en sacarosa (Yamamoto et al., 2006). En todos estos modelos de animales de hipertensión, la quercetina ha demostrado efectos antihipertensivos cuando se administran de manera crónica, siendo la dosis más frecuentemente empleada de 10 mg/ Kg⁻¹ al día, aunque las dosis efectivas usadas van desde 2 a 300mg/ Kg⁻¹ por día. En los diferentes estudios se ha visto que el efecto antihipertensivo es dosis dependiente y afecta a la presión arterial sistólica, diastólica y presión arterial media. Este efecto antihipertensivo no aparece inmediatamente, normalmente comienza a las dos semanas del tratamiento,

manteniéndose durante todo el tiempo suministrado y hasta 48 horas desde su interrupción. Excepto en un trabajo (*Carlstrom J et al., 2007*), además, este efecto es independiente del modo de administración. La quercetina ha demostrado ser eficaz en todos estos modelos de ratas, independientemente del origen de la hipertensión, del sistema renina-angiotensina, estrés oxidativo y óxido nítrico, sin embargo, no tiene ningún efecto hipotensor en animales normotensos.

También se ha demostrado una reducción de la hipertrofia cardíaca izquierda con quercetina en ratas SHR (*Duarte et al., 1993*), en las ratas tratadas con desoxicorticosterona (DOCA-salt) (*Galisteo et al., 2004*), en las ratas hipertensas Goldblatt (*García-Saura et al., 2005*) y en las ratas hipertensas con constricción de aorta (*Jalili et al., 2006*), y produjo efectos protectores a nivel renal, tanto a nivel estructural como funcional, en modelos de hipertensión como en las ratas L-NAME (*Duarte et al., 2002*), las ratas DOCA-sal (*Galisteo et al., 2004*), las ratas Goldblatt (*García-Saura et al., 2005*) y en las ratas Dahl sensibles a la sal (*Aoi et al., 2004*). Sin embargo, en el modelo de ratas SHR, no produjo una reducción significativa de la hipertrofia renal (*Duarte et al., 2011*).

Por tanto, estos efectos antihipertensivos se acompañan de una reducción del daño orgánico asociado como la hipertrofia cardíaca, las alteraciones histológicas renales, la proteinuria, el remodelado vascular y la disfunción endotelial, además de una reducción de los marcadores de estrés oxidativo en plasma, hígado y orina (*Duarte et al., 2001a; Duarte et al., 2001b; Duarte et al., 2002; Galisteo et al., 2004*).

Uno de los primeros estudios realizados en humanos, que analizó los efectos de quercetina sobre los factores de riesgo cardiovascular en voluntarios sanos, fue el descrito por Conquer et al. en 1998. En éste, el consumo de quercetina no modificó de forma significativa ningún factor de riesgo cardiovascular incluido la hipertensión, al igual que se había observado previamente en animales sanos. Estudios posteriores,

demonstraron resultados similares en pacientes prehipertensos, sin embargo, si se produjo una reducción de la presión arterial tanto sistólica como diastólica en aquellos pacientes hipertensos en fase I (*Edwards et al., 2007*). En otro estudio realizado en pacientes con síndrome metabólico, el consumo de quercetina a una dosis de 150 mg /día durante 6 semanas, indujo una disminución de la presión arterial sistólica, sin embargo, no tuvo ningún efecto sobre el perfil lipídico e incluso ejerció un efecto perjudicial en uno de los subgrupos del estudio (ApoE4) con disminución del HDL en suero. (*Egert et al. en 2009, Egert et al. 2010*). La quercetina también redujo la tensión arterial sistólica en fumadores prehipertensos (*Lee et al., 2011*) y en mujeres con diabetes mellitus tipo 2, tratadas con dosis farmacológicas de quercetina (500 y 730 mg) (*Zahedi et al., 2013*). Otro estudio que incluía a un número elevado de individuos sanos (n=1002) la quercetina produjo una reducción modesta pero significativa de la presión arterial (*Knab et al 2011*).

En un metanálisis reciente, se ha analizado el efecto antihipertensivo de la quercetina, cuyos resultados muestran una reducción estadísticamente significativa de la presión arterial tanto sistólica como diastólica con dosis >500 mg / día. (*Serban et al., 2016*).

Aunque se han sugerido varias vías, aún no se conoce con exactitud el mecanismo con el cual la quercetina ejerce un efecto antihipertensivo (*Brüll et al., 2015*), pero el amplio espectro de efectos antihipertensivos en modelos de muy distinto origen fisiopatológico sugiere que podrían intervenir múltiples mecanismos: sus efectos vasodilatadores directos, sus efectos sobre el estrés oxidativo o las alteraciones de la expresión génica como consecuencia de la inhibición de proteínas kinasas y factores de transcripción y / o interferencia con el sistema renina-angiotensina-aldosterona (*Larson et al., 2012*). Recientemente, se le ha adjudicado un nuevo mecanismo de acción, al activar el contrantransportador NKCC1 a nivel renal, con el consiguiente

aumento de Cl-citosólico, el cual a su vez inhibe la expresión génica del canal de Na⁺ y por tanto la reabsorción de éste (*Marunaka et al.,2017*).

Esta gran diversidad de posibles mecanismos de acción de la quercetina, y de los flavonoides en general, hace que estos compuestos no deban ser considerados sólo como antioxidantes.

3.3. Flavonoides y aterosclerosis.

La aterosclerosis se define, actualmente, como una enfermedad multifactorial, en la que se encuentran involucrados factores como el estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción endotelial. Uno de los mecanismos responsables de la disfunción endotelial es el aumento de la oxidación de las LDL. Estas lipoproteínas, citotóxicas para el endotelio, son además, quimiotácticas para los macrófagos y los monocitos, ya que promueven la presencia de éstos en la lámina íntima de los vasos sanguíneos. Estos monocitos fagocitan las LDL oxidadas por los radicales peroxinitrito o hidroxilo, formando las células espumosas características de la estría grasa, estadio primario en la formación de la placa de ateroma.

Numerosos trabajos relacionan el efecto de los flavonoides con la protección de la oxidación de las LDL (*Yang et al., 2011*). Ya en 1990, De Whalley et al., demostraron que ciertos flavonoides eran inhibidores de la modificación de LDL por macrófagos en ratones. El efecto protector de los flavonoides contra la aterosclerosis podría estar mediado por la prevención de uno o varios de los procesos implicados en la progresión de la enfermedad aterosclerótica. Sin embargo, los mecanismos de acción no están totalmente claros. Se han postulado varias líneas defensivas: la primera, tras la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas y la segunda, por bloqueo directo a nivel celular de la toxicidad de LDL oxidadas.

El consumo de dosis bajas de quercetina redujo la progresión de la aterosclerosis en ratones knockout ApoE (*Hayek et al., 1997; Loke et al., 2010*), sin embargo, no se produjo modificaciones en el colesterol LDL o HDL en plasma (*Hayek et al., 1997*). Tampoco hubo modificaciones en el perfil lipídico en las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas o en sacarosa (*Yamamoto et al., 2006*) ni en los seres humanos con sobrepeso y con un fenotipo ApoE3, llegando incluso a reducir la relación HDL/LDL en los portadores de fenotipo ApoE4 (*Egert et al., 2009*). Por el contrario, se ha demostrado una reducción en los niveles séricos de triglicéridos y colesterol en conejos alimentados con una dieta alta en colesterol (*Kamada et al., 2005*).

Aunque quercetina no tiene ningún efecto beneficioso sobre el perfil lipídico plasmático, si inhibe la susceptibilidad de LDL a la oxidación (*Hayek et al., 1997*), la citotoxicidad inducida por LDL (*Negre-Salvayre et al., 1992*) y la formación de estrias grasas en la aorta (*Auger et al., 2005*). Sin embargo, en estudios realizados en humanos, la oxidación de las LDL no se vio modificada por el consumo de flavonoides (*de Rijke et al., 1996*), por lo que el efecto de los flavonoides sobre la oxidación de las LDL podría variar dependiendo de su estructura, la fuente y la dosis. Un dato destacable es que los metabolitos de la quercetina se acumulan en las lesiones ateroscleróticas humanas, pero no en la aorta sana (*Kawai et al., 2008*).

En la formación de la placa aterosclerótica se encuentran involucradas las moléculas de adhesión y las metaloproteinasas de la matriz, así como la infiltración de células inflamatorias. La quercetina fue capaz de reducir el aumento inducido por el TNF- α en las moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1 y MCP-1, tanto a nivel de la proteína como del ARNm, en el endotelio humano y en las células del músculo liso vascular. El efecto inhibitorio sobre la expresión de ICAM-1 parece estar mediado a través de una inhibición de la vía JNK/AP-1 (*Kobuchi et al., 1999*). Sin embargo, los metabolitos de la quercetina, la quercetina-

3'-sulfato, quercetina-3- glucurónido y 3'-methilquercetina-3- glucurónido no mostraron apenas efecto (*Tribolo et al., 2008; Winterbone et al., 2009*).

Los mecanismos moleculares a través de los cuales la quercetina puede inhibir la expresión de genes inflamatorios, aún no han sido totalmente aclarados. En otros estudios, tanto quercetina como otros flavonoides inhibieron la producción de marcadores TNF- α , así como la expresión de la NOS inducible (iNOS) y la producción de NO en macrófagos activados por lipopolisacáridos (*Comalada et al., 2006*).

3.4. Flavonoides y plaquetas.

El efecto antiagregante plaquetario de los flavonoles fue descrito inicialmente por Beretz *et al.* (1982). Este efecto antiagregante puede justificarse en base a su capacidad para inhibir enzimas como el tromboxano A₂ (TXA₂), la ciclooxigenasa (COX), y la lipooxigenasa (LOX). Estos compuestos inhiben, por lo tanto, la síntesis de moléculas derivadas del ácido araquidónico que están directamente involucradas en la regulación de la homeostasis vascular (*Murphy et al., 2003*).

La quercetina inhibe la activación de NAD(P)H oxidasa dependiente de PKC en las plaquetas (*Pignatelli et al., 2006*). Sin embargo, los efectos antiagregantes *in vivo* de la quercetina han sido cuestionados por numerosos investigadores. En un estudio en humanos, en el que a través de la cebolla se ingería 114 mg de quercetina por día, no se observaron cambios en la agregación plaquetaria, ni en la producción de tromboxano B₂, el factor VII o en otras variables hemostáticas (*Janssen et al., 1998*). Sin embargo, estudios posteriores obtuvieron resultados opuestos, demostrando una inhibición de la agregación plaquetaria tras la administración de

suplementos de quercetina o tras una dieta enriquecida (Hubbard et al., 2004, Hubbard et al., 2006).

3.5. Flavonoides y cardiopatía isquémica.

La cardiopatía isquémica agrupa a un conjunto de entidades clínicas como el infarto agudo de miocardio, la angina, la insuficiencia cardiaca y la muerte súbita, cuyo principal factor de riesgo es la aterosclerosis. Se ha demostrado que la reducción del colesterol LDL, la prevención de la aterosclerosis y el control de la presión arterial conducen a un descenso significativo en el riesgo de enfermedad coronaria (Turnbull, 2003).

Son numerosos los estudios clínicos que han correlacionado la ingesta de flavonoides con una disminución de la incidencia de la enfermedad coronaria (Hertog et al., 1993; Wang et al., 2011, Du et al., 2016, Goetz et al., 2016).

Las propiedades de los flavonoides, además de su efecto antioxidante, incluyen acciones antiinflamatorias, antitrombóticas, vasodilatadoras, antiagregantes y antilipémicas, lo que explicaría, su efecto beneficioso a nivel de la patología cardiovascular.

Estudios epidemiológicos observaron que los flavonoides presentes en el jugo de granada, el vino tinto y las uvas previenen la oxidación de la LDL en la pared vascular además de aumentar la vasodilatación coronaria en enfermos cardiacos (Stein et al., 1999).

El estrés oxidativo juega un papel importante en el inicio y progresión de la placa de aterosclerosis. Durante el evento isquémico se produce liberación de citoninas y ERO, pero es durante la reperfusión post-isquemia donde se encuentran aún más incrementadas, asociando, generalmente, una reducción de la producción de NO

endógeno, resultante de la disfunción endotelial y del daño tisular relacionado con la infiltración de neutrófilos. Estudios experimentales en modelos animales, han demostrado que la quercetina reduce la disfunción contráctil del corazón, el tamaño de la zona infartada y los cambios en el patrón de expresión de proteínas como iNOS y nox-2, inducidas por la isquemia cardiaca (*Annapurna et al., 2009; Brookes et al., 2002; Punithavathi et al., 2009; Wan et al., 2009*). La mayoría de los trabajos asocian el efecto protector sobre el corazón a los efectos antioxidantes de la quercetina, siendo esta capacidad para proteger al NO por parte de los flavonoides, crucial en la prevención del daño isquémico.

3.6. Biodisponibilidad de los flavonoides.

La biodisponibilidad, desde el punto de vista nutricional, se define como la cantidad de un nutriente que se absorbe y metaboliza en una forma biológicamente activa, disponible para el organismo (*Jackson et al., 1997*). En el caso de los polifenoles, el concepto de biodisponibilidad cobra gran importancia, dado que no siempre los polifenoles más abundantes son los más activos en el organismo, ya sea por una menor actividad intrínseca, por una absorción baja a nivel de intestino, o por ser altamente metabolizados o excretados, siendo por tanto esencial, la realización de estudios de biodisponibilidad in vivo en el organismo humano (*Quiñones et al., 2012*).

A pesar que en las últimas décadas se ha producido un gran avance sobre el conocimiento de la farmacocinética de los flavonoides, hoy en día, no sabemos con certeza los procesos que sufren desde que se administran hasta que alcanzan el lugar de acción así como las consecuencias en su actividad biológica, siendo objeto todavía de discusión científica.

Los primeros estudios en seres humanos, sobre la farmacocinética de los flavonoides (*Gugler et al., 1975*), encontraron que la absorción oral de la quercetina era mínima, y tampoco consiguieron detectar concentraciones cuantificables en plasma u orina con las técnicas analíticas disponibles en aquel momento, concluyendo por tanto, que la administración de flavonoides carecía de interés biológico. Estudios posteriores, confirmaron que la absorción era solo parcial y que las concentraciones de quercetina como aglicona eran indetectables en el plasma (*Day et al., 2001*). Paradójicamente, a pesar de estos resultados, un gran número de estudios en humanos y animales demostraban que la administración oral de quercetina ejercía efectos biológicos sistémicos claros (*Pérez- Vizcaíno et al., 2010; Williamson et al., 2005*).

La mayoría de los estudios *in vitro*, realizados para evaluar la actividad biológica de los flavonoides, se han llevado a cabo empleando agliconas o formas glicosiladas de los compuestos, tal y como se encuentran en los alimentos. Sin embargo, este tipo de derivados, como ya se ha comentado anteriormente, raramente se encuentran como tales en concentraciones biológicamente significativas en sus sitios de acción. No fue hasta la década pasada cuando se evidencia que, aunque la quercetina estaba ausente en el plasma como una aglicona, si se encontraba presente en cantidades considerables en tejidos, junto con cantidades variables de metabolitos conjugados con ácido glucurónico o sulfato (*O'Leary et al., 2001*). En contraste con las agliconas (*Pérez- Vizcaíno et al., 2002*), los metabolitos glucuronizados y sulfatados carecen de efecto vasodilatador agudo directo en arterias aisladas y tienen sólo un efecto parcial en la prevención de la disfunción endotelial aguda (*Lodi et al., 2009*). Por lo tanto, la sugerencia de que los metabolitos conjugados son las formas activas responsables de los efectos biológicos *in vivo* sigue sin estar totalmente demostrada en la actualidad. De ahí que existan discrepancias entre los efectos descritos para los flavonoides *in vitro* y su papel *in vivo*.

Los experimentos en sistemas *in vitro* y con cultivos celulares deben tener en cuenta la absorción y biodisponibilidad de los distintos flavonoides para su adecuada realización e interpretación (Kroon *et al.*, 2004). Pero sólo ha sido en los últimos años, cuando se ha empezado a comprender estos procesos en el organismo humano (Manach *et al.*, 2005; Williamson *et al.*, 2005). Es muy posible que, al menos en parte, estas diferencias tan marcadas sean debidas a la metodología analítica empleada para la detección de la quercetina y sus metabolitos en plasma, ya que requiere de técnicas analíticas específicas, como la cromatografía líquida (HPLC-MS). Otro factor a tener en cuenta son las diferencias en el tiempo elegido para la toma de muestras. Pero en cualquier caso, es evidente que la biodisponibilidad puede variar en función de la fuente de quercetina empleada, así por ejemplo, para una administración equivalente a 100 mg de quercetina se obtienen niveles plasmáticos de 0,3 μM , si se administra en forma de rutina (rhamnoglucósido de quercetina) y de alrededor de 7 μM , si se administra en forma de 4'-glucósido de quercetina o tras consumo de cebolla.

Trabajos recientes indican que incluso la respuesta biológica puede variar de forma pronunciada, dependiendo de la forma de administración de la quercetina. Así, tras la administración de quercetina (10 mg/Kg/día) a ratas SHR mediante una sonda gástrica, presenta un claro efecto antihipertensivo (Jalili *et al.*; 2006). Sin embargo, una dosis muy superior incluida en el pienso de los animales (1,5 g por Kg de pienso, que equivaldría a más de 120 mg/Kg/día) no produjo ningún efecto sobre la presión arterial o la función endotelial (Jalili *et al.*, 2006). Aunque no se realizó un estudio en detalle de biodisponibilidad, los niveles plasmáticos de quercetina y metabolitos conjugados alcanzados con la dieta enriquecida fueron elevados ($\sim 2\mu\text{M}$). En cambio, una dosis aún más alta en la dieta (3 g por Kg de pienso) sí produjo un efecto sobre los niveles de óxido nítrico en ratas normotensas (Benito *et al.*, 2002). Estos datos sugieren que la forma de

administración, en ausencia o asociada a alimentos, es un factor determinante en la biodisponibilidad de la quercetina.

Además, parece muy posible que las distintas posologías afecten de manera marcada a la actividad biológica. Sería esperable que tras la administración de una dosis única mediante sonda gástrica se alcancen niveles altos pero de manera transitoria, mientras que el suplemento de la dieta produzca niveles plasmáticos más sostenidos, pero que paradójicamente pudieran ser inefectivos. Así, el descenso de presión arterial producido por la quercetina se logra de forma paulatina, alcanzándose los valores máximos tras 2-3 semanas de tratamiento y se mantienen al menos durante 48 h después de la última administración (*Fitzpatrick et al., 1993; Duarte et al., 2001b; Duarte et al., 2002*) datos que no concuerdan con los parámetros farmacocinéticos conocidos. Una posible explicación para este hecho es que la quercetina produce cambios en la expresión de los genes implicados en el control del tono vascular, un proceso que tiene lugar de manera lenta y sostenida en el tiempo.

A su vez, la biodisponibilidad de quercetina va a depender de la naturaleza del azúcar adjunto a ella y de los componentes de la matriz de los alimentos. La quercetina aglicona, por su naturaleza lipofílica, debería ser más biodisponible que sus glucósidos, ya que atravesarían las membranas de los enterocitos mediante difusión, mientras que los glucósidos requieren de hidrólisis preliminar o transporte activo para la absorción. Sin embargo, los estudios publicados en humanos muestran que la quercetina en forma de aglicona es menos biodisponible que sus glucósidos (*Hollman et al., 1995*). En estudios posteriores, como el descrito por Wiczowski en 2008, se comparó una dieta rica en agliconas (piel seca de la chalota) con una fuente alimenticia rica en glucósidos (carne de la chalota) presentando, curiosamente, un mayor nivel plasmático en el primer grupo. Por tanto, la matriz del alimento constituiría un factor clave para la respuesta biológica de la quercetina.

Por otro lado, la biodisponibilidad de la quercetina presenta una alta variabilidad interindividual, influenciada por factores endógenos, como la actividad de la β -glucosidasa, determinante para la absorción intestinal de los glucósidos (*Nemeth et al., 2003; Day et al., 2003; Guo et al., 2015*) y las variantes enzimáticas que catalizan las reacciones de fase II intestinal y hepática (*Egert et al., 2008*). Sin embargo, no hay evidencia de que, factores como la edad o el sexo, afecten en dicha biodisponibilidad (*Guo et al., 2015*).

Otro aspecto interesante son las posibles interacciones farmacocinéticas de la quercetina con otros componentes de la dieta. Así, cuando se administran conjuntamente catequina y quercetina, se produce una interacción competitiva a nivel de la absorción, disminuyendo la biodisponibilidad de ambos flavonoides (*Silberberg et al., 2005*). Este tipo de interacción es particularmente frecuente que coexista en una misma ingesta.

Por tanto, hoy en día, aún no se ha aclarado cual es la ingesta óptima de flavonoides, ya sea a partir de suplementos o formando parte de la dieta, para ejercer un efecto beneficioso a nivel cardiovascular, dado que la biodisponibilidad de éstos va a depender de una serie de factores exógenos y endógenos (*Terao, 2017*), como son la forma de administración, la especificidad y actividad de los transportadores y de las enzimas metabólicas, la estabilidad de los flavonoides, su estructura química y de si la molécula esta conjugada o no (*Williamson et al., 2000*).

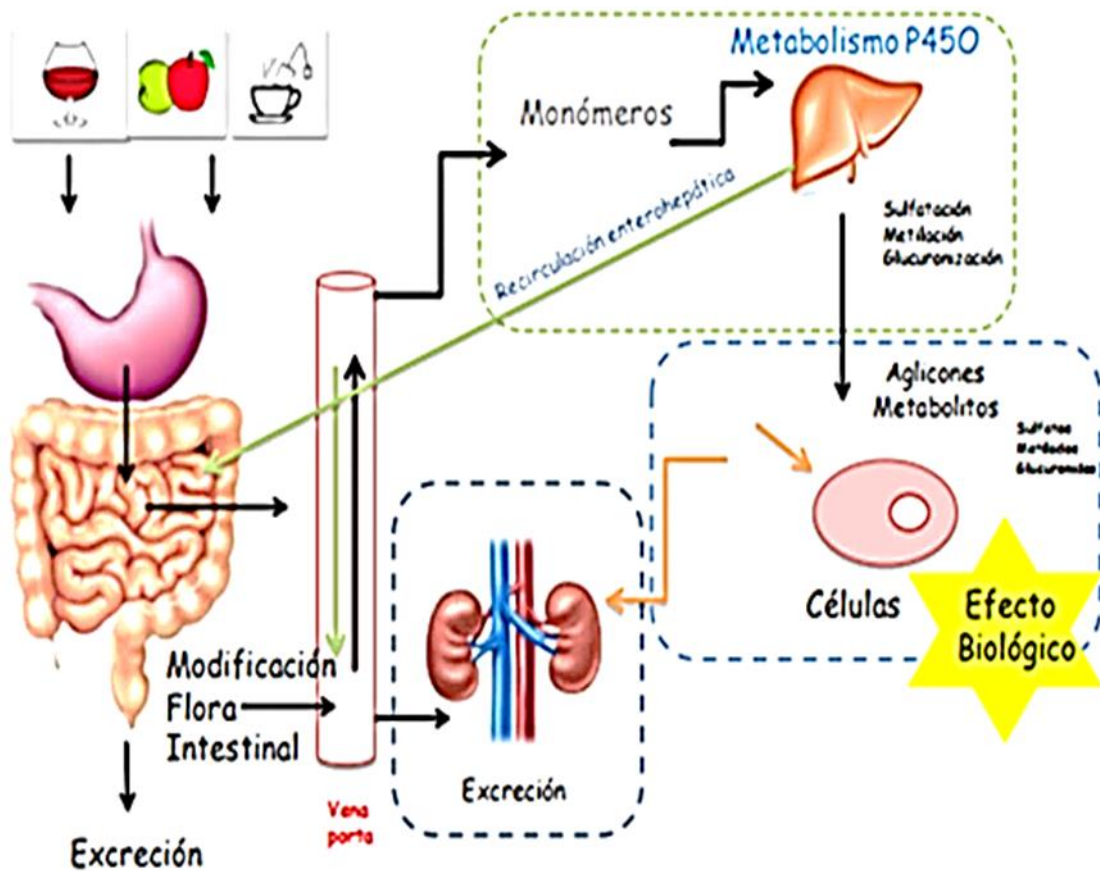


Fig. 11. Farmacocinética general de los flavonoides: absorción, metabolismo y excreción. (Modificado de Heiss et al., 2010).

3.6.1. Absorción.

Los flavonoides son compuestos estables, capaces de resistir las condiciones de procesado y cocinado de los alimentos así como las transformaciones que ocurren en el estómago e intestino delgado durante la digestión. En los alimentos, la quercetina se puede encontrar en forma de aglicona, de glicósido o incluso en ambas formas. La estructura mayoritaria en la que se presenta, es unida a glicósido,

principalmente glucosa o ramnosa, presentando una absorción en torno al 50% del total ingerido (*Hollan et al., 1996*). Los flavonoides glicosilados hacen que la molécula sea más hidrofílica y que tenga mayor peso molecular, presentando menos capacidad de absorción por difusión pasiva, y requieren, por tanto, de transporte activo. Los flavonoides glicosilados deben ser desconjugados en el intestino delgado para ser conjugados posteriormente por enzimas intestinales (*Setchell et al., 2001*). El producto de la reacción de la desglicosilación es una aglicona que difunde a través de las células epiteliales intestinales.

En cuanto a las forma agliconas, la tasa de absorción se encuentra en torno al 25% (*Hollman et al., 1996*), mucho menor que las formas glicosiladas, y se realiza por difusión pasiva en el intestino grueso (*Aherne et al., 2002*).

Durante el proceso de absorción, los flavonoides, sufren por tanto diferentes modificaciones. El primer lugar donde se llevaría a cabo la hidrólisis de las formas glicosiladas a agliconas sería en la boca, por acción de la saliva, gracias a la actividad hidrolítica de las colonias bacterianas y a las células epiteliales de la boca (*Boots et al., 2007*), sin embargo, la hipótesis más aceptada es que tras la ingestión llegan intactos al estómago (*Williamson et al., 2005*), siendo el intestino delgado el primer sitio donde tiene lugar la absorción de los flavonoides glicosilados. Para ello, sufren la desglicosilación por la lactasa floricina hidroxilasa (LPH) (*Day et al., 2000*) localizada en las microvellosidades del intestino delgado, responsable a su vez de la hidrólisis de la lactosa. El resultado de la desglicosilación es una aglicona libre que difunde por las células epiteliales por difusión pasiva o facilitada.

Otro mecanismo de absorción es el mediado por el contranportador intestinal glucosa sodio dependiente (SGTL1) que transporta los flavonoides glicosilados al interior del enterocito (*Olthof et al., 2000*) para su desglicosilación mediante la β - glucosidasa citosólicas (CBG) (*Day et al., 1998; Németh et al., 2003*).

Además, algunos glicósidos de flavonoides, incluyendo derivados de quercetina, podrían ser absorbidos como tales (*Hollman et al., 1996; Graefe et al., 2001*).

Estudios realizados en intestino de rata permitieron demostrar que los diversos productos de desglicosilación tenían vías de absorción diferentes. En el caso de quercetina-4'- glucósido, el 20% absorbido, tenía lugar a través de la vía mediada por SGLT1 y la β - glucosidasa citosólica, mientras que el 80% restante era absorbido a partir de la LPH. Sin embargo, la quercetina- 3'- glucósido era absorbida en su totalidad por la vía de la LPH (*Day et al., 2003*).

Sin embargo, no todos los glicósidos de flavonoides son sustratos potenciales de las β -glucosidasas del intestino delgado ya que, además, existe una amplia variabilidad interindividual en la actividad de estas enzimas, lo que hace que la tasa de absorción en el intestino delgado oscile considerablemente entre individuos. En general, una parte sustancial de los flavonoles presentes en los alimentos y, en general, de la mayoría de los flavonoides no va a ser desglicosilada en el intestino delgado y llega inalterada al colon; asimismo, parte de los compuestos absorbidos son vertidos nuevamente al tracto gastro-intestinal vía circulación enterohepática alcanzando, de este modo, el intestino grueso (*Scalbert et al., 2000; Scalbert et al., 2002*).

Las bacterias de la flora intestinal humana tales como, *Bacteroides distanonsis*, *Bacteroides uniformis* y *Bacteroides ovatus*, poseen diversas actividades enzimáticas desconjugativas (β , D-glucuronidasa, β , D-glucosidasa o α , L-rhamnosidasa) (*Macdonald et al., 1983; Kim et al., 1998*) lo que conduce a la liberación de los aglicones de los flavonoides desde sus glicósidos y glucurónidos (*Aura et al., 2002*). Realmente, se absorbe una baja cantidad de quercetina, ya que los aglicones liberados pueden ser, absorbidos en colon o continuar siendo degradados a productos de menor tamaño, entre los que se han identificado diversos ácidos benzoicos, fenilacéticos y fenilpropiónicos,

(*Aura et al., 2002; Gonthier et al., 2003*) que eventualmente podrían ser también absorbidos y entrando en un ciclo enterohepático que incrementa la vida media de quercetina en la circulación sanguínea.

3.6.2. Metabolismo.

La quercetina absorbida es metabolizada rápidamente mediante metilación y conjugación con glucurónido y sulfato en los enterocitos y adicionalmente en el hígado (*Day et al., 2000*). Las enzimas catalizadoras de las reacciones de fase II son la uridina 5'- difosfato glucuronosil transferasa (UGT), la sulfotransferasa (SULT) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT), localizadas en las células epiteliales del intestino delgado (*Murota et al., 2003*). Estos procesos de metilación, sulfatación y glucuronidación aumentan la hidrofiliidad del compuesto facilitando su excreción por vía urinaria o biliar (*Piskula, 2000*).

Una vez en la circulación sanguínea, la quercetina se une a la albúmina y es transportada hacia los diferentes órganos (intestino delgado, colon, hígado y riñón) y tejidos.

Muchos de los metabolitos conjugados no entran al torrente sanguíneo, sino que vuelven al tracto intestinal debido a la acción de la proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP, multi-drug resistance protein (MRP-2- MPR-3)) (*Walle et al., 2005*).

Los metabolitos conjugados que son transportados al hígado, son metabolizados por reacciones hepato-enzimáticas de fase II. Las reacciones de conjugación descritas en el hígado son: hidrólisis, glucuronidación, metilación y sulfoconjugación (*Crespy et al., 1999; Manach et al., 2005; O'Leary et al., 2003*). Se ha observado que este segundo proceso metabólico produce una gran variedad de metabolitos conjugados a partir de los producidos en el intestino delgado y grueso con o sin previa reconjugación de éstos (*Day et al., 1998; van de Woude et al., 2004*).

El mecanismo por el cual quercetina accede al interior del hepatocito no es bien conocido, si bien, algunos estudios indican que se trata de un sistema de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos situado en la membrana basolateral de los hepatocitos (*Cui et al., 2001; König et al., 2000*). Este sistema permite una acumulación de la quercetina en el interior celular donde alcanza concentraciones diez veces superiores a las del medio extracelular (*Boulton et al., 1999*).

Los principales metabolitos detectados en sangre, después del consumo de alimentos ricos en quercetina como la cebolla, son: quercetina-3-glucurónido, quercetina-3'-sulfato, y metilquercetina-3-glucurónido. En total, se ha llegado a detectar en plasma humano, unos 20 metabolitos distintos, sin embargo, no se halló concentraciones de aglicona (*Day et al., 2001*). Estos metabolitos también se han detectado en la orina humana después de la ingesta de alimentos ricos en flavonoides (*Hong et al., 2005; Mullen et al., 2004*).

El sitio donde se va a llevar a cabo el metabolismo de los flavonoides, va a venir determinado por la dosis empleada de éstos. Por ejemplo, dosis elevadas de quercetina son metabolizadas principalmente en el hígado, mientras que dosis inferiores se metabolizan en la mucosa intestinal, por lo que el hígado juega un papel secundario (*Scalbert et al., 2000*). También es destacable que la concentración plasmática de los polifenoles, cuando se administran en la dieta, es muy inferior a cuando se administran aislados. Estas diferencias implican que, al igual que ocurre con otros fármacos, pueden saturar el metabolismo y, como consecuencia, encontrarse en forma no conjugadas en el plasma (*Scalbert et al., 2000*). Por otra parte, los flavonoides presentes en la dieta no alcanzan concentraciones tan elevadas para saturar el metabolismo y por tanto, las especies circulantes están mayoritariamente en su forma conjugada. La recaptación de los flavonoides presentes en la dieta facilita la conjugación en el intestino delgado. Por el contrario, dosis

farmacológicas saturan las enzimas conjugantes del intestino delgado y pasan en la forma no conjugada a la vena portal hepática (*O'Leary et al., 2004*).

Los metabolitos glucurono- y sulfo-conjugados producidos a nivel hepático se eliminan por la bilis a través de un sistema de transporte dependiente de ATP situado en el dominio apical de las células hepáticas (*Jedlitschky et al., 1997; König et al., 1999; O'Leary et al., 2003*). Estos glucurono- y sulfo-conjugados excretados por vía biliar entran así en un ciclo enterohepático, como se ha observado en estudios realizados en la preparación de hígado de ratas aislado y perfundido (*Middleton et al., 2000*).

En cualquier caso, se ha descrito que la conjugación puede incluso servir para preservar a los flavonoides en los fluidos biológicos. La vida media de una aglicona como quercetina en un medio de cultivo es de 1 a 2 horas sin embargo, en humanos, la quercetina tiene una vida media plasmática relativamente larga, de 11 a 28 h (*Williamson y Manach, 2005*). Aunque se puede concluir que los conjugados tienen propiedades cuantitativamente diferentes y generalmente son menos activos biológicamente, en comparación con los aglicones, sin embargo, al igual que ocurre con otras sustancias (*Monfardini et al., 1998*), la conjugación permite estabilizar la quercetina en la sangre y actuar como medio de liberación a los tejidos (*Williamson, 2004*).

3.6.3. Distribución.

Estudios realizados *in vitro* con plasma sanguíneo humano demostraron que tanto la quercetina como sus metabolitos se unen ampliamente a proteínas plasmáticas (un 99% a concentraciones por encima de 15µM/L) y éstos últimos, principalmente a la albúmina (*Mc Anlins et al., 1999*). Se ha demostrado que la fuerza de la unión

covalente en los metabolitos conjugados es mucho menor que la que une la quercetina aglicona con la albúmina (*Dufour et al., 2005*). Esto permite que los metabolitos conjugados se liberen más fácilmente de la albúmina, adquiriendo la capacidad de unirse a los tejidos.

El efecto de la conjugación es desconocido, pero probablemente dependerá de la posición de la sustitución, y ya se demostró que la parte catecol de la quercetina unida a albúmina permanecía accesible a agentes oxidantes, lo que sugiere que la quercetina podría ejercer sus efectos antioxidantes incluso unida a proteínas plasmáticas (*Dangles et al., 1999*).

Después de una ingesta rica en flavonoides, se ha observado un incremento transitorio de los metabolitos de quercetina en plasma humano llegando a alcanzar valores concentración en el rango micromolar (*Hollman et al., 1995*), disminuyendo gradualmente hasta hacerse prácticamente indetectable en menos de 8 horas (*Manach et al., 1997*).

Las concentraciones plasmáticas obtenidas con quercetina son muy variables dependiendo de los estudios. Las concentraciones medias para quercetina, tras una noche de ayuno, fueron de unos 50-80 nM/L, y los valores fueron incluso más bajos en voluntarios sanos tras una dieta pobre en polifenoles (*Erlund et al., 2002*). Después de 6 semanas de suplementación con rutina 500 mg/d se detectó un ligero aumento de la concentración basal (165 nM / L) (*Boyle et al., 2000*). En otros estudios, la concentración en plasma alcanzó 1,5 µM/L tras 28 días de suplementación con una alta dosis de quercetina (más de 1 g/día) (*Conquer et al., 1998*), 0,63 µM/L tras la suplementación con 80 mg/día de quercetina durante 1 semana (*Moon et al., 2000*), y concentraciones en torno ~ 0.75-1.5 µM /L tras una dosis de 50 mg (*Manach et al., 2005*). En el trabajo comparativo de 97 estudios de biodisponibilidad de polifenoles en humanos (*Manach et al., 2005*), se determinó que la concentración máxima media en plasma para los

glucósidos de quercetina era de $1,46 \pm 0,45 \mu\text{M/L}$. Cabe señalar que hay una gran variación interindividual, ya que unas personas pueden absorber mejor que otras, posiblemente debido a polimorfismos de las enzimas intestinales o los transportadores.

En los últimos años, es objeto de discusión la determinación de la biodisponibilidad de los polifenoles y sus metabolitos en los tejidos, ya que parece ser mucho más importante que el conocimiento de sus concentraciones plasmáticas, pero los datos son muy escasos, incluso en animales.

A través de polifenoles marcados radiactivamente, se ha determinado que después de la administración en una única dosis a ratas o ratones, estos compuestos se encuentran distribuidos por sangre y tejidos del sistema digestivo, como estómago, intestino e hígado de 1 a 6 horas (*Mullen et al., 2002; Ueno et al., 1983*), además de detectarse en otros tejidos, como cerebro, células endoteliales, corazón, riñones, páncreas y huesos (*Youdim et al., 2000; Chang et al., 2000; Kim et al., 2000*). Las concentraciones en estos tejidos fueron de 30 a 3000 ng de aglicona/g de tejido, dependiendo de la dosis administrada y el tejido considerado. Cabe destacar, en cuanto a este tema, que algunos tejidos son capaces de incorporar polifenoles mediante mecanismos específicos, como es el caso del endotelio, uno de los principales lugares de acción de los flavonoides, donde se ha evidenciado un sistema de transporte activo en las células endoteliales aórticas para la entrada de flavonoides (*Schramm et al., 1999*). Sin embargo, *Mullen et al.* en 2008, administraron mediante sonda nasogástrica, quercetina-4'-glucósido marcado con ^{14}C a ratas (4 mg por kg de peso corporal) y observaron muy poca radioactividad en todos los tejidos del organismo salvo en el tracto gastrointestinal. En base a estos hallazgos, los autores concluyeron que la mayor parte del flavonoide ingerido era convertido en ácidos fenólicos antes de la absorción en el organismo, y que su acumulación en los tejidos era, por tanto, cuestionable. Estos

resultados contradictorios indican que el grado de acumulación en los tejidos del organismo es totalmente dependiente de la cantidad y de la vía de administración empleada.

Por tanto, la naturaleza de los metabolitos en los tejidos podría ser distinta de los encontrados en sangre, debido a la entrada o eliminación específica tisular de algunos metabolitos o a un metabolismo intracelular. Aunque hay pocos estudios al respecto (*Maubach et al., 2003; Hong et al., 2002*), estos indican que las concentraciones plasmáticas de flavonoides no están directamente relacionadas con las concentraciones de éstos en los tejidos diana, y que la distribución entre sangre y tejidos también varía dependiendo de los polifenoles tratados.

Una característica de la biodisponibilidad de quercetina que la diferencia de la mayoría de los flavonoides, es que la eliminación de sus metabolitos es muy lenta, con una vida media de entre 11-28 horas (*Graefe et al., 2001, Williamson y Manach, 2005*), lo que favorece su acumulación en plasma y tejidos tras dosis repetidas o un consumo frecuente de frutas y verduras, alargando la duración de sus efectos.

3.6.4. Excreción.

Los polifenoles pueden ser excretados por la vía urinaria, o por la biliar, en el caso de los metabolitos más grandes o extensamente conjugados, dependiendo del tipo de polifenol. La excreción biliar de estos compuestos en humanos no se ha examinado, por lo que los datos que disponemos, son los obtenidos en animales de laboratorio. Para quercetina y sus glucósidos la excreción urinaria es del 0.3-1.4% de la dosis ingerida (*Graefe et al., 2001*), o $2.5 \pm 1.2\%$, según el resultado global de los 97 estudios sobre biodisponibilidad de flavonoides

(*Manach et al., 2005*). Estos bajos valores indican una importante excreción biliar lo que concuerda con su intenso metabolismo.

Los metabolitos tienen semividas de eliminación de aproximadamente 17-25 h (*Hollman, 1997a; Hollman et al., 1998; Hollman et al., 1996*) gracias al establecimiento del ciclo enterohepático (*O'Leary et al., 2003*). La prolongada permanencia en plasma de los metabolitos permite que su consumo repetido tenga un efecto acumulativo sobre las concentraciones plasmáticas (*Hollman, 1997a; Hollman et al., 1998; Hollman et al., 1996*). En voluntarios sanos a los que se administraba un suplemento de flavonoides, mayoritariamente quercetina (2g/día) durante 28 días, las concentraciones plasmáticas de flavonoides se elevaron hasta 1,5 μM (*Conquer et al., 1998*). Estas concentraciones son similares a las concentraciones farmacológicamente activas, capaces de inhibir distintos sistemas enzimáticos.

En general, la excreción renal no es una vía importante para la excreción de los flavonoides intactos (*Choudhury et al., 1999*) y el contenido de la orina de los flavonoides no se puede utilizar como un marcador biológico de la biodisponibilidad o la ingesta alimentaria.

3.6.5. Propiedades de los metabolitos conjugados.

La diversidad de efectos biológicos de los flavonoides ha sido demostrada en numerosos estudios epidemiológicos, sin embargo, la información sobre las propiedades de sus metabolitos conjugados, actualmente es escasa. En los últimos años, ha ido aumentando el interés por el estudio de estos metabolitos y su actividad biológica a raíz de las dudas planteadas, dada la discordancia de resultados entre los efectos descritos para los flavonoides *in vitro* y su papel *in vivo* (*Kay, 2010*).

Los principales metabolitos conjugados de quercetina en plasma humano, como se ha descrito en apartados anteriores, son quercetin-3-glucurónido, quercetin-3'-sulfato, isorhamnetina-3-glucurónido, acompañados por cantidades menores de los 4'-glucurónidos de quercetina e isorhamnetina (*Németh et al., 2003; DuPont et al., 2002; Scalbert et al., 2000; Manach et al., 1993; Day et al., 2001*). La isorhamnetina podría ser importante para explicar algunos de los efectos asociados a la ingestión de quercetina, ya que la misma presenta una semivida más prolongada y una mayor potencia vasodilatadora a nivel de las arterias de resistencia (*Pérez- Vizcaíno et al., 2002*). Sin embargo, las formas libres de quercetina e isorhamnetina apenas son detectadas en plasma, lo que hace suponer que los metabolitos conjugados deben jugar un papel determinante en los posibles efectos beneficiosos.

Se ha comprobado que algunos de los metabolitos también poseen actividad antioxidante, al actuar como captadores de radicales libres y ser capaces de inhibir fuentes enzimáticas como la xantinosidasa (*Duarte et al., 1993; Williamson et al., 1996; Plumb et al., 1997*), siendo determinante el tipo de metabolito conjugado circulante para explicar la actividad biológica.

Se ha descrito que el quercetin-3- glucurónido previene la hipertrofia de las CMLV inducida por la Angiotensina II al inhibir la actividad de la JNK y (*Yoshizumi et al., 2002*) además, también inhibe la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a altas concentraciones (*Moon et al., 2001*). En los últimos años, se han estudiado los efectos a nivel vascular de quercetin-3-glucurónido, quercetin-3'-sulfato, isorhamnetin-3-glucurónido y quercetin-4'-glucurónido, observándose que, al contrario que la quercetina y la isorhamnetina, los metabolitos de la quercetina conjugados con glucurónido o sulfato carecen de efecto vasodilatador directo. Además, estos metabolitos tampoco sufren procesos de auto-oxidación, no

generan radicales libres y no inhiben la actividad biológica de NO. Sin embargo, son capaces de inhibir la actividad de la NAD(P)H oxidasa y captar radicales superóxido. Por ello, en una situación de disfunción endotelial inducida *in vitro* por un inhibidor de la superóxidodismutasa o por activación de la NAD(P)H oxidasa con NADPH, estos metabolitos protegieron la actividad biológica del NO y revirtieron la disfunción endotelial. Estos datos indican que los metabolitos de la quercetina podrían ser los responsables de la actividad protectora de la quercetina sobre la función endotelial y la presión arterial cuando se administra *in vivo*. Por otra parte, es también posible que los metabolitos presentes en plasma no sean representativos de los compuestos a nivel intracelular, ya que las formas libres se acumulan en membranas biológicas y sus concentraciones son muy superiores a nivel intra que extracelular.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

1. Justificación e hipótesis de estudio.

Los flavonoides comprenden un amplio grupo de compuestos polifenólicos presentes en alimentos de origen vegetal, principalmente frutas y verduras, que incluyen varias subclases, tales como: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonoles y chalconas (*Heim et al., 2002*). Entre ellos, la quercetina es el flavonol más abundante de la dieta y ampliamente distribuido en la naturaleza.

Son numerosos los estudios epidemiológicos que han encontrado una asociación inversa entre la ingesta de flavonoides y el riesgo de enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas e incluso, neoplasias (*Huxley et al., 2003, Woo et al., 2013*), lo que explicaría, al menos en parte, los efectos saludables de la fruta y verdura. El efecto beneficioso de los flavonoles sobre las enfermedades cardiovasculares ha sido demostrado tanto en estudios en animales como en ensayos clínicos a corto plazo (*Willianson et al., 2005; Pérez-Vizcaíno et al., 2010*). Uno de los principales mecanismos por lo que los flavonoles pueden reducir el riesgo cardiovascular es a través de su efecto vasodilatador y antihipertensivo (*Duarte et al., 1993; Larson et al., 2012*). Esto podría tener un gran impacto en la mortalidad y la morbilidad global, ya que en 2010 se estimó que la presión arterial elevada era el factor de riesgo más importante, mientras que una dieta baja en frutas estaba dentro de los cuatro primeros factores de riesgo comportamentales para la carga global de la enfermedad (*Lim et al., 2012*). Se ha demostrado que la quercetina reduce la presión arterial tanto en ratas como en humanos hipertensos, sin embargo no modifica las cifras de tensión arterial en sujetos normotensos, efecto que parece ser independiente de la función endotelial o de la actividad de la enzima convertidora de la angiotensina.

La quercetina, además, induce vasodilatación arterial en arterias aisladas de varias especies animales (*Duarte et al., 1993; Ibarra et al., 2002*), pero no tenemos conocimiento que, los efectos sobre el tono arterial humano, hayan sido probados hasta ahora, in vitro o in vivo.

La quercetina puede administrarse por vía oral en sus formas glicosiladas, ya que están regularmente presentes en los alimentos o como una aglicona en suplementos nutricionales (*Ibarra et al., 2002*). Los principales metabolitos de la quercetina en plasma humano son quercetina-3-O-glucurónido (Q3GA), quercetina-3-O-sulfato e isorhamnetina-3-O-glucurónido (3-metil-quercetina-3-O-glucurónido). Se han detectado mínimas concentraciones de aglicona libre en plasma o en orina (*Day et al., 2001*). Sin embargo, el tiempo transcurrido para detectar los efectos biológicos de la quercetina, no se correlaciona con la presencia en plasma de estos metabolitos. De hecho, estos metabolitos son normalmente menos activos que la aglicona e incluso, a menudo, son totalmente inactivos cuando son analizados in vitro durante periodos cortos de tiempo (*Lodi et al., 2009*). Sin embargo, los metabolitos glucurono-conjugados de quercetina pueden ser hidrolizados por la β -glucuronidasa en varios tejidos, liberando la aglicona que se acumula intracelularmente (*O'Leary et al., 2001; Terao et al., 2011*). Por lo tanto, en periodos de tiempo más largos de 1-2 h, Q3GA induce vasodilatación in vitro (*Menéndez et al., 2011*) y reduce la presión arterial in vivo (*Galindo et al., 2012*) y ambos efectos pueden prevenirse mediante la inhibición de la β -glucuronidasa. De este modo, la conjugación es un proceso reversible y, al menos en lo que respecta a los efectos vasodilatadores y antihipertensivos en animales de laboratorio, el ciclo de conjugación-desconjugación parece ser un requisito absoluto (*Pérez Vizcaíno et al., 2014*).

Por todo lo expuesto, planteamos como hipótesis general de esta Tesis Doctoral, si la administración de quercetina oral induce vasodilatación en arterias humanas, como se ha demostrado en

animales de experimentación, y si dichos efectos podrían estar relacionados con la desconjugación de Q3GA.

2. Objetivos:

2.1. Objetivo general:

- Determinar si la administración aguda de quercetina induce un efecto vasodilatador en arterias humanas tanto in vitro como in vivo.

2.2. Objetivos específicos:

- Determinar si los efectos obtenidos tras la administración oral de quercetina son dosis-dependientes y si se correlacionan en el tiempo con la presencia de los metabolitos en plasma.
- Analizar si dichos efectos podrían estar relacionados con la desconjugación de los metabolitos y la actividad de la β -glucuronidasa.
- Analizar el efecto sobre la presión arterial tras la administración de quercetina oral.

MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Estudio de la función endotelial in vivo.

1.1 Selección de los sujetos:

En el estudio participaron diecisiete voluntarios, incluidos hombres y mujeres, con edades comprendidas entre los 18 y 41 años. Antes de iniciar el estudio, todos los participantes firmaron el consentimiento informado por escrito y se les dio las instrucciones pertinentes para una correcta toma de las muestras.

Se recogieron las características socio-demográficas, se les realizó una historia clínica completa, para descartar patología crónica o cardiovascular evidente, y se les interrogó sobre el tipo de dieta que realizaban, además de realizarle una exploración física general donde se les tomó la presión arterial, frecuencia cardiaca, así como el peso y la talla.

a) Criterios de inclusión:

- Sujetos sanos con edad mayor de 18 años.

b) Criterios de exclusión:

- Fumadores.
- Ingesta de alcohol > 20g/d.
- Ingesta de suplementos vitamínicos y/o antioxidantes.
- Diabetes mellitus.
- Hipertensión arterial.
- Dislipemia.
- Enfermedad hepática.
- Enfermedad inflamatoria gastrointestinal.
- Enfermedad cardiovascular (cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular o vasculopatía periférica).

- Enfermedad renal crónica.
- Neoplasia.
- Intervención quirúrgica reciente.
- Hiperhomocisteinemia.
- Embarazo.

A todos los sujetos se les recomendó que no tomaran alimentos ricos en flavonoides, de una lista proporcionada en la que se incluía el té, el vino, los zumos de fruta, el cacao y el alcohol, 48 horas antes de cada intervención. Tampoco debían realizar ejercicio físico intenso unas 24 horas antes.

1.2. Tipo de estudio:

Se realiza un ensayo clínico de asignación aleatoria, cruzado, doble ciego controlado con placebo. La elección de un diseño cruzado nos permite aumentar la sensibilidad del experimento ya que cada sujeto es control de sí mismo, la comparación intrasujeto es más sensible que la comparación intersujeto, y es necesario un número menor de pacientes para alcanzar el poder estadístico requerido.

1.3. Descripción del tratamiento.

El tratamiento suministrado, quercetina o placebo, fue elaborado en el servicio de Farmacia del Hospital Virgen de las Nieves de Granada.

- ❖ *Quercetina aglicona*: Se administraron cápsulas de 200 mg y 400 mg.
- ❖ *Placebo*: cápsula con almidón de arroz envasada de igual forma que la quercetina, indistinguibles por su aspecto externo.

La razón de elegir las dosis de 200 y 400 mg viene motivada por constituir una cantidad elevada de flavonoides, similar a la ingesta de alimentos ricos en estos polifenoles sin embargo, estas dosis son inferiores a la mayoría de los suplementos alimenticios, ya que generalmente son de 1g/día.

Todas las cápsulas se suministraron por vía oral con, al menos, medio vaso de agua, y tragadas enteras, sin abrir ni masticar.

1.4. Diseño del estudio:

Durante la primera visita, una vez entrevistados y realizada la exploración física, se procedió a la toma de muestras de sangre y orina como control basal. Posteriormente, cada sujeto recibió 300 ml de agua y una cápsula, en toma única, de quercetina de 200 mg, quercetina de 400 mg o placebo, que debía ser tragada entera. Los sujetos recibieron cada uno de los tres tratamientos de forma aleatoria, separada cada visita con intervalo de una semana, siempre el mismo día de la semana y a la misma hora del día (entre las 8 y las 10 horas de la mañana). A las 2 horas del tratamiento, se les volvió a repetir la extracción sanguínea y pasadas 5 horas del mismo, se les tomó una nueva muestra de orina. Elegimos tomar la muestra de plasma a las dos horas post-tratamiento en base a los resultados obtenidos en diferentes estudios realizados en voluntarios sanos, donde se observaron concentraciones plasmáticas máximas, entre 60-360 min, tras la ingesta de quercetina aglicona (Erlund et al., 2000; Egert et al., 2008; Larson et al., 2012).

Ninguno de los sujetos presentó efectos adversos después de la administración de quercetina o placebo.

1.5. Variables:

Se recogieron variables clínicas y de laboratorio con determinaciones bioquímicas y hematológicas.

1.5.1. Variables clínicas:

Las variables clínicas recogidas fueron:

- Edad (años)
- Sexo (hombre/ mujer)
- Talla (m)
- Peso (Kg)
- Frecuencia cardiaca (latidos por minuto)
- Índice de masa corporal (IMC), calculado con la fórmula:
$$IMC = \frac{Peso(kg)}{Altura(m^2)}$$
- Tensión arterial sistólica (mmHg)
- Tensión arterial diastólica (mmHg)

1.5.2. Variables bioquímicas:

Recogidas en el momento basal, previa a la administración de quercetina o placebo, con los siguientes rangos de laboratorio.

- Ácido úrico (2.3-6.1 mg/dL)
- Creatinina (0.51-0.95 mg/dL)
- Urea (17-43 mg/dL)
- Colesterol total (140-200 mg/dL)

- Colesterol HDL (40-60 mg/ dL)
- Colesterol LDL (10-130 mg/ dL)
- Triglicéridos (89-150 mg / dL)
- Bilirrubina total (0.3-1.2 mg/dL)
- Aspartato transaminasa (GOT) (10-35 U/L)
- Alanina transaminasa (GPT) (7-34 U/ L)
- Gamma glutamiltransferasa (GGT) (1-38 U/ L)
- Fosfatasa alcalina (30-120 U/ L)
- Sodio (136-146 mEq/L)
- Potasio (3.5-5.1 mEq/L)
- Magnesio (2.3-4.5 mg/dL)
- Calcio (8.8-10.6 mg/dL)
- Fósforo (2.3-4.5 mg/dL)
- Creatina quinasa (CPK) (0-145 U/L)
- Lactato deshidrogenasa (LDH) (0-247 U/L)
- Homocisteína (4.4-10.8 μ mol/L)
- Cistatina C (0.5-1.1 mg/dL)
- Filtrado glomerular calculado estimado por fórmula MDRD-4.

Resultado en ml/ min/ 1.73 m² (KDIGO 2012)

- > 60 Cálculo inexacto, compatible con normalidad, grado 1 o 2 si persiste más de 3 meses
- 45-59 Indicativo de ERC ligera a moderada (G3a)
- 30-44 Indicativo de ERC moderada a grave (G3b)
- 15-29 Indicativo de ERC grave (G4)
- < 15 Indicativo de ERC con fallo renal (G5)

1.5.3. Variables hematológicas:

Recogidas en el momento basal, previa a la administración de quercetina o placebo, con los siguientes rangos de laboratorio.

- Hematíes ($3.9-5.2 \times 10^6 / \mu\text{L}$)
- Hemoglobina (12-15.6 g/ dL)
- Hematocrito (35.-45.5%)
- Leucocitos ($3.9-10.2 \times 10^3 / \mu\text{L}$)
- Neutrófilos (42-77%)
- Linfocitos (20-44%)
- Plaquetas ($130-370 \times 10^3 / \mu\text{L}$)

1.6. Medición del diámetro y flujo de la arteria braquial.

A todos los sujetos se le realizó medición del diámetro y flujo de la arteria braquial. Ambas mediciones fueron registradas en el momento basal, a las dos horas y cinco horas post-tratamiento.

Antes de proceder a la medición del flujo arterial, los participantes permanecieron en reposo en la camilla de exploración en posición supina, durante unos 10- 15 minutos, con el brazo derecho en supinación, extendido y abducido unos 60° , donde se fija. Posteriormente, se coloca un manguito de presión arterial de 15 cm en dicho brazo, proximal a la flexura, pero distal a la colocación de la sonda del ultrasonido en la arteria braquial, situada justo por encima del pliegue del codo, en una sección longitudinal con marcaje cutáneo y siguiendo referencias anatómicas para garantizar la misma sección en las posteriores mediciones. Se procede a la captura de una imagen en reposo, una vez obtenida la imagen más clara de las capas intimaes

anterior y posterior, que se almacena en el equipo. A continuación, se aplica la isquemia, tras hinchado del manguito a una presión suprasistólica durante cinco minutos. Pasado un minuto tras la liberación de la isquemia, se obtendrá la captura de la segunda imagen. Todas las mediciones se realizaron por el mismo observador, entrenado previamente para ello, con objeto de evitar la variabilidad inter-observador. La visualización de las imágenes ecográficas se realizó en modo B y el diámetro arterial se analizó de forma diferida tras medición automática de los bordes (Sonosite, Titan, transductor lineal de 7,0 MHz). El flujo sanguíneo de la arteria braquial se calculó utilizando la fórmula del flujo sanguíneo = Velocidad media π (diámetro arterial / 2)² × 60 (software Logic7).

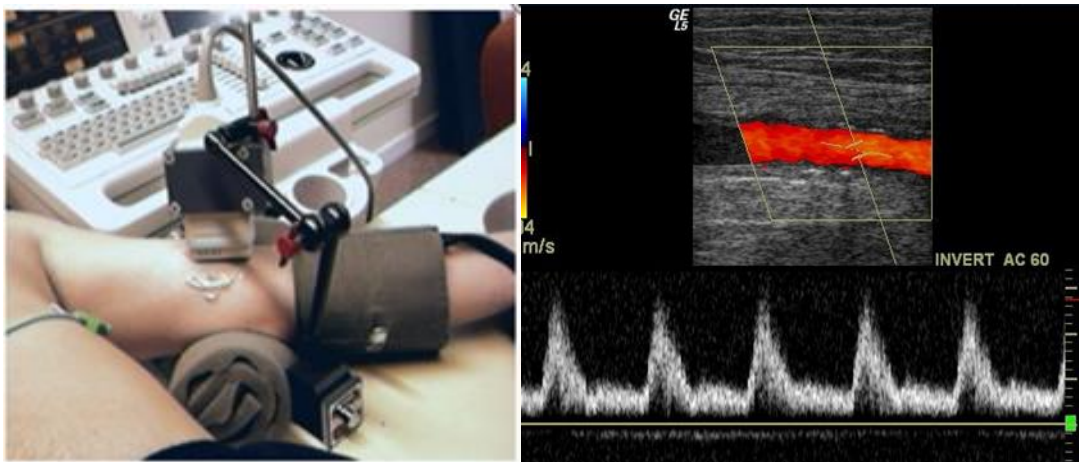
**A****B**

Fig. 12. A. Disposición requerida para la medición de flujo braquial. **B.** Imagen ecográfica de la arteria humeral utilizada para medir la velocidad del flujo.

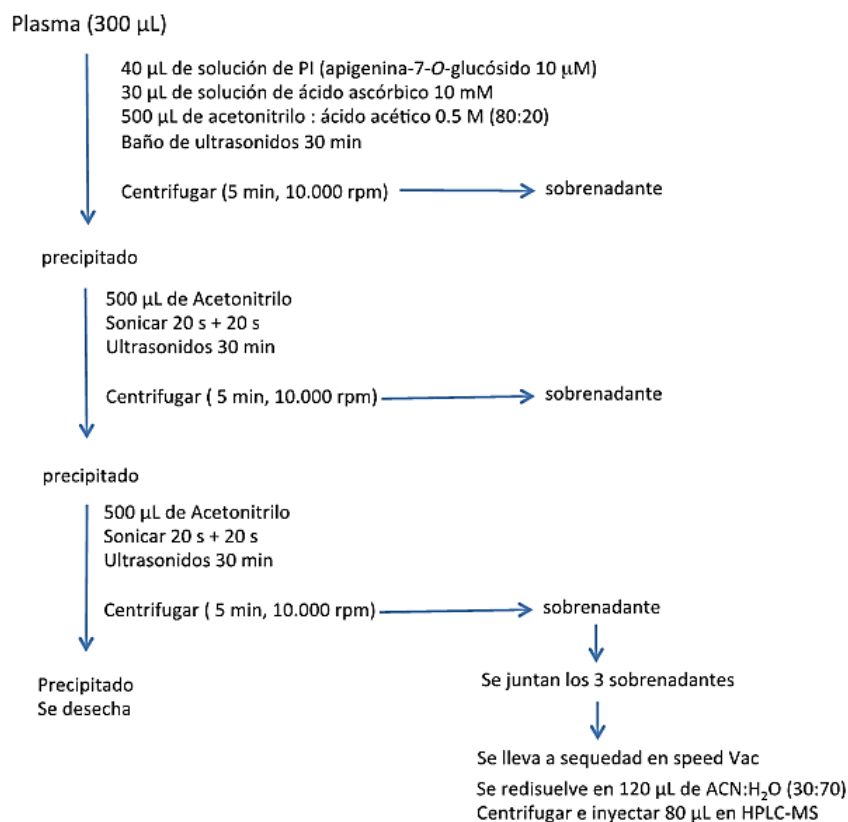
1.7. Medición de la presión arterial.

Para la toma de la presión arterial se siguieron las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud. Para ello, el participante debía estar cómodamente sentado en una silla con respaldo que sostenga la espalda, con los pies firmes sobre el suelo, sin cruzarlos y colocando el brazo sobre una mesa, en un ambiente relajado y cálido. Se realizaron tres mediciones repetidas de presión arterial con un esfigmomanómetro automático (Omron, España), dejando 1-2 minutos entre medida y medida, tomada en el brazo izquierdo con la palma de la mano hacia arriba, 1-2 cm por encima del flexura del codo, de forma que el centro del brazalete quedara a nivel del corazón. Este proceso se repitió tanto en el momento basal, a las dos horas como a las cinco horas post-tratamiento.

1.8. Análisis plasmático de quercetina y metabolitos.

Las muestras plasmáticas (300 μ L) extraídas fueron suplementadas con ácido ascórbico (30 μ L de una solución acuosa 10 mM) y apigenina 7-O-glucósido (40 μ L de solución 10 μ M al 50 % de acetonitrilo en agua) como patrón interno, y analizadas como se describe (Galindo et al., 2012). De forma breve, las muestras fueron tratadas con acetonitrilo/ácido acético 0,5 M (80:20, v/v) durante 30 minutos a 26°C en un baño de ultrasonidos y luego centrifugadas durante 3 minutos a 3500g. Se recogió el sobrenadante y el precipitado fue sometido a un proceso similar de extracción con acetonitrilo otras dos veces después de sonicación (20 segundos + 20 segundos) usando un disruptor celular ultrasónico Microson™ (New York, Estados Unidos), mantenido en un baño de hielo. Los tres sobrenadantes se combinaron y se secaron posteriormente en un concentrador centrífugo micVac (GeneVac, Ipswich, Reino Unido). El residuo se disolvió en 120

μL de acetonitrilo/agua (30:70, v/v) y se centrifugó (5 minutos, 3500g) antes de ser inyectado (80 μL) en el cromatógrafo.



1.8.1. Análisis por HPLC-DAD-ESI/MS.

Se utilizó un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con una bomba cuaternaria y un detector de matriz de diodo (DAD) acoplado a una estación de procesamiento de datos, HP Chem Station (rev.A.05.04). Se utilizó una columna Ascentis™ RP-Amida de 3 μm (2,1 x 150 mm) termostatada a 30°C. Los disolventes utilizados fueron: (A) ácido fórmico al 0,1%, y (B) acetonitrilo. Se estableció un gradiente de elución de 15% a 50% de B durante 15 min, 50% de B isocrático durante 10 min, de 50% a 75% de B durante 3 min, 75% de B isocrático durante 10 min, y re-equilibrado de la columna, a un caudal constante de 0,2 ml/min. La doble

detección online se llevó a cabo en el DAD utilizando 370 nm como longitud de onda prefijada y un espectrómetro de masas (MS) conectado al sistema HPLC a través de la célula de salida del DAD. La detección de MS se realizó en un API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) equipado con una fuente ESI y analizador de masas de trampa de ión de triple cuadrupolo que fue controlado por el software Analyst 5.1. El aire a cero grados sirvió como gas del nebulizador (30 psi) y el gas turbo para secado del solvente (400 °C, 40 psi). El nitrógeno sirvió como cortina (20 psi) y gas de colisión (medio). Los cuadrupolos se ajustaron como unidad de resolución. El voltaje de pulverización iónica se ajustó a -4500 V en el modo negativo. El análisis del ión precursor se empleó para detectar todos los iones precursores que se fragmentan de un producto común iónico (p.e., m/z 301 corresponde a quercetina). Los ajustes de método utilizados fueron: potencial de descomposición (DP) -40 V, potencial de entrada (EP) -10 V, energía de colisión (CE) -50 V y potencial de salida de la célula -3 V. Con el fin de obtener el patrón de fragmentación del ión o iones primarios, también se realizó el modo de ion de producto mejorado utilizando los siguientes parámetros: DP -50 V, EP-6 V, CE -25 V y dispersión de energía de colisión 0 V. La determinación cuantitativa de la quercetina y de los metabolitos conjugados se realizó a partir de sus picos cromatográficos a 370 nm en comparación con las curvas de calibración de los compuestos estándar ya sean comerciales (quercetina e isorhamnetina) u obtenidos en el laboratorio (metabolitos conjugados) (Dueñas et al., 2012) (Fig 13). El análisis con espectrómetro de masas se utilizó para confirmar la identidad de los metabolitos de quercetina detectados (Fig 14).

Espectros Uv-vis

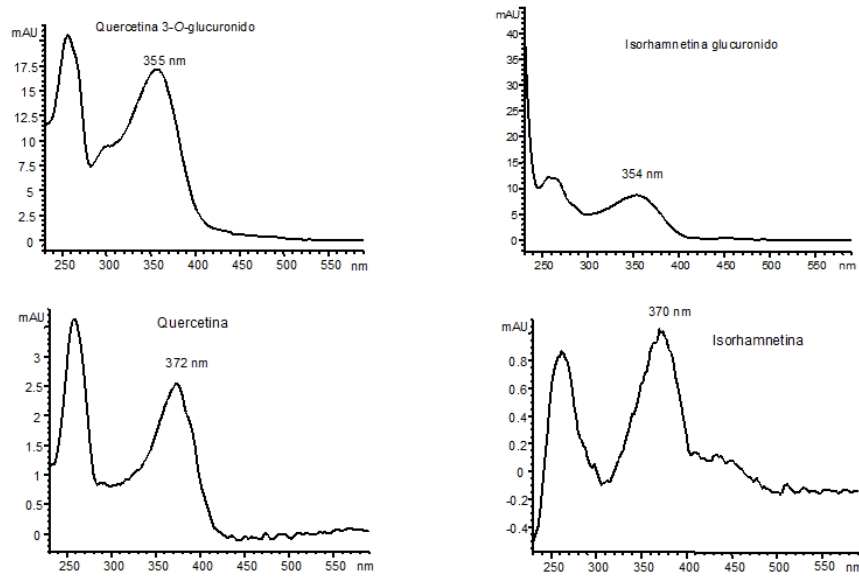
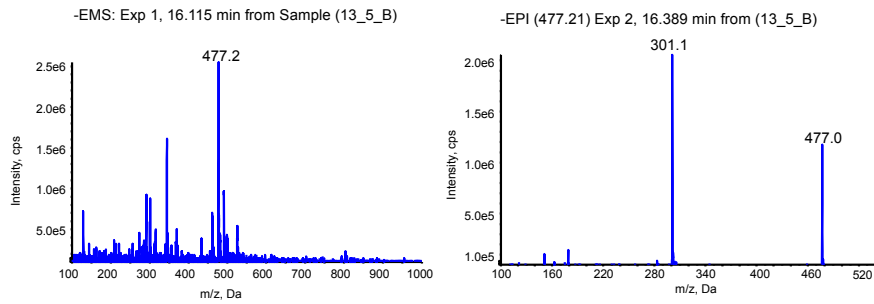


Fig. 13. Espectro ultravioleta (UV) visible de quercetina y sus metabolitos plasmáticos.

Espectros de masas

Muestra 13-5, pico min 16.1 (quercetina 3-glucurónico)



Muestra 13-5, pico min 16.4 (Isorhamnetina glucurónico)

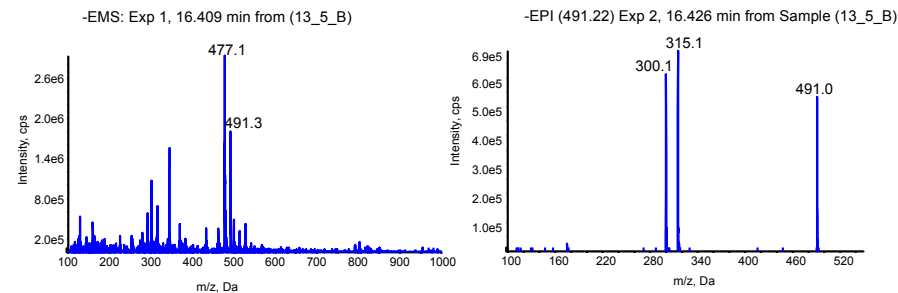


Fig. 14. Espectro de masas de quercetina 3- glucurónico y de isorhamnetina glucurónico.

1.9. Determinación de la actividad de la β -glucuronidasa.

La actividad de la β -glucuronidasa se midió por análisis colorimétrico utilizando fenolftaleína mono- β -glucurónido como sustrato (Maruti et al., 2008) Para ello, se incubó el plasma (50 μ l) con fenolftaleína-ácido glucurónido 1 mM en fosfato sódico 0,1 mM como tampón, en un pH 4,5, durante 4 h a 37°C. A las 4 h, la reacción se detiene para añadir fosfato de sodio 0,1 M como tampón a un pH 11. Se utilizó un espectrofotómetro (modelo 680XR, BIORAD, USA) para monitorizar la intensidad del color amarillo resultante, que es proporcional a la actividad β - glucuronidasa. La actividad enzimática se obtuvo de la curva estándar y se expresó como μ g de fenolftaleína liberada/mL de suero/h a 37°C.

1.10. Mediciones de glutatión, nitritos y nitratos e isoprostanos.

La determinación total de 8-iso-prostaglandina (iso-PG) F₂ α fue analizada en 50 μ l de orina, mediante un kit de inmunoensayo enzimático competitivo, según las instrucciones del fabricante (Cayman Chemical) y los resultados se expresaron como pg /mg de creatinina.

La cuantificación de nitritos se realizó utilizando el método descrito por Granger et al., en 1996. Este método requiere que los nitratos presentes en la muestra, en nuestro caso, orina, sean reducidos a nitritos, utilizando la enzima nitrato reductasa, para su posterior determinación espectrofotométrica mediante la reacción de Griess. Los resultados se expresaron como μ mol/mg de creatinina.

La determinación de glutatión plasmático total (GSH) se analizó con el kit de ensayo GSH de Cayman, usando la glutatión reductasa

(Cayman Chemical, AnnArbor, MI) y los resultados se expresaron en μM .

2. Contractilidad vascular in vitro.

Para completar nuestro estudio, analizamos los efectos de quercetina aglicona in vitro, utilizando para ello vasos del cordón umbilical humano, ya que éstos carecen de inervación autónoma (Fox et al., 1990).

Los cordones umbilicales se obtuvieron de gestaciones normales a término, después del parto vaginal, previo consentimiento informado de las madres donantes, y fueron sumergidos inmediatamente en una solución fría de Krebs. Todos los procedimientos que se realizaron utilizando los cordones umbilicales fueron aprobados por el Comité de Ética Del Hospital Clínico de Granada. A continuación, se diseccionaron las arterias umbilicales del cordón, diferenciando las arterias de las venas mediante la inyección de un colorante inerte a nivel de las arterias umbilicales, lo cual nos permitió una más fácil disección de los vasos. Se cortaron en anillos (2-3 mm) que se sumergieron en un baño de órganos que contenía una solución de Krebs la cual fue continuamente aireada con carbógeno (95% de O_2 , 5% de CO_2) a 37°C para el registro de tensión isométrica. A continuación, los tejidos fueron alargados hasta una tensión de reposo de 2 g , por ser estas tensiones las óptimas para investigar la máxima respuesta contráctil a 40mM de KCl, basadas en experimentos preliminares (Shukla et al., 2014). Una vez equilibrados, los anillos se estimularon con U46619 0.1 μM , análogo sintético del tromboxano A₂, en ausencia o en presencia de éster metílico de la N -nitro-L-arginina (L-NAME, 100 μM) añadido 30 minutos antes de la adición de U46619, hasta que alcanzaron una respuesta contráctil en estado estacionario y los flavonoides o el vehículo (dimetilsulfóxido) fueron añadidos a la cámara de manera acumulativa. En algunos anillos, el endotelio se eliminó frotando

suavemente la superficie íntimal con una pinza fina. La eliminación del endotelio se confirmó en cada preparación por la ausencia de relajación tras la infusión de acetilcolina (10^{-6} M), vasodilatador dependiente de endotelio.

3. Análisis estadístico.

Se ha realizado un análisis descriptivo de las principales variables estudiadas. Para las variables cuantitativas se calculó la media, desviación típica, mínimo y máximo. Las variables cualitativas se expresaron mediante frecuencias absolutas y relativas.

El objetivo principal del estudio fue determinar el aumento en el diámetro arterial asociado a la ingesta de la quercetina aglicona. El tamaño de la muestra se calculó con una prueba de una cola usando los siguientes parámetros: significación estadística (α) de 0,05, un poder estadístico ($1 - \beta$) de 0,8, una diferencia clínicamente importante del diámetro arterial de un 20%, una desviación estándar de 20% y una tasa de abandono del 20%.

Para contrastar que el conjunto de los datos se ajustaba a la normalidad se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. Dado que no se podía suponer que la mayoría de conjuntos de datos seguían una distribución normal, las diferencias entre grupos se evaluaron mediante una prueba de Wilcoxon o para comparaciones múltiples mediante una prueba de Friedman seguida, en caso de significación, por un test de Dunn para comparaciones por parejas. Los experimentos realizados *in vitro* en las arterias aisladas se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM) y la potencia de los flavonoides, es decir, la concentración que produce un 50% de vasodilatación o IC50, se calculó a partir de la curva de concentración-respuesta mediante un análisis de regresión no lineal.

4. Aprobación por el Comité de Ética.

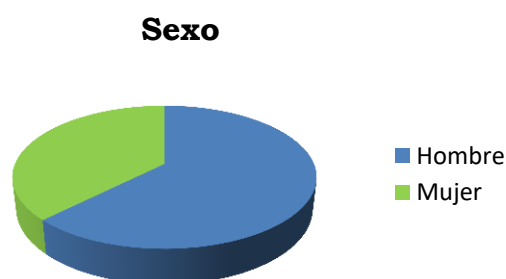
Este estudio se llevó a cabo de acuerdo a las directrices establecidas en la Declaración de Helsinki y todos los procedimientos que se realizaron a los participantes fueron aprobados por el Comité de Ética Humana del Hospital Virgen de las Nieves en Granada. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los sujetos.

RESULTADOS.

1. Resultados del estudio in vivo.

1.1. Descripción de la muestra.

En el estudio participaron diecisiete voluntarios sanos, de los cuales, 10 son hombres (62.5%) y 6 mujeres (37.5%), con una edad media 25.8 ± 5.2 años (rango 20-41). Uno de los participantes tuvo que ser excluido, por recibir sólo una dosis de tratamiento y no finalizar el estudio y otro, sólo recibió placebo y 200 mg de quercetina.

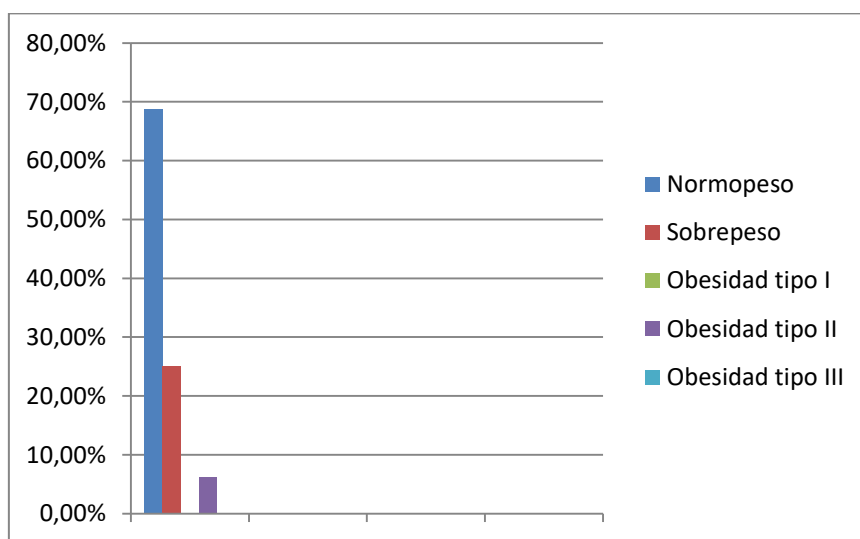


Graf. 1. Distribución de la muestra según el sexo.

A todos los sujetos se les tomó la talla (talla media: 1.75 ± 0.11 m) y el peso (peso medio: 74.61 ± 19.28 Kg) con objeto de calcular el índice de masa corporal (IMC), siendo el IMC medio de 24 ± 4.7 Kg/ m². Atendiendo a la clasificación del IMC, 11 voluntarios (68.75%) se encontraban en normopeso (IMC 18.5-24.9 kg/ m²), 4 de ellos (25%) presentaban sobrepeso (IMC 25-29.9 kg/ m²) y un participante (6.25 %) tenía obesidad grado II (35-39.9 kg/ m²).

Clasificación	IMC (Kg/m ²)	Riesgo
Normal	18.5 - 24.9	Promedio
Sobrepeso	25 - 29.9	Aumentado
Obesidad grado I	30 - 34.9	Moderado
Obesidad grado II	35 - 39.9	Severo
Obesidad grado III	Más de 40	Muy Severo

Tabla 2. Clasificación del Índice de Masa Corporal según la OMS



Graf. 2. Clasificación de la muestra según el IMC.

1.2. Características basales, clínicas y analíticas:

En la siguiente tabla (Tabla 2) se recogen los datos clínicos y analíticos (bioquímica y hemograma) en situación basal, descartándose así enfermedad a nivel hepático, cardiovascular o renal, que excluirían la participación en el estudio.

	Media \pm SD
Presión arterial sistólica, mmHg	117.1 \pm 3.6
Presión arterial diastólica, mmHg	69.3 \pm 2.9
Colesterol total, mg/ dL	169.1 \pm 30.6
Colesterol LDL, mg/ dL	92.8 \pm 7.0
Colesterol HDL, mg/ dL	57.1 \pm 2.3
Triglicéridos, mg/ dL	93.1 \pm 44.8
Glucosa, mg/ dL	84.2 \pm 5.8
Creatinina, mg/ dL	0.87 \pm 0.20
Urea, mg/ dL	29.43 \pm 8.44

Acido úrico, mg/ dL	4.9±1.09
Bilirrubina total, mg/ dL	0.57±0.21
GOT, mg/ dL	22.93±8.48
GPT, mg/ dL	22.06±12.35
GGT, mg/ dL	16.68±5.7
Fosfatasa alcalina, mg/ dL	64.68±18.71
CPK	177.56±91.48
LDH	176.43±45.03
Calcio, mg/ dL	9.5±0.47
Fósforo, mg/dL	3.8±0.66
Sodio, mg/ dL	141.43±2.70
Potasio, mg/ dL	4.2±0.4
Magnesio, mg/ dL	1.9±0.12
PCR	0.29±0.47
Homocisteina	14.06±8.07

Cistatina C	0.65±0.09
Filtrado Glomerular estimado por MDRD	103.97±5.2
Hematíes, x 10⁶/ μL	5040000±493720.57
Hemoglobina, g/ dL	15.21±1.37
Hematocrito, %	44.45±3.63
Leucocitos, x 10³/μL	6768.75±1798.78
Neutrófilos, %	51.02±7.38
Linfocitos,%	36.5±7.84
Plaquetas, x 10³/μL	222875±43552.07

Tabla 3. Datos clínicos y analíticos en situación basal.

1.3. Perfil de metabolitos plasmáticos tras dosis oral única de quercetina.

Al inicio del estudio, la dosis de quercetina o sus metabolitos fueron indetectables en plasma en la mayoría de los participantes (Fig. 15).

A las 2 h después de la ingestión de 200 y 400 mg de quercetina, hubo un aumento en plasma dosis dependiente de Q3GA, que fue el metabolito principal [0,35 μ M (IC 95% 0,22-0,48) y 0,95 μ M (0,57-1,71), respectivamente.

Hubo un aumento más bajo en quercetina aglicona [0,043 μ M (0,026-0,060) y 0,031 μ M (0,007-0,054) respectivamente e isorhamnetina aglicona [0,008 μ M (0-0,019) y 0,035 μ M (0,001-0,069), respectivamente], mientras que los glucurónidos de isorhamnetina no se detectaron (Fig. 15).

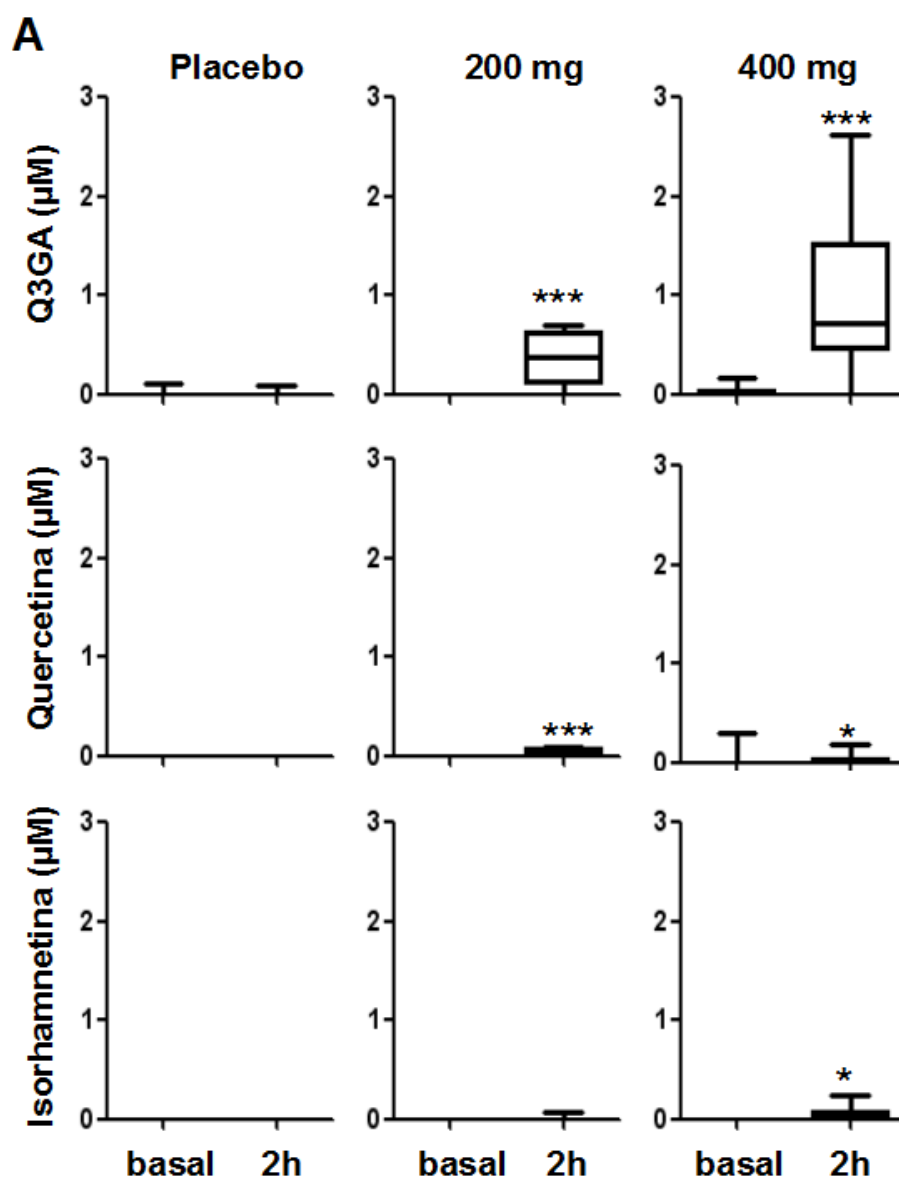


Fig. 15. A. Niveles plasmáticos de flavonoides en voluntarios sanos medidos al inicio del estudio y 2 h después de la ingesta oral de placebo, quercetina 200 mg o 400 mg, representado en caja con bigotes de mínimo a máximo ($n = 16$, $*p < 0,05$, $*** p < 0,001$, en comparación con el basal).

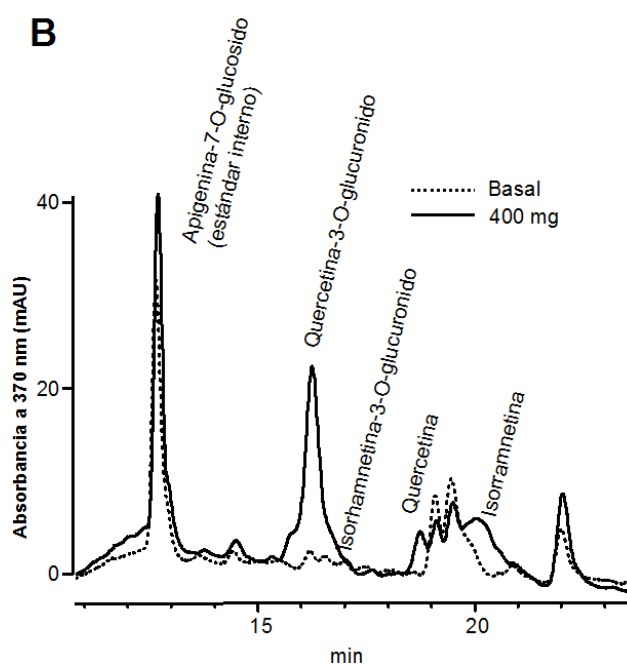


Fig 15. B. A la derecha se muestra un cromatograma típico basal y después de la administración de 400 mg de quercetina.

1.4. Efectos de la quercetina en la presión sanguínea, flujo sanguíneo y diámetro de la arteria braquial.

No se observaron cambios en la presión arterial sistólica ni diastólica después de 2 y 5h de la ingestión de 200 y 400 mg de quercetina. (Fig. 16).

Sin embargo, se observó un aumento en el diámetro de la arteria braquial tiempo-dependiente tras la administración de 400 mg de quercetina (Fig. 16). También se observó una tendencia al aumento del flujo arterial que no fue significativo. Sin embargo, encontramos una

buena correlación entre los cambios en el flujo y el diámetro ($p = 0,003$, $r^2 = 0,48$, para 400 mg de quercetina, no mostrado)

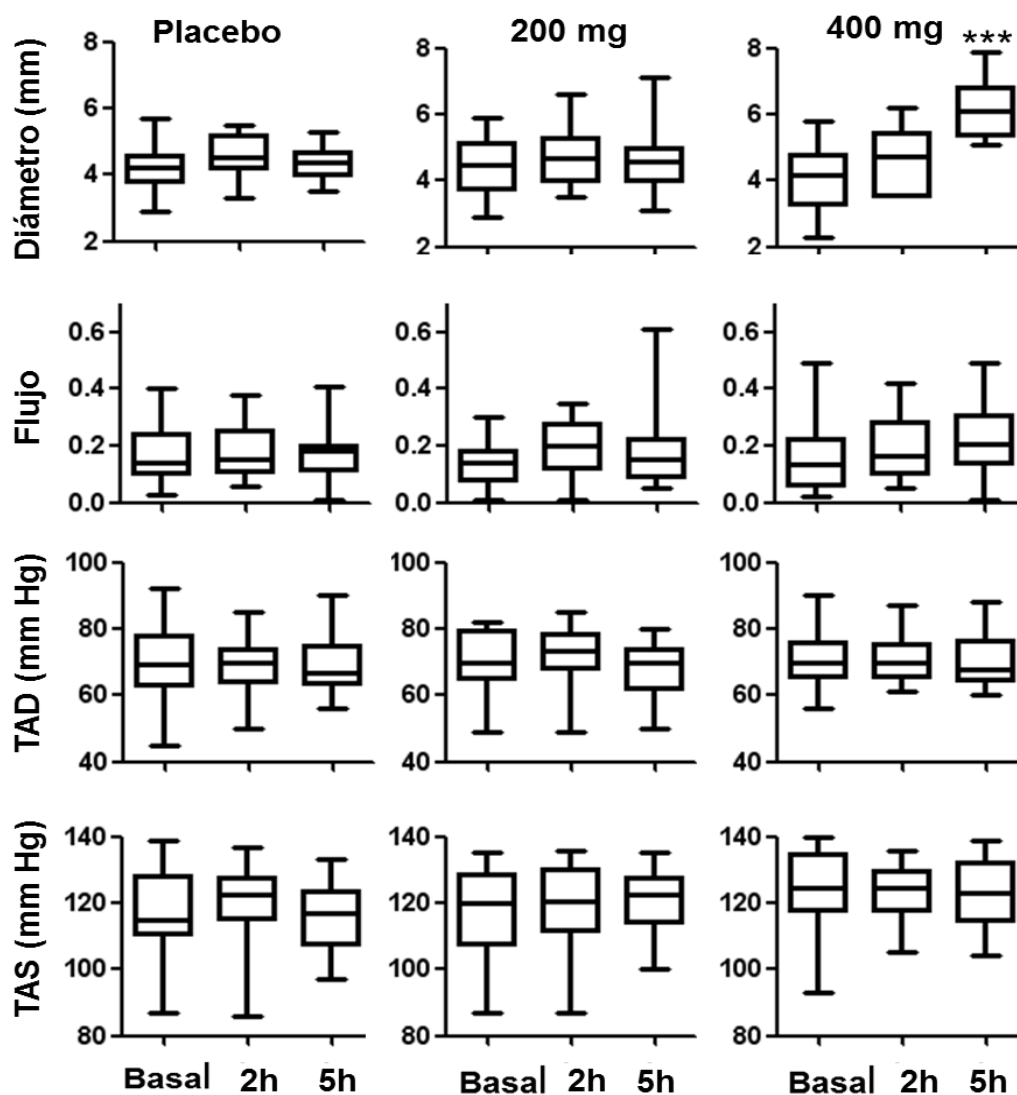


Fig. 16. Efectos de la quercetina sobre el diámetro y el flujo de la arteria braquial, tensión arterial diastólica (TAD) y tensión arterial sistólica (TAS) en voluntarios sanos. Los datos se registraron a nivel basal, a las 2h y 5h después de la ingesta oral de placebo, quercetina de 200 mg o 400 mg, representado en diagrama de caja y bigotes de mínimo a máximo ($n = 16$, *** $p < 0,001$ en comparación con el basal).

Ni la concentración plasmática de flavonoides, ni la actividad de la β -glucuronidasa plasmática se correlacionaron significativamente con el aumento del diámetro arterial a las 5 h post ingesta (Fig. 17 y 18). Sin embargo, el cambio de diámetro se correlacionó con el producto de los niveles de Q3GA por la actividad β -glucuronidasa plasmática (Figura 19).

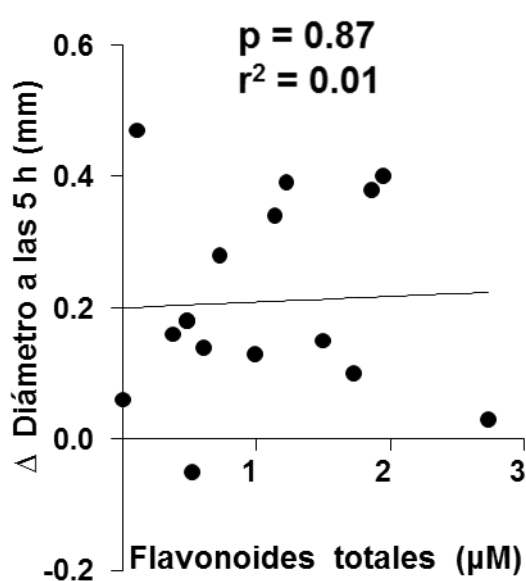


Fig. 17. Correlación entre el cambio de diámetro, medido a las 5 h después de la ingesta de quercetina, con los flavonoides totales plasmáticos (suma de Q3GA, quercetina e isorhamnetina) ($n= 16$).

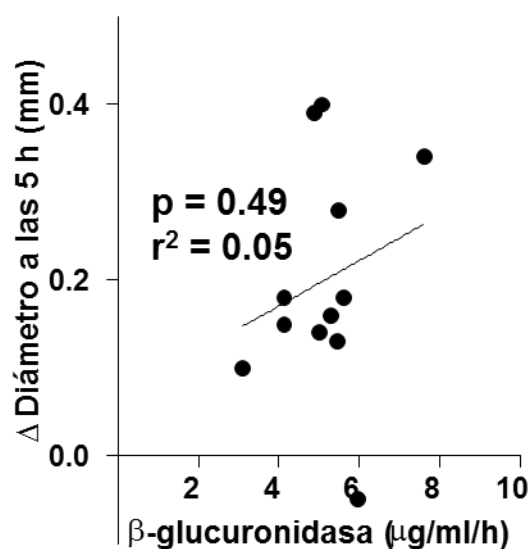


Fig. 18. Correlación entre el cambio de diámetro, medido a las 5 h después de la ingesta de quercetina., con la actividad β-glucuronidasa ($n=12$).

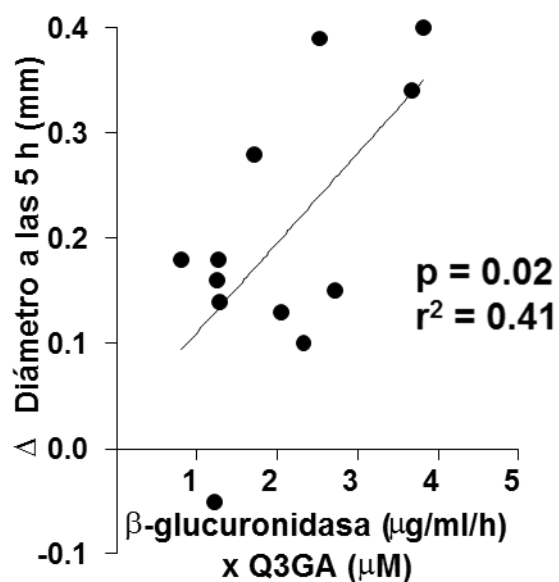


Fig. 19. Correlación entre el cambio de diámetro, medido a las 5 h después de la ingesta de quercetina en voluntarios sanos ($n=16$), y el

producto de los niveles de quercetina- 3-glucurónido (Q3GA) por la actividad β - glucuronidasa plasmática.

1.5. Efectos de la quercetina en el glutatión total plasmático y niveles de isoprostanos, nitritos y nitratos en orina.

Sólo la ingestión de quercetina de 400 mg aumentó el glutatión plasmático a las 2 h (Fig. 20). Los niveles de isoprostanos disminuyeron en los tres grupos experimentales después de 5 h. Esta disminución tendió a ser mayor después de 400 mg de quercetina, pero los cambios no fueron significativamente diferentes entre los grupos (Fig. 20]. Se encontró una reducción significativa de los niveles urinarios de NOx a las 5 h post-ingesta de 400 mg de quercetina (Fig. 20).

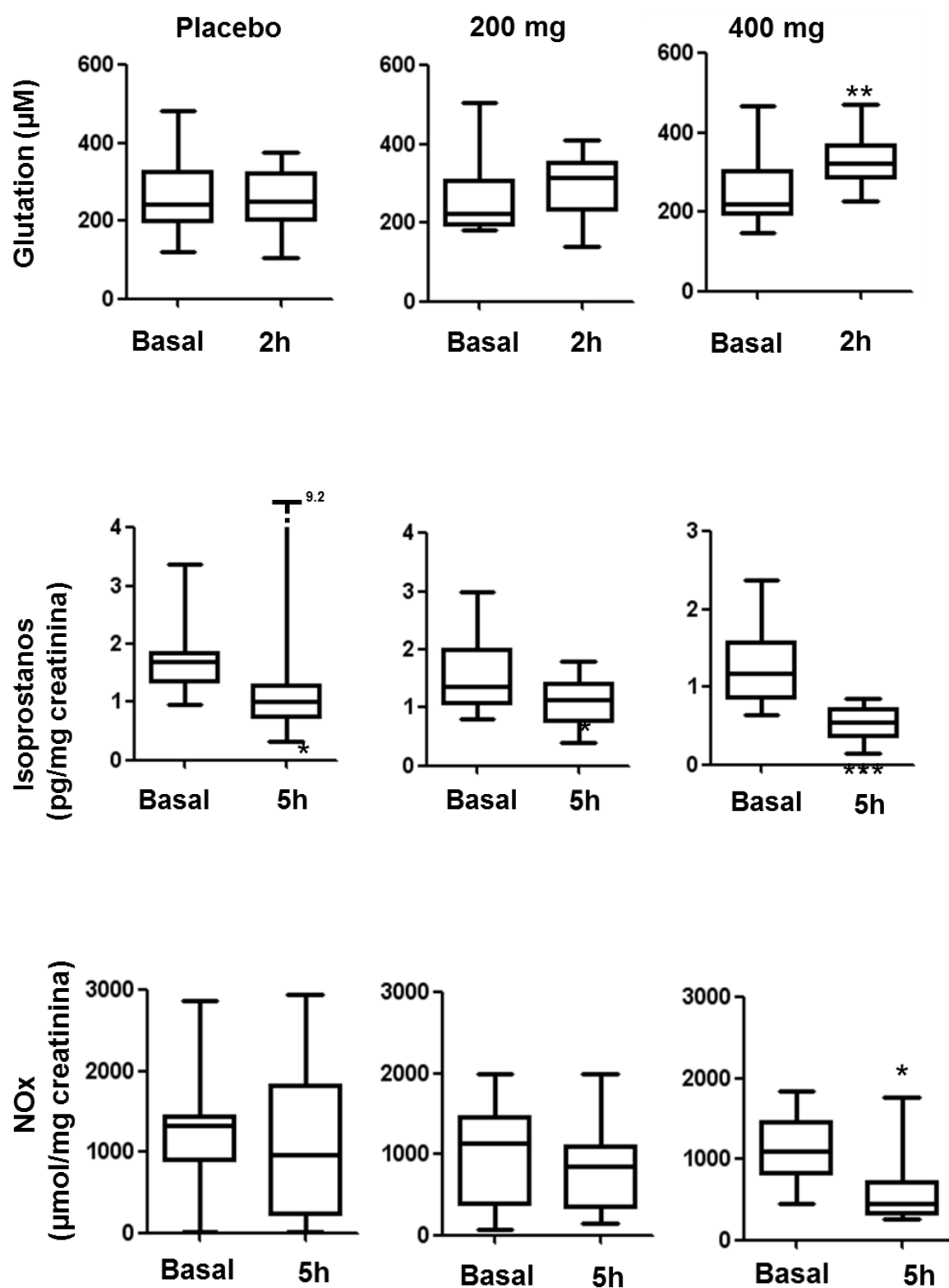


Fig. 20. Efectos de la quercetina en voluntarios sanos sobre el glutati3n

*plasmático total, los 8-isoprostanos en orina y los nitritos más nitratos (NOx) en orina. Se tomaron muestras de plasma basal y a las 2 h y se tomaron muestras de orina al inicio del estudio y 5 h después de la toma oral de placebo, quercetina 200 o 400 mg, representado en diagrama de caja y bigotes de mínimo a máximo (n = 16 * p <0,05, ** p <0,01 y *** p <0,001 en comparación con el basal).*

2. Efectos de quercetina, isorhamnetina y Q3GA in vitro en arterias umbilicales humanas.

La exposición de las arterias umbilicales aisladas al U46619 (0,1 μ M) resultó en una contracción sostenida. La adición de quercetina o su metabolito isorhamnetina metilada produjo una vasodilatación concentración-dependiente en los vasos endoteliales intactos, siendo significativo a partir de concentraciones ≥ 10 nM, mientras que ni el vehículo (dimetilsulfóxido) o Q3GA tuvieron efecto (Fig. 21). La potencia de los flavonoides, calculada como CI50, fue de 1,4 y 5 μ M, respectivamente. La inhibición de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) con L-NAME o denudación endotelial inhibió parcialmente la relajación inducida por concentraciones bajas de quercetina e isorhamnetina.

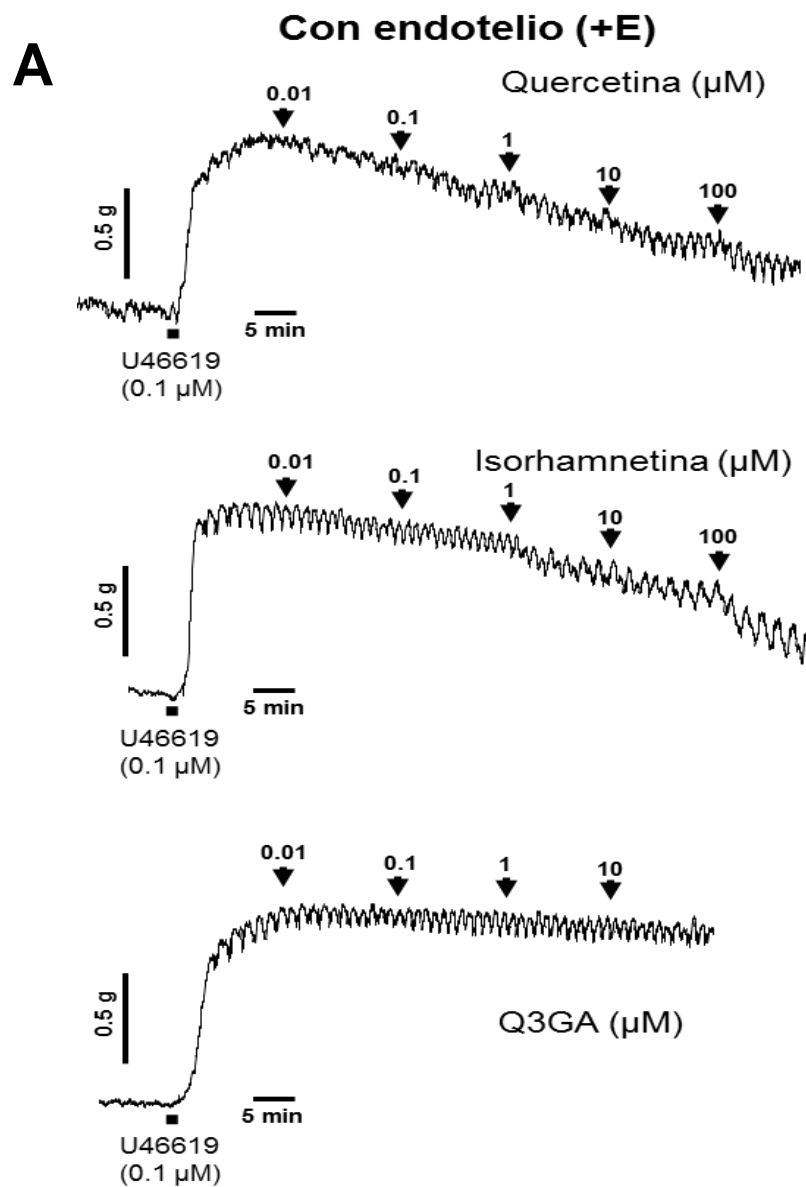


Fig 21.A. Efecto vasodilatador de quercetina, isorhamnetina y Q3GA en arterias umbilicales humanas aisladas precontraídas por el análogo del tromboxano A₂, U46619 (100 nM). (A) Grabación de tensión isométrica original en anillos con endotelio intacto.

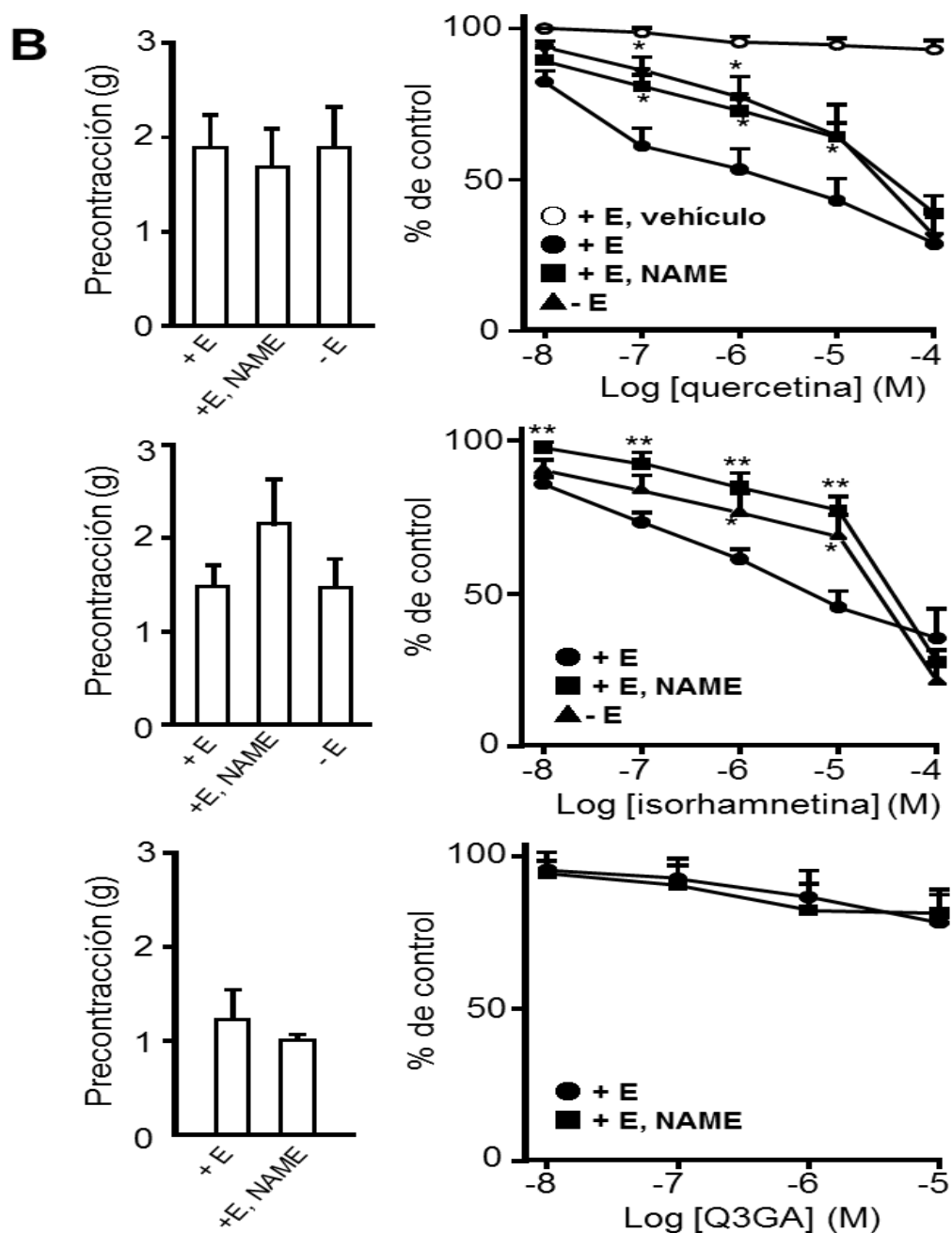


Fig 21.B. Aumento promedio de la tensión inicial inducida por U46619 (100 nM) (izquierda) y respuesta vasodilatadora inducida por flavonoides en anillos con endotelio (+ E), en ausencia o en presencia de éster metílico de NG-nitro-1-arginina (l-NAME, 100 M) y sin endotelio (-E) (derecha). También se muestran los experimentos paralelos con vehiculo (DMSO). Los resultados son medias \pm SEM de arterias aisladas de 7 cordones umbilicales realizadas por triplicado.

DISCUSIÓN.

La enfermedad cardiovascular constituye en su conjunto la primera causa de mortalidad a nivel mundial en los últimos quince años. Los principales factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular incluyen, aunque no están limitados, el tabaquismo, la presión sanguínea, la dislipemia, la diabetes mellitus y la obesidad (*Herrington et al., 2016*). Se estima que hasta un 80% de las enfermedades cardiovasculares, el 90% de la diabetes tipo 2 y un tercio de las neoplasias, podrían evitarse si se modifican los factores de riesgo que afectan al estilo de vida, incluyendo la dieta (*Hu et al., 2001; Key et al., 2002*).

Son numerosos los estudios que han demostrado que una dieta rica en frutas y verduras reduce la morbimortalidad cardiovascular (*Broekmans et al., 2001, Zhang et al., 2017*). Por ello, la American Heart Association incluye, como parte del manejo de los pacientes con factores de riesgo cardiovascular, la ingesta de frutas y verduras (*NCEP, 2002*). Este hecho, ha despertado el interés en la comunidad científica, lo que ha llevado a la realización de ensayos clínicos de intervención con diversos antioxidantes de origen vegetal (*Ascherio et al., 1999*). Dentro de los constituyentes de la dieta, los compuestos fenólicos y dentro de ellos, los flavonoides, han recibido especial atención en las últimas décadas por sus efectos beneficiosos a nivel cardiovascular, incluyendo la cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular, arteriopatía periférica y enfermedad renal (*D'Agostino et al., 2008*).

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, siendo la quercetina uno de los más abundantes, representando un 60-75%. Es por ello, uno de los más estudiados, bien como suplemento o formando parte de la dieta, si bien, aún quedan por responder cuestiones sobre su eficacia, mecanismo de acción y biodisponibilidad. Por estos motivos, la quercetina ha sido centro de atención de esta Tesis Doctoral.

1. Efectos sobre la presión arterial.

La presión arterial está regulada principalmente por cambios en la resistencia vascular periférica generados por el estrechamiento de vasos de resistencia, principalmente arterias pequeñas y arteriolas, y a alteraciones funcionales, que conllevan a un deterioro en la respuesta vasodilatadora. A medida que avanza la edad, el daño estructural y el deterioro funcional, en las arterias de conductancia más grandes, se convierten en el principal determinante de la presión arterial (*Williams et al., 2008*). La reducción de las cifras tensionales, sobre todo la presión arterial sistólica, está asociado con un descenso del riesgo cardiovascular (*Turnbull, 2003*). El tratamiento farmacológico aunque efectivo, no es en ocasiones suficiente para conseguir los objetivos establecidos por las guías; de ahí la importancia de modificar el estilo de vida, sobre todo la dieta, como prevención o tratamiento coadyuvante de la patología cardiovascular.

Se ha demostrado que existe una correlación inversa entre la ingesta de alimentos ricos en flavonoides y la mortalidad de causa cardiovascular, siendo las principales dianas de acción la células endoteliales, las células del músculo liso y las plaquetas (*Pignatelli et al., 2006*).

Los efectos de la quercetina sobre la tensión arterial han sido analizados en ratas con diferentes modelos hipertensión: en las ratas SHR (equivalente a la hipertensión esencial en humanos), en el modelo producido por la inhibición de la NO sintetasa con L-NAME (*Duarte et al., 2002*), en el modelo inducido por acetildeoxicorticosterona (DOCA-sal) (*Galisteo et al., 2004*) o en el modelo de hipertensión por estenosis unilateral de la arteria renal o modelo de ratas Goldblatt (*García-Saura et al., 2005; Choi et al., 2016*). Otros grupos han descrito también

efectos similares en el modelo genético sensible a la sal (ratas Dahl) (Aoi *et al.*, 2004) o tras la coartación de la aorta (Jalili *et al.*, 2006).

Los flavonoides producen un efecto vasodilatador directo en vasos arteriales aislados (Duarte *et al.*, 1993; Pérez-Vizcaíno *et al.*, 2002), siendo su potencia mayor en arterias procedentes de ratas hipertensas (SHR) que en sus respectivos controles normotensos (Pignatelli *et al.*, 2006).

En nuestro estudio, observamos que el aumento del diámetro, en una arteria de conductancia grande como la arteria braquial, inducido por la quercetina oral en humanos jóvenes sanos, no se asoció con cambios en la presión sanguínea. Estos datos concuerdan con estudios anteriores que demuestran que la quercetina es eficaz en los seres humanos (Edwards *et al.*, 2007; Egert *et al.*, 2008; Larson *et al.*, 2012) y en ratas (Duarte *et al.*, 2001a; Pérez- Vizcaíno *et al.*, 2009), cuando la presión arterial es elevada; sin embargo, no afecta a la presión arterial sanguínea en normotensos, a pesar de diferentes formas de administración, bien sea de forma aguda (Larson *et al.*, 2012) o tras el consumo crónico (Edwards *et al.*, 2007). No obstante, la mayoría de los estudios realizados en humanos se llevaron a cabo en sujetos prehipertensos o con hipertensión leve (estadio 1), sin controlar los hábitos dietéticos así como la ingesta de sal, variables que pueden modificar los resultados en este tipo de hipertensión (Edwards *et al.*, 2007). Otra limitación en la interpretación del efecto hipotensor tras la administración, tanto crónica como aguda, de la quercetina, es que todos los estudios publicados en humanos hasta la fecha, incluyendo nuestro propio trabajo, sólo registraron tomas de presión arterial en reposo y no se realizó una monitorización de la presión arterial ambulatoria (MAPA) para determinar el efecto real hipotensor (Brüll *et al.*, 2015).

2. Efectos sobre el flujo braquial.

La disfunción endotelial es considerada como una de las primeras manifestaciones de la enfermedad vascular. La detección de ésta en arterias de conductancia, como la arteria braquial, indicaría también su presencia en otros lechos vasculares, como son las arterias coronarias, responsables de eventos cardiovasculares mayores (*Canon et al., 2001*).

Existen diversos métodos para evaluar disfunción endotelial, sin embargo, muchos de ellos son invasivos, indirectos o costosos, resultando difícil su aplicabilidad clínica. La vasodilatación mediada por flujo (VMF) de la arteria braquial, se trata de un método no invasivo de función endotelial, que evalúa la respuesta vasodilatadora del endotelio sometido a un estrés mecánico, aplicado a la arteria braquial al insuflar el esfigmomanómetro (*Faulx et al., 2003*).

En estudios realizados en voluntarios sanos a los que se les suministró de manera crónica suplementos ricos en polifenoles, se detectó una mejoría de la función endotelial medida por VMF de la arteria braquial, frente a una dieta rica en grasa (*Cuevas et al., 2000; Plotnick et al., 2003*). En pacientes con enfermedad coronaria, la ingesta de zumo de uva negra durante 14 días, tuvo también un impacto favorable sobre el VMF (*Stein et al., 1999*). Sin embargo, en un estudio más reciente realizado en pacientes hipertensos tras una dosis elevada de quercetina (1095 mg) no se vio afectada la dilatación mediada por flujo (*Larson et al., 2012*). En nuestro estudio, observamos una tendencia al aumento en el flujo arterial, que puede explicar la falta de cambio en la presión arterial descrita previamente. Sin embargo, la mayor variabilidad en las mediciones de flujo, excluyó la constatación de diferencias significativas para este parámetro.

3. Efectos sobre el tono vascular.

El tono vascular se mantiene mediante la liberación endotelial de sustancias vasodilatadoras, siendo el NO el principal agente vasodilatador y, vasoconstrictoras, como la endotelina-1 (*Davignon y Ganz, 2004*). La cuantificación del NO es difícil en medios biológicos debido a su corta vida media (de 6 a 10 segundos) y a sus bajas concentraciones, es por ello que se cuantifican sus metabolitos estables en plasma y orina (nitritos (NO₂), nitratos (NO₃) y S-nitrosotioles). Estos metabolitos son considerados como medidas fiables de la producción de NO endógeno presentando efectos similares, como es el caso de los S-nitrosotioles, que producen vasodilatación e inhibición plaquetaria (*Gandley et al., 2005, Loke et al., 2008*).

Uno de los mecanismos implicados en el papel beneficioso de los flavonoides sobre la salud cardiovascular es el atribuido a su acción vasodilatadora, poniendo de manifiesto su capacidad para prevenir o revertir la disfunción endotelial (*Pérez- Vizcaíno et al., 2006*).

Los efectos de quercetina sobre el tono vascular han sido evaluados en animales (*Duarte et al., 2001; Pérez- Vizcaíno et al., 2002*) y en arterias humanas (en el presente estudio) in vitro. El efecto vasodilatador de quercetina es más intenso en las arterias de resistencia que en los vasos de conductancia, así como en las arterias de animales hipertensos que en las de normotensos (*Pérez- Vizcaíno et al., 2002, Ibarra et al., 2003*). Algunos estudios indican que en los vasos sanos tales efectos son independientes del endotelio y de la producción de óxido nítrico (NO), mientras que otros muestran efectos NO-dependientes (*Pérez- Vizcaíno et al., 2010*). En nuestro trabajo, encontramos que la inhibición de eNOS o la denudación del endotelio, inhibieron parcialmente el efecto vasodilatador de la quercetina en vasos placentarios humanos in vitro, mostrando una participación parcial del NO endotelial. Loke et al., en el trabajo publicado en 2008,

especularon que la quercetina aumenta, en sujetos sanos, los niveles plasmáticos de S-nitrosotioles, nitritos, y las concentraciones urinarias de nitrato, que de forma indirecta señalan un aumento de NO endotelial, por lo que la quercetina podría mejorar la función endotelial. Sin embargo, dicho estudio presenta ciertas limitaciones puesto que no se realizaron medidas directas de la función endotelial, como la VMF de la arteria braquial o la presión sanguínea. En un estudio posterior, Larson et al. (2012), informaron que los nitritos séricos no se vieron afectados tras una dosis elevada de quercetina (1095 mg) en sujetos hipertensos, así como la VMF de la arteria braquial. En nuestro estudio, demostramos que la quercetina no aumenta los niveles de NOx en la orina, lo que apoya la dependencia variable del NO a la respuesta de quercetina. Sin embargo, se encontró que la quercetina aumentó el glutatión plasmático, un biomarcador antioxidante. También disminuyó los niveles de isoprostanos, un biomarcador del estrés oxidativo, aunque el cambio no fue diferente en comparación con el efecto del placebo.

4. Metabolitos plasmáticos tras la administración aguda de quercetina.

Los flavonoides son ingeridos regularmente en la dieta principalmente en forma de glicósidos, aunque también pueden aparecer como forma libre, o bien, como suplementos alimenticios en forma de agliconas. Una vez ingeridos, éstos sufren diferentes modificaciones químicas a través del tracto gastrointestinal como la desglicosilación mediada por enzimas como la β -glucosidasa o la LPH, la desconjugación por la microbiota del organismo, además de ser metabolizados a nivel intestinal, hepático y tejidos periféricos, tras su absorción a través de la pared intestinal (*Manach et al., 2005*).

Los primeros estudios farmacocinéticos llevados a cabo en humanos, demostraron que las concentraciones de quercetina como aglicona eran mínimas o indetectables en el plasma (*Gugler et al., 1975; Day et al., 2001*), sin embargo, sus efectos biológicos eran claros, de ahí, la denominada paradoja de los flavonoides. La detección en plasma de metabolitos conjugados con ácido glucurónico y sulfato, resultantes del efecto de primer paso en el intestino o en el hígado, no tuvo lugar hasta la década pasada. Las enzimas responsables de esta metabolización son las UDP- glucoroniltransferasas, las sulfottransferasas y las metiltransferasas, siendo los principales metabolitos detectados en plasma humano: quercetina-3-glucurónido, quercetina-3'-sulfato, y 3'-metilquercetina-3- glucurónido (isorhamnetina-3-glucurónido). La mayoría de estos metabolitos se encuentran en concentraciones por debajo del rango micromolar, sin embargo, debemos destacar que una baja concentración no indica una falta de actividad biológica.

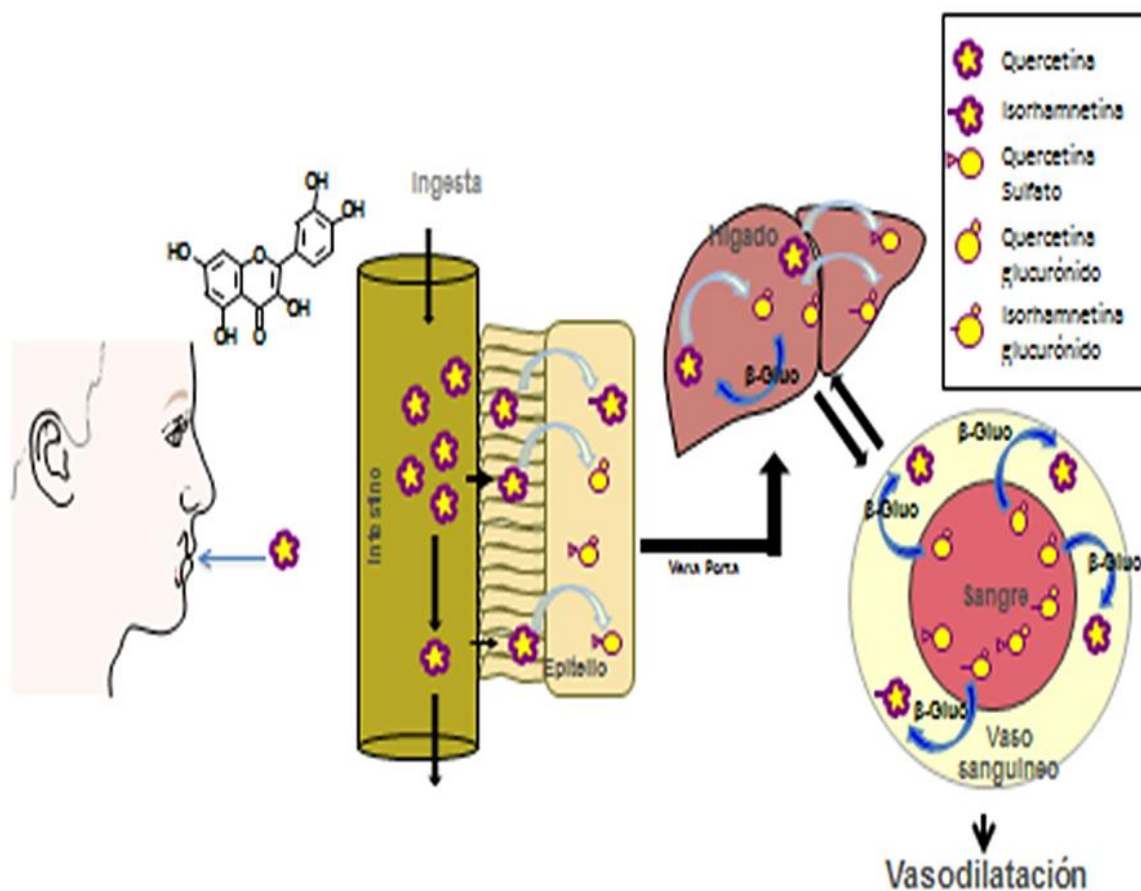


Fig. 22. Esquema de la farmacocinética de los flavonoides.

En este gráfico se muestra como la quercetina ingerida por vía oral se absorbe parcialmente en el intestino donde será hidrolizada por enzimas intestinales o por la microflora del colon. Durante el curso de la absorción, los flavonoides son conjugados en el intestino e hígado mediante reacciones de metilación, glucuronidación, sulfatación, o sus combinaciones, mayoritariamente formando metabolitos glucurónicos y sulfatos, que son las formas que circulan en el plasma. Una vez en la circulación sanguínea, la quercetina se une a la albúmina y es transportada hacia diferentes órganos (intestino delgado, colon, hígado y riñón) y tejidos. A nivel vascular, los metabolitos conjugados a través de

la β -glucuronidasa liberan la forma aglicona, lo que permite que se acumule en los tejidos y ejercer su efecto biológico.

En estudios previos, realizados en humanos a los que se les administró quercetina aglicona, el análisis de los flavonoides totales en el plasma era realizado mediante hidrólisis con enzimas glucuronidasas y sulfatasas (Erlund et al., 2000, Egert et al., 2008, Larson et al., 2012). Debido a que los compuestos sulfatados y glucuronizados, eran los únicos metabolitos detectados en plasma humano, se les adjudicó un papel decisivo en los posibles efectos beneficiosos. Sin embargo, hasta donde podemos saber, este es el primer trabajo que recoge metabolitos conjugados detectados en plasma humano después de la ingesta de quercetina pura. Una sola dosis oral de quercetina aumentó las concentraciones de Q3GA en circulación (~0,4 y 1 μ M para 200 y 400 mg, respectivamente), con cambios menores en las agliconas en el plasma (siempre por debajo de 0,1 μ M), mientras que no se hallaron otros metabolitos. Cuantitativamente, estos niveles son consistentes con los descritos previamente para flavonoides totales después de la hidrólisis (0,2 para 100 mg (Erlund et al., 2000), 0,43 para 150 mg (Egert et al., 2008) y 1- 2,2 μ M para 1095 mg (Larson et al., 2012)). Curiosamente, el perfil metabólico de nuestro estudio, tras la administración aguda de quercetina en sujetos sanos, resulta diferente al descrito en otros trabajos previos, realizados también en seres humanos, después de la ingesta de alimentos ricos en quercetina (Day et al., 2001; Mullen et al., 2006; Lee et al., 2012) los cuales incluyen quercetina-3-O-sulfato, quercetina-3-O-glucurónido, isorhamnetina-3-O-glucurónido, quercetina diglucurónido y quercetina glucurónido sulfato mientras que las agliconas tampoco se detectaron. De forma similar, se encontraron diferentes metabolitos de quercetina en plasma de ratas después de una sola administración intragástrica de quercetina en comparación con aquellos después de un acceso libre

mezclado con alimentos (*Kawai et al., 2009*). Por lo tanto, la administración de quercetina, bien como una cápsula a seres humanos o como una suspensión intragástrica a ratas, resulta principalmente en un aumento de Q3GA, con aumentos menores en otros metabolitos incluyendo las agliconas. Los alimentos ricos en quercetina en humanos o quercetina añadida a la dieta dan como resultado un perfil metabólico más complejo, en el que los derivados metilados y sulfatados son los predominantes y los agliconas están ausentes.

5. Efectos de Q3GA sobre el tono vascular

A pesar de que los flavonoides orales ejercen efectos sistémicos biológicamente demostrables, la concentración de agliconas en el plasma es muy baja y sus formas conjugadas circulantes muestran una débil actividad aguda en *in vitro*, de hecho, en contraste con las agliconas (*Pérez- Vizcaino et al., 2002*), los metabolitos glucuronizados y sulfatados carecen de efecto vasodilatador agudo directo en arterias aisladas, ejerciendo un efecto parcial en la prevención de la disfunción endotelial aguda (*Lodi et al., 2009*). En nuestro estudio, se confirma también la ausencia de efecto vasodilatador para Q3GA en las arterias humanas, una inconstancia que se ha denominado "la paradoja de los flavonoides" (*Terao et al., 2011; Pérez Vizcaíno et al., 2012*). Sin embargo, los glucurono-conjugados, pero no los sulfo-conjugados (*Pérez- Vizcaíno et al., 2012*), pueden ser hidrolizados a nivel vascular por la β -glucuronidasa, produciendo aglicona, que debido a su mayor solubilidad lipídica se acumula en los tejidos (*Dueñas et al., 2011*). De hecho, la inhibición de β -glucuronidasa previene los efectos *in vivo* de Q3GA intravenosa y quercetina oral en ratas (*Galindo et al., 2012*). Por tanto, se propuso que los derivados glucuronizados transportan la

quercetina y su formas metiladas en el plasma, liberando en los tejidos las agliconas libres, que son los efectores finales (*Terao et al. 2011; Pérez Vizcaíno et al., 2012*).

6. Efectos de la quercetina: correlación con la actividad β -glucuronidasa.

La β -glucuronidasa es una enzima lisosómica implicada en la escisión de los glicosaminoglicanos, cuya deficiencia total conduce a una severa mucopolisacaridosis tipo VII. También se ha informado de una amplia variabilidad interindividual en la actividad de esta enzima, que puede explicarse por cambios en su expresión o por variaciones en su secuencia génica (*Gratz et al., 2006*). Estudios realizados en ratones transgénicos que expresan apoE3 mostraron mayor actividad β -glucuronidasa que aquellos que expresan apoE4 (*Boesch et al., 2010*), lo que puede estar relacionado con la disminución de la presión arterial sistólica inducida por la quercetina en pacientes con genotipo apoE3, en comparación con el grupo apoE4, cuyos efectos no fueron significativos. Por tanto, planteamos la hipótesis de que la actividad β -glucuronidasa puede influir en la eficacia de la quercetina.

En modelos animales, la actividad de la β -glucuronidasa se vió reducida tras la administración de sacarolactona, inhibidor clásico de dicha enzima. Sin embargo, debido a que la inhibición de la β -glucuronidasa no es factible en los seres humanos, excluyendo el análisis apropiado de una relación causa-efecto, medimos su actividad en un intento de correlacionarla con los efectos funcionales de la quercetina. Medimos la actividad de la β -glucuronidasa en el plasma que es considerablemente baja, pero puede ser usado como sustituto de la actividad en los tejidos.

En diferentes estudios, el pico de flavonoides totales en plasma se obtuvo a los 60-360 min, tras la administración oral de quercetina pura

(*Erlund et al., 2000; Egert et al., 2008; Larson et al., 2012*). En nuestro estudio, medimos los metabolitos plasmáticos a las 2 h, que puede ser usado como un indicador de biodisponibilidad de la quercetina. Basándonos en estudios con animales, no esperamos que los efectos biológicos y las concentraciones plasmáticas de Q3GA sigan un curso temporal similar, siendo el primero mucho más prolongado que este último (*Galindo et al., 2012*). Encontramos que el efecto sobre el diámetro arterial no se correlaciona ni con las concentraciones plasmáticas de flavonoides totales ni con la actividad plasmática β -glucuronidasa. Sin embargo, estos efectos se correlacionaron con un factor compuesto de ambos, el producto de los niveles plasmáticos de quercetina-3- glucurónido por la actividad β -glucuronidasa medida a las 2 horas. Estos datos son compatibles con la opinión de que los efectos son proporcionales a la biodisponibilidad de la quercetina y la tasa de desconjugación del glucurónido en los tejidos. Por tanto, el ciclo conjugación-desconjugación parece ser un requisito para los efectos de la quercetina administrada por vía oral, al menos, en relación con los efectos vasodilatadores y antihipertensivos.

CONCLUSIONES.

1. La administración aguda de la quercetina en sujetos sanos normotensos y normocolesterolémicos, ejerce un efecto vasodilatador en arterias humanas tanto in vitro como in vivo, siendo tales efectos dosis y tiempo dependientes.
2. El efecto vasodilatador, inducido por la quercetina a las 5 horas tras la administración oral, resulta de la desconjugación de Q3GA producto de la actividad β -glucuronidasa lo que conlleva a la liberación in situ de la forma aglicona, responsable del efecto biológico.
3. El aumento del diámetro en la arteria braquial, tras la ingesta de quercetina oral en humanos jóvenes sanos, no se asoció con cambios en la presión sanguínea con ninguna de las dosis suministradas.

BIBLIOGRAFÍA.

Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 2002; 18(1):75-81.

Ajay M, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Effect of quercetin on altered vascular reactivity in aortas isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res*. 2006; 73(1):1-7.

Ajay M, Gilani AU, Mustafa MR. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci*. 2003; 74(5):603-12.

Alexander RW: Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: A new perspective. *Hypertension*. 1995; 25: 155-161.

Al-Khudairy L, Flowers N, Wheelhouse R, Ghannam O, Hartley L, Stranges S, Rees K. Vitamin C supplementation for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Rev*. 2017; 3.

Andrade F H. Reactive Oxygen species and skeletal muscle function. In: Free radicals in exercise and aging. (Ed.Radak Z). *Human Kinetics*, 2000; 117-148.

Annapurna A, Reddy CS, Akondi RB, Rao SR. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol*. 2009; 61:1365-1374.

Aoi N, Miyazaki H, Marunaka Y. Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 315(4):892-6.

Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinae N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr*. 2000; 130(9):2243-2250.

Arts IC, Hollman PC, Feskens EJ, Bueno de Mesquita HB, and Kromhout D: Catechin intake and associated dietary and lifestyle factors in a representative sample of Dutch men and women. *Eur J Clin Nutr*. 2001; 55: 76-81.

Ascherio A, Rimm EB, Hernán MA, Giovannucci E, Kawachi I, Stampfer MJ, Willett WC. Relation of consumption of vitamin E, vitamin C, and

carotenoids to risk for stroke among men in the United States. *Ann Intern Med.* 1999; 130(12):963-70.

Auger C, Teissedre PL, Gerain P, Lequeux N, Bornet A, Serisier S, *et al.* Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *J Agric Food Chem.* 2005; 53:2015- 2021.

Aura AM, O'Leary KA, Williamson G, Ojala M, Bailey M, Puupponen-Pimiä R, Nuutila AM, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *J Food Chem.* 2002; 50(6):1725-30.

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

Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, Shaw S, Münter K, Lüscher TF. Endothelin ET_A receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(24):14367-72.

Bauer V, Sotniková R. Nitric oxide--the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. *Gen Physiol Biophys* 2010; 29(4):319-40

Bejarano JM, Cuixart CB. Cardiovascular risk factors and Primary Care: evaluation and intervention. *Aten Primaria Aten.* 2011; 43(12):668-77.

Benito S, Lopez D, Sáiz MP, Buxaderas S, Sánchez J, Puig- Parellada P, Mitjavila MT. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 2002; 135(4):910-6.

Beretz A, Cazenave JP, Anton R. Inhibition of aggregation and secretion of human platelets by quercetin and other flavonoids: structure-activity relationships. *Agents Actions.* 1982; 12:382-387.

Boesch-Saadatmandi C, Niering J, Minihane AM, Wiswedel I, Gardeman A, Wolfram S. Impact of apolipoprotein E genotype and dietary quercetin on paraoxonase 1 status in apoE3 and apoE4 transgenic mice. *Atherosclerosis.* 2010; 211(1):110-113.

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

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

Boots AW, Li H, Schins RP, Duffin R, Heemskerk JW, Bast A, Haenen GR. The quercetin paradox. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;222(1):89-96.

Boulton DW, Walle UK, Walle T. Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism. *J Pharm Pharmacol*. 1999; 51:353-359.

Briones AM and Touyz RM. Oxidative Stress and Hypertension: Current Concepts. *Current Hypertension Reports*, 2010; 12 (2): 135-142.

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(8):636-42.

Brookes PS, Digerness SB, Parks DA, Darley-Usmar V. Mitochondrial function in response to cardiac ischemia-reperfusion after oral treatment with quercetin. *Free Radic Biol Med*. 2002; 32:1220-1228.

Brüll V, Burak C, Stoffel-Wagner B, Wolfram S, Nickenig G, Müller C, Langguth P, Alteheld B, Fimmers R, Naaf S, Zimmermann BF, Stehle P, Egert S. Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-)hypertension: a randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. *Br J Nutr*. 2015; 114(8):1263-77.

Brunner F, Brás-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacology Therapeutics*. 2006; 111(2):508-531.

Bund SJ, Lee RMKW. Arterial structural changes in hypertension: a consideration of methodology, terminology and functional consequence. *J. Vasc. Res*. 2003; 40:547-557.

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

Cannon CP, Battler A, Brindis RG, Cox JL, Ellis SG, Every NR, Flaherty JT, Harrington RA, Krumholz HM, Simoons ML, Van De Werf FJ, Weintraub WS, Mitchell KR, Morrisson SL, Brindis RG, Anderson HV, Cannom DS, Chitwood WR, Cigarroa JE, Collins-Nakai RL, Ellis SG, Gibbons RJ, Grover FL, Heidenreich PA, Khandheria BK, Knoebel SB, Krumholz HL, Malenka DJ, Mark DB, Mckay CR, Passamani ER, Radford MJ, Riner RN, Schwartz JB, Shaw RE, Shemin RJ, Van Fossen DB, Verrier ED, Watkins MW, Phoubandith DR, Furnelli T. American College of Cardiology key data elements and definitions for measuring the clinical management and outcomes of patients with acute coronary syndromes. A report of the American College of Cardiology Task CCFORCE on Clinical Data Standards.(Acute Coronary Syndromes Writing Committee). *J Am Coll Cardiol*. 2001; 38(7):2114-30.

Carlstrom J, Symons JD, Wu TC, Bruno RS, Litwin SE, Jalili T. A quercetin supplemented diet does not prevent cardiovascular complications in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 2007; 137(3):628-33.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: prevalence, treatment, and control of hypertension United States, 1999-2002 and 2005-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011; 60(4):103-8.

Chakraborti S, Chakraborti T. Oxidant-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear transcription factors in the cardiovascular system: a brief overview. *Cell Signal* 1998; 10(10):675-83.

Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res*. 1993; 13(6): 2165-2170.

Choi S, Ryu KH, Park SH, Jun JY, Shin BC, Chung JH, Yeum CH. Direct vascular actions of quercetin in aorta from renal hypertensive rats. *Kidney Res Clin. Pract*. 2016; 35(1):15-21.

Clarkson P, Celermajer DS, Donald AE, Sampson M, Sorensen KE, Adams M, Yue DK, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Am Coll Cardiol*. 1996; 28: 573-579.

Cohen R A, Vanhoutte P M. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*. 1995; (92): 3337-3349.

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

Comalada M, Ballester I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, *et al.* Inhibition of proinflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol.* 2006; 72: 1010-1021.

Corriu C, Feletou M, Canet E, Vanhoutte P M. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol.* 1996; (119): 959-964.

Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, *et al.* Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest.* 1990; 86: 228– 234.

Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol.* 1999; 277: G120-126.

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.

Cuevas AM, Guasch V, Castillo O. A high-fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. *Lipids.* 2000; 35: 145-8.

Cui Y, Konig J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem.* 2001; 276:9626-9630.

D'Agostino RB Sr, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, Kannel WB: General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2008, 117, 743–753.

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

Dauchet L, Amouyel P, Dallongeville J. Fruits, vegetables and coronary heart disease. *Nat Rev Cardiol.* 2009; 6(9):599-608.

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

Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, McLauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 2000; 468:166-170.

Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, et al. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* 1998; 436:71-75.

Day AJ, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, Williamson G. Absorption of quercetin-3- glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium dependent glucose transporter. *Biochem Pharmacol.* 2003; 65:1199-1206.

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(6):941-52.

Dower JI, Geleijnse JM, Gijsbers L, Schalkwijk C, Kromhout D, Hollman PC. Supplementation of the Pure Flavonoids Epicatechin and Quercetin Affects Some Biomarkers of Endothelial Dysfunction and Inflammation in (Pre)Hypertensive Adults: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *J Nutr.* 2015; 145(7):1459-63.

Du G, Sun L, Zhao R, Du L, Song J, Zhang L, He G, Zhang Y, Zhang J. Polyphenols: Potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease. *Pharmacol Ther.* 2016; 162:23-34.

Duarte J, Galisteo M, Ocete MA, Pérez- Vizcaíno F, Zarzuelo A, Tamargo J. Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2001b; 221(1-2):155-60.

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, Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2001a; 133(1):117-24.

Duarte J, Pérez-Vizcaíno F. Protección Cardiovascular con flavonoides. Enigma farmacocinético. *Ars Pharm.* 2015; 56(4):193-200.

Duarte J, Pérez-Vizcaíno F, Jiménez J, Tamargo J, Zarzuelo A: Flavonoids and cardiovascular diseases. En: Atta-Ur-Rahman. Ed. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol 25, part F. Amsterdam. Elsevier. 2001: 565-605.

Duarte J, Pérez Vizcaíno F, Utrilla P, Jiménez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rataortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol.* 1993; 24(4):857-62.

Duarte J, Pérez-Vizcaíno F, Zarzuelo A, Jiménez J, Tamargo J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *EurPharmacol.* 1993a; 239(1-3):1-7.

Dueñas M, González-Manzano S, Surco-Laos F, González-Paramas A, Santos-Buelga C. Characterization of sulfated quercetin and epicatechin metabolites. *JAgric Food Chem.* 2012; 60:3592-8.

Dufour C, Dangles O. Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1721:164-173.

DuPont MS, Bennett RN, Mellon FA, Williamson G. Polyphenols from alcoholic apple cider are absorbed, metabolized and excreted by humans. *J Nutr.* 2002; 132(2):172-5.

d'Uscio LV, Barton M, Shaw S, Lüscher TF. Chronic ET(A) receptor blockade prevents endothelial dysfunction of small arteries in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res.* 2002; 53(2):487-95.

Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD, Jalili T. Quercetin reduces bloodpressure in hypertensive subjects. *JNutr.* 2007; 137 (11):2405-11.

Egan BM, Zhao Y, Axon RN. US trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension, 1988-2008. *JAMA.* 2010; 303(20):2043-50.

Egert S, Boesch-Saadatmandi C, Wolfram S, Rimbach G, Müller MJ. Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. *J Nutr.* 2010; 140(2):278-84.

Egert S, Bosy-Westphal A, Seiberl J, Kürbitz C, Settler U, Plachta-Danielzik S, Wagner AE, Frank J, Schrezenmeir J, Rimbach G, Wolfram S, Müller MJ. Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr.* 2009; 102(7):1065-74.

Egert S, Wolfram S, Bosy-Westphal A, Boesch-Saadatmandi C, Wagner AE, Frank J, et al. Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *J Nutr* 2008; 138:1615–21.

Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:1983-1992.

Erdman JW Jr, Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, Harnly J, Hollman P, Keen CL, Mazza G, Messina M, Scalbert A, Vita J, Williamson G, Burrowes J. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *J Nutr.* 2007; 137(3 Suppl 1):718S-737S.

Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Mäenpää J, Perttunen K, Kenraali J, et al. Pharma-cokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000; 56:545–53.

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

Faulx MD, Wright AT, Hoit BD. Detection of endothelial dysfunction with brachial artery ultrasound scanning. *Am Heart J.* 2003; 145(6):943-51.

Feihl F, Liaudet L, Levy BI, and Waeber B. Hypertension and microvascular remodelling. *Cardiovascular Research.* 2008; 78: 274–285.

Féletou M, Köhler R, Vanhoutte PM. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Curr Hypertens Rep.* 2010; 12(4):267-75.

Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol.* 1993; 265(2 Pt 2):H774-8.

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

Fox SB, Khong TY. Lack of innervation of human umbilical cord. An immunological and histochemical study. *Placenta.* 1990; 11:59-62.

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

Furchgott R F, Zawadzki J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; (288): 373-376.

Galindo P, Rodríguez-Gómez I, González-Manzano S, Dueñas M, Jiménez R, Menéndez C, et al. Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. *PLoS ONE.* 2012; 7:e32673.

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.* 2004; 259:91-9.

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

Gandley RE, Tyurin VA, Huang W, et al. S-nitrosoalbumin-mediated relaxation is enhanced by ascorbate and copper: effects in pregnancy and preeclampsia plasma. *Hypertension* 2005; 45:21-7

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(1-2):147-55.

Gazalla Ayub Shiekh, Taha Ayub, Saquib Naveed Khan, Rubiya Dar, and Khurshid Iqbal Andrabi. Reduced nitrate level in individuals

with hypertension and diabetes. *J Cardiovasc Dis Res.* 2011; 2(3): 172–176.

Gibbons G H. Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: A new therapeutic target. *American Journal of Cardiology.* 1997; (79): 3-8.

Gilligan DM, Sack MN, Guetta V, Casino PR, Quyyumi AA, Rader DJ, et al. Effect of antioxidant vitamins on low density lipoprotein oxidation and impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 1994; 24: 1611–161.

Godo S, Shimokawa H. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthases system in maintaining cardiovascular homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2016; 16: S0891-5849.

Goetz ME , Judd SE, Safford MM, Hartman TJ, McClellan WM, Vaccarino V. Dietary flavonoid intake and incident coronary heart disease: the REasons for Geographic and Racial Differences in Stroke (REGARDS) study. *Am J Clin Nutr.* 2016; 104(5):1236-1244.

Gonthier MP, Cheynier V, Donovan JL, Manach C, Morand C, Mila I, Lapiere C, Rémésy 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(2):461-7.

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

Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H, Veit M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol.* 2001; 41(5):492-9.

Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs Jr JB. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol.* 1996; 268:142–51.

Gratz M, Kunert-Keil C, John U, Cascorbi I, Kroemer HK. Identification and functional analysis of genetic variants of the human beta-glucuronidase in a German population sample. *Pharmacogenet Genomics.* 2005; 15:875–81.

Greenland P, Knoll M, Stamler J, et al. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *JAMA*. 2003; 290:891-897.

Guo Y, Bruno R S. Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. *J. Nutr. Biochem*. 2015; 26: 201-210.

Gugler R, Leschik M, Dengler HJ. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol*. 1975; 9(2-3):229-234

HaenenGR, Bast A. Nitric oxide radical scavenging of flavonoids. *MethodsEnzymol*. 1999; 301:490-503.

Halliwell B, Gutteridge J M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*. 1995; (18): 125-126.

Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, et al. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2000; 342: 454 – 460.

Harrison DG: Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*. 1997; 100 (9): 2153-2157.

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

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002; 13:572–84.

Heinonen M. Anthocyanins as dietary antioxidants. In: Voutilainen S, Salonen JT, eds. Third international conference on natural antioxidants and anticarcinogens in food, health, and disease (NAHD). *Helsinki, Finland*. 2001:25.

Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perré S, Schroeter H, Sies H, Kelm M. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46 (7): 1276-83.

Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease. *Circ Res*. 2016; 118(4):535–546.

Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*. 1997; 349(9053):699.

Hertog MG, Hollman PC. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J Clin Nutr*. 1996; 50(2):63-71.

Hertog MG, Hollman PC, van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J Agric. Food Chem*. 1993; 41 (8):1242–1246.

Higashi Y, Oshima T, Ozono R, Watanabe M, Matsuura H, Kajiyama G. Effects of L-arginine infusion on renal hemodynamics in patients with mild essential hypertension. *Hypertension*. 1995; 25: 898–902.

Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*. 1995; 62:1276-1282.

Hollman PC, vd Gaag M, Mengelers MJ, van Trijp JM, de Vries JH, Katan MB. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med*. 1996; 21(5):703-7.

Hong Y-J, Mitchell E. Metabolic profiling of flavonol metabolites in human urine by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2005; 52:6794-680.

Horning B, Drexler H. Endothelial function and bradykinin in humans. *Drugs*. 1997; 54(5): 42-4.

Hu F, Manson J, Stampfer M, Colditz G, Liu S, Solomon C, *et al*. Diet, lifestyle, and the risk of type II diabetes mellitus in women. *N Engl J Med*. 2001; 345:790-797.

Hubbard GP, Wolfram S, de Vos R, Bovy A, Gibbins JM, Lovegrove JA. Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in man: a pilot study. *Br J Nutr*. 2006; 96(3):482-8.

Hubbard GP, Wolfram S, Lovegrove JA, Gibbins JM. Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *J Thromb Haemost*. 2004; 2(12):2138-45.

Hukl, Brovkovich V, Nanobash Vili J, Weigel G, Neumayer C, Partyka L, Patton S, Malinski T. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br J Surg*. 1998; 85(8):1080-5.

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

Ibarra M, Moreno L, Vera R, Cogolludo A, Duarte J, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolite isorhamnetin in isolated arteries from spontaneously hypertensive rats. *Planta Med*. 2003; 69(11):995-1000.

Ibarra M, Pérez-Vizcaino F, Cogolludo A, Duarte J, Zaragoza- Arnáez F, López-López JG, Tamargo J. Cardiovascular effects of isorhamnetin and quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rat atria. *Planta Med*. 2002; 68(4):307-10.

Iglarz M, Clozel M. Mechanisms of ET-1-induced endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007; 50(6):621-8.

Intengan HD and Schiffrin EL. Structure and Mechanical Properties of Resistance Arteries in Hypertension: Role of Adhesion Molecules and Extracellular Matrix Determinants. *Hypertension*. 2000; 36(3): 312-318.

Jackson, MJ. The assessment of bioavailability of micronutrients: introduction. *Eur. J. Clin. Nutr*. 1997; 51: 1-2.

Jaffe E. Physiologic functions of normal endothelial cells. In: *Vascular Medicine. Vascular biology and diseases*. (Eds. Loscalzo J, Creager M, Dzau V). Boston: Little, Brown and Company, 1996; 3-46.

Jalili T, Carlstrom J, Kim S, Freeman D, Jin H, Wu TC, Litwin SE, David SJ. Quercetin-supplemented diets lower blood pressure and attenuate cardiac hypertrophy in rats with aortic constriction. *J. Cardiovasc*. 2006; 47(4):531-41.

Janssen K, Mensink RP, Cox FJ, Harryvan JL, Hovenier R, Hollman PC, *et al*. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an *in vitro* and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr*. 1998; 67:255-262.

Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B, Keppler D. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J.* 1997; 327 (Pt 1):305- 310.

John S, Schmieder RE. Potential mechanisms of impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia. *CurrHypertens Rep.* 2003; 5(3):199-207.

Jugdutt B.J. The role of nitric oxide in heart failure. *Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers.* 2004.

Jumar A and Schmieder RE. Cocoa flavanol cardiovascular effects beyond blood pressure reduction. *Journal of Clinical Hypertension.* 2011; 18: 352–8.

Karaa A, Walid S Kamoun WS, Clemens MG. Oxidative stress disrupts nitric oxide synthase activation in liver endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine.* 2005, 39 (10): 1320–133. Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, Saito S, Murota K, Shibata N, *et al.* Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem.* 2008; 283:9424-9434.

Kawai Y, Saito S, Nishikawa T, Ishisaka A, Murota K, Terao J. Different pro-files of quercetin metabolites in rat plasma: comparison of two administration methods. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009; 73:517–23.

Kawashima S. The two faces of endothelial nitric oxide synthase in the pathophysiology of atherosclerosis. *Endothelium.* 2004; 11(2):99-107.

Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(6):998-1005.

Kay CD. The future of flavonoid research. *Br J Nutr.* 2010; 104 (3):S91-95.

Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: The double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol.* 2001; 41: 851-876.

Key TJ, Allen NE, Spencer EA, Travis RC. The effect of diet on risk of cancer. *Lancet.* 2002; 360:861-868.

Khan NQ, Lees DM, Douthwaite JA, Carrier MJ, Corder R. Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. *Clin Sci (Lond)*. 2002; 103(48):72S-75S.

KhoonNK, White CR, Pozzo-Miller L, Zhou F, Constance C, Inoue T, PatelRP, ParksDA. Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. *Free Radic Biol Med*. 2010; 49(3):339-47.

Kim DH, Jung EA, Sohng IS, Han JA, Kim TH, Han MJ. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch Pharm Res*. 1998; 21(1):17-23.

Kim SB, Lee MJ, Hong JI, et al. Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols. *Nutr Cancer*. 2000; 37:41-48.

Knab AM, Shanely RA, Henson DA, Jin F, Heinz SA, Austin MD, NiemanDC. Influence of quercetin supplementation on disease risk factors in community-dwelling adults. *J Am Diet Assoc*. 2011; 111(4):542-9.

Konig J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1461:377-394.

Kotra G, Daniel H. Flavonoid glycosides are not transported by the human Na⁺/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 322(2):829-35.

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(1):15-21.

Kurtel H, Ghandour S. Endothelins and inflammation: the gastrointestinal system. *Pathophysiology*. 1999; 6:77-89.

La M, Reid JJ. Endothelin-1 and the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1995; 22(5):315-23.

Lahera V, Vázquez-Pérez S, de las Heras N, Cediél E, Navarro-Cid, J, Cachafeiro V. Angiotensina II e hipertensión arterial: consecuencias del antagonismo de sus receptores. *Hipertens. Riesgo Cardiovasc.* 2000; 17: 22-9.

Landete JM. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012; 52(10):936-48.

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, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: Role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation.* 2002; 106: 3073-3078.

Larson AJ, Symons JD, Jalili T. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. *Adv Nutr.* 2012; 3(1):39-46.

Larson A, Witman MA, Guo Y, Ives S, Richardson RS, Bruno RS, et al. Acute, quercetin-induced reductions in blood pressure in hypertensive individuals are not secondary to lower plasma angiotensin-converting enzyme activity or endothelin-1: nitric oxide. *Nutr Res.* 2012; 32:557-64.

Lee AH, Tan L, Hiramatsu N, Ishisaka A, Alfonso H, Tanaka A, Uemura N, Fujiwara Y, Takechi R. Plasma concentrations of coffee polyphenols and plasma biomarkers of diabetes risk in healthy Japanese women. *Nutrition and Diabetes.* 2016; 6: e212.

Lee J, Ebeler SE, Zweigenbaum JA, Mitchell AE. UHPLC-(ESI) QTOF MS/MS profiling of quercetin metabolites in human plasma postconsumption of applesauce enriched with apple peel and onion. *J Agric Food Chem.* 2012; 60:8510-20.

Lee KH, Park E, Lee HJ, Kim MO, Cha YJ, Kim JM, Lee H, Shin MJ. Effects of daily quercetin-rich supplementation on cardiometabolic risks in male smokers. *Nutr Res Pract.* 2011; 5(1):28-33

Lee MY, Griending KK. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10(6):1045-59.

Levine GN, Frei B, Koulouris SN, Gerhard MD, Keaney JF Jr, Vita JA. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1996; 93: 1107– 1113.

Li H, Poulos TL. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem* 2005; 99(1):293-305.

Li J M, Shah A M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; (287): R1014-R1030.

Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380:2224–60.

Lodi F, Jimenez R, Moreno L, Kroon PA, Needs PW, Hughes DA, et al. Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis*. 2009; 204(1):34-39.

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.

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(4):1018-25.

López-López G, Moreno L, Cogolludo A, Galisteo M, Ibarra M, Duarte J, Lodi F, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol*. 2004; 65(4):851-9.

Ludt S, Wensing M, Campbell SM, Ose D, van Lieshout J, Rochon J, Uhlmann L, Szecsenyi J. The challenge of cardiovascular prevention in primary care: implications of a European observational study in 8928 patients at different risk levels. *Eur J Prev Cardiol*. 2014; 21(2):203-13.

Macdonald IA, Mader JA, Bussard RG. The role of rutin and quercitrin in stimulating flavonol glycosidase activity by cultured cell-free microbial

preparations of human feces and saliva. *Mutat Res.* 1983; 122(2):95-102.

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

Maeso R, Rodrigo E, Munoz-Garcia R, Navarro-Cid J, Ruilope L M, Cachofeiro V, Lahera V. Chronic treatment with losartan ameliorates vascular dysfunction induced by aging in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension.* 1998; 16: 665-672.

Maicas Bellido C, Lázaro Fernández J, Alcalá López J, Hernández Simón P, Rodríguez Padial L. Etiología y fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Monocardio.* 2003; 5: 141-160.

Manabe K, Shirahase H, Usui H, Kurahashi K, Fujiwara M. Endothelium-dependent contractions induced by angiotensin I and angiotensin II in canine cerebral artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; (251): 317-320.

Manach C, Morand C, Crespy V, Demigné C, Texier O, Régéat F, Rémésy C Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett.* 1998 Apr 24; 426(3):331-6.

Manach C, Morand C, Demigne C, Texier O, Regerat F, Remesy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett.* 1997; 409:12-16.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5):727-47.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(1):230S-242S.

Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 2003; 83 (1):183-252.

Marunaka Y, Marunaka R, Sun H, Yamamoto T⁷, Kanamura N, Inui T, Taruno A Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure. *Molecules.* 2017; 22(2).

Margetts BM, Beilin LJ, Vandongen R, Armstrong BK. Vegetarian diet in mild hypertension: a randomised controlled trial. *BMJ*. 1986; 239: 1468-1471.

Maruti SS, Chang JL, Prunty JA, Bigler J, Schwarz Y, Li SS, et al. Serumbeta-glucuronidase activity in response to fruit and vegetable supplementation: a controlled feeding study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17: 1808-12.

Masaki T, Yanagisawa F. Physiology and Pharmacology of Endothelins. *Med Res Rev*. 1992; 4:391-441.

Mathiassen ON, Buus NH, Sihm I, Thybo NK, Mørn B, Schroeder AP, Thygesen K, Aalkjaer C, Lederballe O, Mulvany MJ, Christensen KL. Small artery structure is an independent predictor of cardiovascular events in essential hypertension. *J Hypertens*. 2007; 25(5):1021-6.

Maubach J, Bracke ME, Heyerick A, et al. Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by highperformance liquid chromatography. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2003; 784:137-144.

McAnlis GT, McEneny J, Pearce J, Young IS. Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man. *Eur J Clin Nutr*. 1999; 53:92-96.

Menendez C, Dueñas M, Galindo P, González-Manzano S, Jimenez R, Moreno L. Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed? *Mol Nutr Food Res*. 2011; 55:1780-90.

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

Meydani M. Nutrition interventions in aging and age-associated disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 928:226-35.

Michel JB, Thaumat O, Houard X, Meilhac O, Caligiuri G, Nicoletti A, 2007. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2007; 27: 1259-1268.

- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(4):673-751.
- Milne GL, Dai Q, Roberts LJ. The isoprostanes--25 years later. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1851: 433-445
- Miranda KM, MG Espey, DA Wink. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* 2001; 5: 62-71.
- Mitchell J A, de Nucci G, Warner T D, Vane J R. Different patterns of release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. *Br J Pharmacol.* 1992; (105): 485- 489.
- Mollnau H, Wendt M, Katalin Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Mathias Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münze T. Effects of Angiotensin II Infusion on the Expression and Function of NAD(P)H Oxidase and Components of Nitric Oxide/cGMP Signaling. *Circulation Research.* 2002; 90:58- 65.
- Mombouli J V, Vanhoutte P M. Endothelial dysfunction: From physiology to therapy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 1999; (31): 61-74.
- Monfardini C, Veronese FM. Stabilization of substances in circulation. *Bioconjug Chem.* 1998; 9:418-450.
- Moon JH, Nakata R, Oshima S, Inakuma T, Terao J. Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 279: R461-467.
- 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(4):1069-78.
- Morrow J D, Awad J A, Kato T, Takahashi K, Badr K F, Roberts L J, Burk R F. Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation. *J Clin Invest.* 1992; (90): 2502-2507.

Mullen W, Boitier A, Stewart A, Crozier A. Flavonoid metabolites in human plasma and urine after the consumption of red onions: Analysis by liquid chromatography with photodiode array and full scan tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*. 2004;1058: 163-168.

Mullen W, Edwards CA, Crozier A. Absorption, excretion and metabolite pro-filing of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *Br J Nutr*. 2006; 96:107-16.

Mullen W, Graf BA, Caldwell ST, et al. Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-(14) C] quercetin- 4'-glucoside. *J Agric Food Chem*. 2002; 50:6902-6909.

Mullen W, Rouanet JM, Auger C, Teissedre PL, Caldwell ST, Hartley RC, et al. Bioavailability of [2-(14)C]quercetin-4'-glucoside in rats. *J Agric Food Chem*. 2008; 56:12127-12137.

Mulvany MJ. Structural abnormalities of the resistance vasculature in hypertension. *J Vasc Res*. 2003; 40(6):558-60.

Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *The New England Journal of Medicine*. 2006; 355(19): 2003-2011.

Murota K, Terao J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 417:12-17.

Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, Mann NJ, Sinclair AJ. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am J Clin Nutr*. 2003; 77: 1466-1473.

Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. 1994; 269(19):13725-8.

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in

Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106(25):3143-421.

Negre-Salvayre A, Salvayre R. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free Radic Biol Med*. 1992; 12:101-106.

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

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(1):29-42.

O'Brien RF, Robbins RJ, McMurtry IF. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J Cell Physiol*. 1987; 132(2):263-70.

Ohlstein EH, Elliot JD, Feuerstein GZ, Ruffolo R. Endothelin receptors: receptor classification, novel receptor antagonists, and potential therapeutic targets. *Med Res Rev*. 1996; 16(4): 365-390.

O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM, Williamson G. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multiresistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem Pharmacol*. 2003; 65:479- 491.

O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Sly WS, O'Brien NM, Williamson G. Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase. *FEBS Lett*. 2001; 503(1):103-106.

Olthof MR, Hollman PC, Vree TB, Katan MB. Bioavailabilities of quercetin-3- glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J Nutr*. 2000; 130:1200- 1203.

Palmer R M, Ashton D S, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988; 333: 664-666.

Pang J, Zhang Z, Zheng TZ, Bassig BA, Mao C, Liu X, Zhu Y, Shi K, Ge J, Yang YJ, DeJia-Huang, Bai M, Peng Y. Green tea consumption and risk of cardiovascular and ischemic related diseases: a meta-analysis. *International Journal of Cardiology*. 2016; 202: 967-74.

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

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

Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Flavonols and cardiovascular disease. *Mol Aspects Med.* 2010; 31(6):478-494.

Pérez-Vizcaíno F, Duarte J, Jiménez R, Santos-Buelga C, Osuna A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep.* 2009; 61: 67-75.

Pérez-Vizcaíno F, Duarte J, Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: Effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res.* 2006; 40(10):1054-65.

Pérez-Vizcaíno F, Duarte J, Santos-Buelga C. The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *J Sci Food Agric.* 2012; 92:1822–5.

Pérez-Vizcaíno F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnáez F, Moreno L, López-López G, Tamargo J. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 302(1):66-72.

Pietta P, Simonetti P, Roggi C, et al. Dietary flavonoids and oxidative stress. In: Kumpulainen JT, Salonen JT, eds. Natural antioxidants and food quality in atherosclerosis and cancer prevention. London: Royal Society of Chemistry. 1996:249-255.

Pignatelli P, Di Santo S, Buchetti B, Sanguigni V, Brunelli A, Violi F. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J.* 2006; 20(8):1082-9.

Piskula MK. Factors affecting flavonoids absorption. *Biofactors* 2000; 12: 175-180.

Plotnick GD, Correti MC, Vogel RA, Hesslink R, Wise JA. Effect of Supplemental Phytonutrientes on Impairment of the Flow-Mediated Brachial Artery Vasoactivity After a Single High-Fat Meal. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41(10):1744-9.

Plumb GW, Price KR, Rhodes MJ, Williamson G. Antioxidant properties of the major polyphenolic compounds in broccoli. *Free Radic Res.* 1997; 27(4):429-35.

Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Kim JA, Quon MJ, Montagnani M. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 292: E1378-E1387.

Punithavathi VR, Prince PS. Pretreatment with a combination of quercetin and alphatocopherol ameliorates adenosine triphosphatases and lysosomal enzymes in myocardial infarcted rats. *Life Sci.* 2009; 86:178-184.

Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp.* 2012; 27 (1): 76-89.

Reshef N, Hayari Y, Goren C, Boaz M, Madar Z, Knobler H. Antihypertensive effect of sweetie fruit in patients with stage I hypertension. *Am J Hypertens.* 2005; 18(10):1360-3.

Rhian M Touyz and Ana M Briones. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension Research.* 2011; 34: 5-14.

Rijke YB, Demacker PN, Assen NA, Sloots LM, Katan MB, Stalenhoef AF. Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoproteins in volunteers. *Am J Clin Nutr.* 1996; 63(3):329-34.

Rivera L, Morón R, Sánchez M, Zarzuelo A, Galisteo M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring).* 2008; 16(9):2081-7.

Rizzoni, D., Porteri, E., Boari, G.E.M., De Ciuceis, C., Sleiman, I., Muiesan, M.L., Castellano, M., Miclini, M., Agabiti-Rosei, E. Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation.* 2003; 108: 2230-2235.

Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Tiberio G, Giulini SM, Rossi G, Bernini G, Agabiti-Rosei E. Endothelial dysfunction in hypertension is independent from the etiology and from vascular structure. *Hypertension.* 1998; 31: 335-41.

Rodríguez Artalejo F, Banegas Banegas JR, de Oya Otero M. Diet and cardiovascular disease. *Med Clin (Barc).* 2002; 119(5):180-8.

Romero M, Jiménez R, Hurtado B, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, López-Sepúlveda R, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaíno F, Tamargo J, Vargas F, Duarte J. Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2010; 627(1-3):242-50.

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(1):58-67.

Romero J C, Lahera V, Salom M G, Biondi M L. Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J Am Soc Nephrol.* 1992; (2): 1371-1387.

Rosendorff C. Endothelin, vascular hypertrophy, and hypertension. *Cardiovascular Drugs and Therapy.* 1997(10):795-802

Rubanyi G M, Vanhoutte P M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986; 250: H822-H827.

Sacco RL, Roth GA, Reddy KS, Arnett DK, Bonita R, Gaziano TA, Heidenreich PA, Huffman MD, Mayosi BM, Mendis S, Murray CJ, Perel P, Piñeiro DJ, Smith SC Jr, Taubert KA, Wood DA, Zhao D, Zoghbi WA. The Heart of 25 by 25: Achieving the Goal of Reducing Global and Regional Premature Deaths From Cardiovascular Diseases and Stroke: A Modeling Study From the American Heart Association and World Heart Federation *Circulation.* 2016; 133(23):674-90.

Sagach V, Bondarenko A, Bazilyuk O, and Kotsuruba A. Endothelial dysfunction: Possible mechanisms and ways of correction. *Exp Clin Cardiol.* 2006; 11(2): 107-110.

Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, Katan MB. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc.* 2002; 102:1414-1420.

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(1):75-84.

Santos RM, Lima DR. Coffee consumption, obesity and type 2 diabetes: a mini-review. *European Journal of Nutrition.* 2016; 55: 1345-58.

- Saremi A, Arora R. Vitamin E and cardiovascular disease. *Am J Ther.* 2010; 17(3):e56-65.
- Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother.* 2002; 56(6):276-82.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 2000; 130(8S):2073S-85S.
- Schächinger V, Zeiher AM. Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction. *Z Kardiol.* 2000; 89(9):70-74.
- Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation.* 2000; 101:1653-1659.
- Schramm D, Collins H, German B. Flavonoid transport by mammalian endothelial cells. *J Nutr Biochem.* 1999;10:193-197.
- 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 USA* 2006; 103: 1024-1029.
- Schwingshackl L, Boeing H, Stelmach-Mardas M, Gottschald M, Dietrich S, Hoffmann G, Chaimani A. Dietary Supplements and Risk of Cause-Specific Death, Cardiovascular Disease, and Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Primary Prevention Trial. *Adv. Nutr.* 2017; 8(1):27-39.
- Scottburden T, Vanhoutte P M. The Endothelium As A Regulator of Vascular SmoothMuscle Proliferation. *Circulation.* 1993; (87): 51-55.
- Serafini M, Ghiselli A, Ferroluzzi A. Red wine, tea, and antioxidants. *Lancets.* 1994; 344: 626.
- Serban MC, Sahebkar A, Zanchetti A, Mikhailidis DP, Howard G, Antal D, Andrica F, Ahmed A, Aronow WS, Muntner P, Lip GY, Graham I, Wong N, Rysz J, Banach M. Lipid and Blood Pressure Meta-analysis Collaboration (LBPMC) Group. Effects of Quercetin on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc.* 2016; 5(7): e002713.

Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr.* 2001; 131(4):1362S-75S.

Shimokawa H. Williams Harvey Lecture: importance of coronary vasomotion abnormalities-from bench to bedside. *Eur. Heart J.* 2014; 35:3180–3193.

Shukla P, Lemley CO, Dubey N, Meyer AM, O'Rourke ST, Vonnahme KA. Effect of maternal nutrient restriction and melatonin supplementation from mid to late gestation on vascular reactivity of maternal and fetal placental arteries. *Placenta.* 2014; 35:461–6.

Shutenko Z, Henry Y, Pinard E, Seylaz J, Potier P, Berthet F, Girard P, Sercombe R Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57(2):199-208.

Silberberg M, Morand C, Manach C, Scalbert A, Remesy C Co-administration of quercetin and catechin in rats alters their absorption but not their metabolism. *Life Sci.* 2005; 77(25):3156-67.

Suri S, Liu XH, Rayment S, Hughes DA, Kroon PA, Needs PW, Taylor MA, Tribolo S, Wilson VG. Quercetin and its major metabolites selectively modulate cyclic GMP-dependent relaxations and associated tolerance in pig isolated coronary artery. *Br J Pharmacol.* 2010; 159(3):566-75.

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(10):1050-5.

Su JB. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J Cardiol.* 2015 26; 7(11): 719-74.

Taddei S, Vanhoutte P M. Role of endothelium in endothelin-evoked contractions in the rat aorta. *Hypertension.* 1993; 21: 9-15.

Tauber AI, Fay JR, Marletta MA. Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Biochem Pharmacol.* 1984; 33(8):1367-9.

Taubert D, Berkels R, Klaus W, Roesen R. Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant

phenols: essential structural features. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002; 40:701-713.

Terao J. Factors modulating bioavailability of quercetin-related flavonoids and the consequences of their vascular function. *Biochem Pharmacol.* 2017; 139:15-23.

Terao J, Murota K, Kawai Y. Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo. *Food Funct.* 2011; 2:11-7.

Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1996; 97: 22-28.

Tostes RC, Fortes ZB, Callera GE, Montezano AC, Touyz RM, Webb RC, Carvalho MH. Endothelin, sex and hypertension. *Clin Sci (Lond).* 2008; 114(2):85-97.

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. *CircRes.* 2002; 90(11):1205-13.

Touyz RM, Gang H, Mohammed EM, Quy D, Vartan M, Schiffrin EL. Differential activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 and p38 mitogen activated-protein kinase by AT1 receptors in vascular smooth muscle cells from WistarKyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2001; 19:553-559.

Turnbull F. Effects of different blood- pressure lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively- designed overviews trials. *Lancet.* 2003; 362 (9395): 1527-35.

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

Valgimigli M, Merli E, Malagutti P, Soukhomovskaia O, Cicchitelli G, Macri G, Ferrari R. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. *Arch Biochem Biophys.* 2003; (420): 255 261.

Van Acker SA, Tromp MN, Haenen GR, van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *BiochemBiophys Res Commun.* 1995; 214(3):755-9.

Van de Woude H, Boersma M, Vervoort J, Rietjens I. Identification of 14 quercetin phase II mono and mixed conjugates and their formation by rat and human phase II in vitro model systems. *Chem Res Toxicol.* 2004; 17:1520-1530.

Van Hoorn DEC, Van Norren K, Boelens PG, Nijveldt RJ. Biological activities of flavonoids. *Science and Medicine.* 2003; 9 (3), 152-161.

Vanhoutte PM. Other endotheliumderived vasoactive factors. *Circulation.* 1993; 87:V9-V17.

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res.* 2003; 37:121-127.

Vázquez-Pérez S, Navarro-Cid J, las Heras N, Cediél E, Sanz-Rosa D, Ruilope L M, Cachofeiro V, Lahera V. Relevance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the effects of hypertension on rat coronary relaxations. *Journal of Hypertension.* 2001; (19): 539-545.

Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Meta-Analysis of Primary Prevention Trials. Lancet.* 2003; 361(9374):2017-23

Vlachopoulos C, Tsekoura D, Alexopoulos N, Panagiotakos D, Aznaouridis K, Stefanadis C. Type 5 phosphodiesterase inhibition by sildenafil abrogates acute smoking-induced endothelial dysfunction. *Am J Hypertens* 2004; 17(11 Pt 1):1040-4.

Waldman H M, Alter I, Kot P A, Rose J C, Ramwell P W. Effect of lung transit on systemic depressor responses to arachidonic acid and prostacyclin in dogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1978; 204: 289-293.

Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr.* 2005; 135:48-52.

Wan LL, Xia J, Ye D, Liu J, Chen J, Wang G. Effects of quercetin on gene and protein expression of NOX and NOS after myocardial ischemia and reperfusion in rabbit. *Cardiovasc Ther.* 2009; 27:28-33.

Wang CZ, Mehenale SR, Calway T, Yuan CS. Botanical flavonoids on coronary heart disease. *Am J Chin Med.* 2011; 39(4):661-71.

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

Weber MA, Schiffrin EL, White WB, Mann S, Lindholm LH, Kenerson JG, Flack JM, Carter BL, Materson BJ, Ram CVC, Cohen DL, Cadet JC, Jean-Charles RR, Taler S, Kountz D, Townsend RR, Chalmers J, Ramirez AJ, Bakris GL; Wang J, Schutte AE, Bisognano JD, Touyz RM, Sica D, Harrap SB. Clinical Practice Guidelines for the Management of Hypertension in the Community A Statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. *The Journal of Clinical Hypertension.* 2013; 17 (16):14-26.

Wiczowski W, Romaszko J, Bucinski A, Szawara-Nowak D, Honke J, Zielinski H, Piskula MK. Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. aggregatum) is more bioavailable than its glucosides. *J Nutr.* 2008; 138(5):885-8.

Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42(7):1149-60.

Williams B, Lindholm LH, Sever P. Systolic pressure is all that matters. *Lancet.* 2008; 371:2219-21.

Williams S P, Dorn G W, Rapoport R M. Prostaglandin I₂ mediates contraction and relaxation of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1994; (267): H796-H803.

Williamson G, Barron D, Shimo K, Terao J. In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. *Free Radic Res.* 2005a; 39(5):457-69.

Williamson G, Day AJ, Plumb GW, Couteau D. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem Soc Trans.* 2000; 28(2):16-22.

Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81: 243S-255S.

Williamson G, Plumb GW, Uda Y, Price KR, Rhodes MJ. Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the

anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalclc7 cells. *Carcinogenesis*. 1996; 17(11):2385-7.

Woo HD, Kim J. Dietary flavonoid intake and smoking-related cancer risk: ameta-analysis. *PLoS ONE*. 2013; 8:e75604.

Wu K K, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med*. 1996; (47): 315-331

Yamamoto Y, Oue E. Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006; 70(4):933-9.

Yang MY, Huang CN, Chan KC, Yang YS, Peng CH, Wang CJ. Mulberry Leaf Polyphenols Possess Antiatherogenesis Effect via Inhibiting LDL Oxidation and Foam Cell Formation. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 1985-1995.

Yildiz A, Oflaz H, Pusuroglu H, Mercanoglu F, Genchallac H, Akkaya V, Ikizler TA, Sever MS. Left ventricular hypertrophy and endothelial dysfunction in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2003; 41:616-623.

Yoshizumi M, Tsuchiya K, Suzaki Y, Kirima K, Kyaw M, Moon JH, Terao J, Tamaki T Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 293(5):1458-65.

Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29:51-60.

Zahedi M, Ghiasvand R, Feizi A, Asgari G, Darvish L. Does quercetin improve cardiovascular risk factors and inflammatory biomarkers in women with type 2 diabetes: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Int J Prev Med*. 2013; 4: 777-785

Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont FJ, Díez J. Oxidative Stress in Arterial Hypertension Role of NAD(P)H Oxidase. *Hypertension*. 2001; 38: 1395-1399.

Zhang D, Cogswell ME, Wang G, Bowman BA. Evidence of Dietary Improvement and Preventable Costs of Cardiovascular Disease. *Am J Cardiol*. 2017; 17:31241-9

Zhao X, Gu Z, Attele AS, Yuan CS. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *JEthnopharmacol.* 1999; 67(3):279-85.