

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



**Polifenoles del vino tinto y alteraciones  
vasculares inducidas por endotelina-1.**

**Tesis Doctoral para aspirar  
al Grado de Doctor que presenta la  
Licenciada Dña. Rocío López Sepúlveda**

**2010**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Rocío López Sepúlveda  
D.L.: GR 3083-2010  
ISBN: 978-84-693-3302-0





UNIVERSIDAD  
DE  
GRANADA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

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

Certifica: que la Tesis Doctoral titulada “Polifenoles del vino tinto y alteraciones vasculares inducidas por endotelina-1”, ha sido realizada por la Licenciada en Farmacia Dña. Rocío López Sepúlveda, en los laboratorios de este Departamento.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 7 de abril de 2010.

Dr. Julio Gálvez Peralta





UNIVERSIDAD  
DE  
GRANADA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

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

Certifican: que la Tesis Doctoral titulada “Polifenoles del vino tinto y alteraciones vasculares inducidas por endotelina-1”, presentada por la Licenciada en Farmacia Dña. Rocío López Sepúlveda, reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 7 de abril de 2010.

Dr. Juan Manuel Duarte Pérez

Dra. Rosario Jiménez Moleón



***Abreviaturas empleadas.***

|                       |   |             |   |
|-----------------------|---|-------------|---|
| <b>Aa</b>             | Aminoácido.                                     | <b>DAD</b>  | Detector Diode Array.   |
| <b>Ach</b>            | Acetilcolina.                                   | <b>DAG</b>  | Diacilglicerol.   |
| <b>Akt</b>            | Proteín kinasa B.                               | <b>DAPI</b> | Dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol.                       |
| <b>AMPc</b>           | Adenosín monofosfato cíclico.                   | <b>DHE</b>  | Dihidroetidio.  |
| <b>Ang II</b>         | Angiotensina II.                                | <b>DMSO</b> | Dimetilsulfóxido.   |
| <b>Apo</b>            | Apocinina.                                      | <b>DNA</b>  | Ácido desoxirribonucleico                                       |
| <b>BH<sub>4</sub></b> | Tetrahidrobiopterina.                           | <b>DOC</b>  | Desoxicortecosterona.   |
| <b>Big-ETs</b>        | Endotelinas de 37-41 aminoácidos.               | <b>DOCA</b> | Acetato de deoxicortecosterona                                  |
| <b>CAT</b>            | Catalasa.                                       | <b>DPI</b>  | Difeniléniodonio.   |
| <b>cDNA</b>           | DNA complementario.                             | <b>DTT</b>  | Ditiotreitilol.   |
| <b>CMLV</b>           | Células Del músculo liso vascular               | <b>ECE</b>  | Enzima convertidora de endotelina.                              |
| <b>COX</b>            | Ciclooxigenasa.                                 | <b>EDTA</b> | Ácido etilendiamino tetracético.                                |
| <b>c-Src</b>          | Tirosín kinasa independiente de receptor c-Src. | <b>EGTA</b> | Ácido etilenglicol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético. |
| <b>CuZn-SOD</b>       | SOD dependiente de cobre y cinc.                | <b>eNOS</b> | Óxido nítrico sintasa endotelial.                               |



## *Abreviaturas*

---

|                |   |                                   |  |
|----------------|---|-----------------------------------|--|
| <b>ER</b>      | receptor estrogênico.                               | <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Peróxido de hidrógeno.                         |
| <b>ERK 1/2</b> | Kinasas reguladas por señales extracelulares 1/2.   | <b>HPLC</b>                       | Cromatografía líquida de alta resolución.      |
| <b>ETs</b>     | Endotelinas.  | <b>HTA</b>                        | Hipertensión arterial.                         |
| <b>ET-1</b>    | Endotelina 1.                                       | <b>HUVEC</b>                      | Células endoteliales de vena umbilical humana. |
| <b>ET-2</b>    | Endotelina 2.                                       | <b>ICAM-1</b>                     | Molécula de adhesión intrecelular-1.           |
| <b>ET-3</b>    | Endotelina 3.                                       | <b>IGF</b>                        | Factor de crecimiento de insulina.             |
| <b>FCDE</b>    | Factores contractores derivados de endotélio.       | <b>IP<sub>3</sub></b>             | Inositol trifosfato.                           |
| <b>FCVE</b>    | Factor de crecimiento vascular endotelial.          | <b>JNK</b>                        | Kinasa c-jun-NH <sub>2</sub> -terminal.        |
| <b>FHDE</b>    | Factor hiperpolarizante derivado de endotélio       | <b>LDL</b>                        | Lipoproteínas de baja densidad.                |
| <b>GMPc</b>    | Guanosín monofosfato cíclico.                       | <b>L-NAME</b>                     | N <sup>o</sup> -nitro-L-arginina metil éster.  |
| <b>GPX</b>     | Glutation peroxidasa.                               | <b>M</b>                          | Molar.   |
| <b>GSH</b>     | Glutation.  | <b>MAPKs</b>                      | Proteín kinasas activadas por mitógeno.        |
| <b>GST</b>     | Glutation S-transferasa.                            | <b>MDA</b>                        | Malonildialdehido.                             |
| <b>HEPES</b>   | Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico. | <b>MLCK</b>                       | Kinasa de cadenas ligeras de miosina.          |

---

|                                  |  |                        |  |
|----------------------------------|--|------------------------|--|
| <b>MPMs</b>                      | Metaloproteasas de matriz.               | <b>PGI<sub>2</sub></b> | Prostaciclina.   |
| <b>MT1-MPM</b>                   | Metaloproteinasa de membrana tipo 1.     | <b>PKB</b>             | Proteín kinasa B = Akt.  |
| <b>Mn-SOD</b>                    | SOD dependiente de manganeso.            | <b>PKC</b>             | Proteín kinasa C.  |
| <b>mRNA</b>                      | Ácido ribonucleico mensajero.            | <b>PMA</b>             | 12-miristato 13-acetato forbol.                                |
| <b>NADPH</b>                     | Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato. | <b>PMSF</b>            | Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo.                             |
| <b>NF-κβ</b>                     | Factor de transcripción nuclear κβ.      | <b>PPAR</b>            | Receptor para el activador de la proliferación de peroxisomas. |
| <b>NO</b>                        | Óxido nítrico.                           | <b>PAS</b>             | Presión arterial sistólica.                                    |
| <b>NOS</b>                       | Óxido nítrico sintasa.                   | <b>PVDF</b>            | Fluoruro de polivinilideno.                                    |
| <b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> | Radical superóxido.                      | <b>Rac-1</b>           | Proteína G de bajo peso molecular Rac 1.                       |
| <b>OH<sup>-</sup></b>            | Radical hidroxilo.                       | <b>RNA</b>             | Ácido ribonucleico.  |
| <b>ONOO<sup>-</sup></b>          | Peroxinitrito.                           | <b>ROS</b>             | Especies reactivas de oxígeno.                                 |
| <b>OVX</b>                       | Ratas ovariectomizadas.                  | <b>r.p.m.</b>          | Revoluciones por minuto.                                       |
| <b>PEG-SOD</b>                   | Polietilenglicol-SOD                     | <b>RT-PCR</b>          | Transcriptasa inversa-reacción de la polimerasa en cadena.     |
| <b>PGs</b>                       | Prostaglandinas.                         | <b>RWPs</b>            | Polifenoles del vino tinto.                                    |

## *Abreviaturas*

---

|                      |   |                                |   |
|----------------------|---|--------------------------------|---|
| <b>SAPK/<br/>JNK</b> | Proteína kinasa activada por estrés/c-Jun N-terminal kinasa =JNK. | <b>TBS-T</b>                   | Tampón Tris salino tamponado al 0,1% de Tween 20. |
| <b>SDS</b>           | Dodecilsulfato sódico.  | <b>TGF-<math>\beta</math></b>  | Factor de crecimiento transformante $\beta$ .     |
| <b>SEM</b>           | Error estándar de la media  | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Factor de necrosis tumoral $\alpha$ .             |
| <b>SHR</b>           | Rata espontáneamente hipertensa.                                  | <b>TRIS</b>                    | Tris (hidroximetil) aminometano.                  |
| <b>SNC</b>           | Sistema nervioso central.   | <b>TXA<sub>2</sub></b>         | Tromboxano A <sub>2</sub> .                       |
| <b>SOD</b>           | Superóxido dismutasa.   | <b>VCAM-1</b>                  | Molécula de adhesión a células vasculares 1.      |
| <b>SP-SHR</b>        | Rata espontáneamente hipertensa con tendencia a infarto cerebral. | <b>XO</b>                      | Xantina oxidasa.                                  |
| <b>SRA</b>           | Sistema renina angiotensina.                                      | <b>WKY</b>                     | Ratas Wistar Kyoto.                               |
| <b>TBARS</b>         | Substancias reactivas del ácido tiobarbitúrico.                   |                                |   |

**Índice.**

---



---

|   |    |
|---|----|
| <b>INTRODUCCIÓN</b>   | 1  |
| <b>1. Polifenoles del vino tinto</b>  | 3  |
| <b>1.2. Evidencias epidemiológicas de la protección cardiovascular</b>                                      | 3  |
| <b>1.3. Efectos cardioprotectores de los polifenoles del vino tinto (RWPs, <i>Red Wine Polyphenols</i>)</b> | 6  |
| <b>1.3.1. Efectos antioxidantes</b>   | 7  |
| - <i>Efectos sobre las subunidades de la NADPH oxidasa</i>  | 8  |
| - <i>Efectos sobre las lipoproteínas de baja densidad</i>   | 9  |
| - <i>Efecto prooxidante</i>   | 10 |
| <b>1.3.2. Efectos sobre las lipoproteínas de alta densidad</b>  | 10 |
| <b>1.3.3. Efectos sobre las células del músculo liso vascular</b>   | 11 |
| - <i>Efectos sobre la proliferación y la migración</i>  | 11 |
| - <i>Efectos sobre la angiogénesis</i>  | 13 |
| - <i>Efectos sobre el FCVE</i>  | 14 |
| <b>1.3.4. Efectos sobre la agregación plaquetaria</b>   | 15 |
| <b>1.3.5. Efectos sobre la función endotelial</b>   | 16 |
| - <i>Los polifenoles inducen incremento de la expresión de eNOS</i>   | 17 |
| - <i>Los polifenoles inducen un incremento en la actividad de la eNOS</i>                                   | 18 |
| - <i>Papel del Ca<sup>2+</sup> intracelular</i>   | 19 |
| - <i>Papel de la vía PI3kinasa/Akt</i>  | 19 |
| - <i>Los RWPs inducen relajación mediada por FHDE</i>   | 20 |
| - <i>Los RWPs inducen una mayor liberación de prostaciclina de células endoteliales</i>                     | 20 |
| - <i>Los RWPs inducen inhibición de la síntesis endotelial de ET-1</i>                                      | 21 |
| - <i>Efectos de los RWPs sobre la producción de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)</i>              | 22 |

|   |    |
|---|----|
| -Efectos de los RWP <sub>s</sub> sobre el receptor estrogénico (ER, Estrogenic Receptor) $\alpha$ en el endotelio | 23 |
| 1.3.6. Efectos antihipertensivos  | 23 |
| 1.4. Biodisponibilidad y metabolismo de los RWP <sub>s</sub>  | 27 |
| <b>2. Hipertensión DOCA-sal o hipertensión Volumen dependiente</b>  | 30 |
| 2.1. Generalidades de la hipertensión DOCA-sal  | 30 |
| 2.2. Patogénesis de la hipertensión DOCA-sal  | 31 |
| 2.3. Alteraciones anatomopatológicas de la hipertensión DOCA-sal  | 32 |
| 2.4. Reactividad Vacular en la hipertensión DOCA-sal  | 33 |
| 2.5. Estrés oxidativo e hipertensión DOCA-sal   | 36 |
| <b>3. Hipertensión SHR (<i>Spontaneously Hypertensive Rats</i>)</b>   | 38 |
| 3.1. Generalidades de la hipertensión SHR   | 38 |
| 3.2. Patogénesis de la hipertensión SHR   | 39 |
| 3.3. Alteraciones anatomopatológicas de la hipertensión SHR   | 40 |
| 3.4. Reactividad Vascul <sup>ar</sup> en la hipertensión SHR  | 42 |
| 3.5. Estrés oxidativo e hipertensión SHR  | 43 |
| <b>4. Endotelina-1</b>  | 46 |
| 4.1. Biosíntesis, regulación y lugares de generación  | 46 |
| 4.2. Receptores de ET-1   | 49 |
| 4.3. Disfunción endotelial y ET-1   | 52 |
| <b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>  | 55 |
| <b>JUSTIFICATION AND AIMS</b>   | 63 |

---

|  |    |
|--|----|
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>  | 71 |
| <b>1. Estudios <i>in vivo</i></b>  | 73 |
| <b>1.1. Polifenoles objeto de estudio</b>  | 73 |
| <b>1.2. Animales y grupos experimentales</b>   | 74 |
| <b>1.2.1. Experimento I: Efectos de los RWPs sobre la hipertensión DOCA-sal</b>                          | 74 |
| <b>1.2.2. Experimento II: Efectos de los RWPs sobre ratas SHR con deficiencia estrogénica</b>            | 76 |
| <b>1.3. Medida de la presión arterial</b>  | 76 |
| <b>1.4. Parámetros morfológicos</b>  | 77 |
| <b>1.5. Determinaciones plasmáticas (experimento I)</b>  | 77 |
| <b>1.5.1. Determinación del nivel de peroxidación lipídica</b>   | 77 |
| <b>1.5.2. Determinación de los niveles de ET-1</b>   | 78 |
| <b>1.5.3. Niveles de polifenoles en plasma</b>   | 78 |
| <b>1.6. Determinaciones en orina</b>   | 79 |
| <b>1.6.1. Determinación de 8-iso-prostaglandina (iso-PG) F<sub>2α</sub></b>                              | 79 |
| <b>1.6.2. Proteinuria</b>  | 79 |
| <b>1.7. Detección <i>in situ</i> de la producción vascular de O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>             | 80 |
| <b>1.8. Actividad NADPH oxidasa (experimento I)</b>  | 81 |
| <b>1.9. Western blot</b>   | 82 |
| <b>1.10. Reacción en cadena de la polimerasa</b>   | 84 |
| <b>1.11. Estudios de reactividad vascular</b>  | 85 |
| <b>1.12. Reactivos</b>   | 87 |
| <b>1.13. Análisis estadístico</b>  | 87 |
| <b>2. Estudios <i>in vitro</i>. Efectos de los RWPs sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1</b> | 88 |



|   |     |
|---|-----|
| <b>2.1. Polifenoles objeto de estudio</b>   | 88  |
| <b>2.2. Animales de experimentación</b>   | 88  |
| <b>2.3. Procedimiento general de la técnica y preparación del tejido</b>                      | 88  |
| <b>2.4. Estudios de reactividad vascular</b>  | 89  |
| <b>2.5. Detección <i>in situ</i> de la producción vascular de O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>   | 91  |
| <b>2.6. Actividad NADPH oxidasa</b>   | 91  |
| <b>2.7. Western Blot</b>  | 92  |
| <b>2.8. Reacción en cadena de la polimerasa</b>   | 93  |
| <b>2.9. Reactivos</b>   | 93  |
| <b>2.10. Análisis estadístico</b>   | 93  |
| <br>  |     |
| <b>RESULTADOS</b>   | 95  |
| <b>1. Efectos de los RWP's sobre la hipertensión DOCA-sal.</b>                                | 97  |
| <b>1.1. Efectos sobre la presión arterial.</b>  | 97  |
| <b>1.2. Efectos sobre las variables morfológicas y la proteinuria.</b>                        | 98  |
| <b>1.3. Efectos sobre la concentración de polifenoles en plasma.</b>                          | 99  |
| <b>1.4. Efectos sobre los niveles plasmáticos de ET-1.</b>                                    | 100 |
| <b>1.5. Efectos sobre el estrés oxidativo sistémico.</b>                                      | 101 |
| <b>1.6. Efectos sobre la producción vascular <i>in situ</i> de O<sub>2</sub><sup>-</sup>.</b> | 102 |
| <b>1.7. Efectos sobre la actividad NADPH oxidasa.</b>   | 104 |
| <b>1.8. Efectos sobre la expresión génica y proteica de subunidades de la NADPH oxidasa.</b>  | 105 |
| <b>1.9. Efectos sobre la función endotelial ex vivo.</b>                                      | 106 |
| <br>  |     |
| <b>2. Efectos de los RWP's sobre ratas SHR ovariectomizadas.</b>                              | 108 |
| <b>2.1. Efectos sobre la presión arterial.</b>  | 108 |
| <b>2.2. Efectos sobre las variables morfológicas.</b>   | 109 |
| <b>2.3. Efectos sobre el estrés oxidativo sistémico.</b>                                      | 110 |

---

|   |     |
|---|-----|
| 2.4. Efectos sobre la producción <i>in situ</i> de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> en aorta de rata.  | 110 |
| 2.5. Efectos sobre la expresión génica y proteica de eNOS, caveolina-1, p47 <sup>phox</sup> , p22 <sup>phox</sup> y receptor AT-1 en aorta de rata. | 112 |
| 2.6. Efectos sobre la reactividad aórtica <i>ex vivo</i> .  | 116 |
| <b>3. Efectos del RWP sobre la disfunción endotelial provocada por ET-1 <i>in vitro</i>.</b>  | 119 |
| 3.1. Efectos sobre la disfunción endotelial.  | 119 |
| 3.2. Efectos sobre la producción de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .   | 122 |
| 3.3. Efectos sobre la actividad NADPH oxidasa.  | 124 |
| 3.4. Efectos sobre la expresión génica y proteica de p47 <sup>phox</sup> , p22 <sup>phox</sup> , eNOS, y caveolina-1.                               | 125 |
| 3.5. Papel del receptor estrogénico y del receptor activado por el proliferador de peroxisoma.  | 126 |
| 3.6. Papel de las Kinasas reguladas por señales extracelulares.   | 128 |
| 3.7. Papel protector de polifenoles aislados de la mezcla de RWPs frente a la disfunción endotelial inducida por ET-1.                              | 129 |
| <b>DISCUSIÓN</b>  | 131 |
| 1. Efectos preventivos de los RWPs sobre la hipertensión DOCA-sal.  | 133 |
| 2. Efectos de los RWPs en SHR ovariectomizadas.   | 139 |
| 3. Efectos de los RWPs sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1.  | 143 |
| <b>CONCLUSIONES</b>   | 149 |
| <b>CONCLUSIONS</b>  | 153 |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   | 157 |



## **FIGURAS**

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 1.</b> Efectos agudos dependientes de endotelio de los polifenoles.   | 26  |
| <b>Figura 2.</b> Síntesis, regulación y acciones vasculares de ET-1.  | 51  |
| <b>Figura 3.</b> Componentes de la mezcla polifenólica utilizada para los experimentos.   | 73  |
| <b>Figura 4.</b> Efectos del tratamiento crónico con RWPs (A) o apocinina (B) sobre la evolución en el tiempo de la presión arterial sistólica, medida por pletismografía en los diferentes grupos del experimento I.   | 97  |
| <b>Figura 5.</b> Efectos del tratamiento crónico con RWPs o apocinina sobre los niveles plasmáticos de ET-1 en los diferentes grupos del experimento I.   | 100 |
| <b>Figura 6.</b> Efectos del tratamiento crónico con RWPs o apocinina sobre los niveles plasmáticos de MDA (A) y la excreción urinaria de iso-PGF2 $\alpha$ en 24 horas (B) en los diferentes grupos del experimento I.   | 101 |
| <b>Figura 7.</b> Efectos del tratamiento crónico con RWPs o apocinina en la producción de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> en anillos aórticos de los diferentes grupos del experimento I. (A) Microfotografías mostrando la localización in situ de la producción de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> en anillos aórticos y el efecto de los RWPs y la apocinina sobre la producción vascular de radicales superóxido mediante DHE y DAPI. (B) Valores promedio de la fluorescencia roja del etidio normalizada respecto a la fluorescencia azul del DAPI. | 103 |

**Figura 8.** (A) Efectos de los RWPs y la apocinina sobre la actividad NADPH oxidasa medida por luminiscencia con lucigenina en anillos aórticos de los diferentes grupos del experimento I y (B) en homogenados de cultivos celulares de músculo liso vascular. 104

**Figura 9.** Expresión vascular genética y proteica de subunidades de la NADPH oxidasa. (A) productos representativos de RT-PCR (p22phox y p47phox) de RNA total extraído de arterias de los diferentes grupos del experimento I. (B) Expresión proteica de p47phox total en anillos aórticos de los diferentes grupos del experimento I. 105

**Figura 10.** Efectos del tratamiento crónico con RWPs o apocinina en la función vascular de los diferentes grupos del experimento I. Curva concentración-respuesta relajante a acetilcolina (A y B) y a NPS (C y D) en anillos aórticos precontraídos con noradrenalina con o sin endotelio, respectivamente. 107

**Figura 11.** Efectos del tratamiento crónico con RWPs sobre la evolución en el tiempo de la presión arterial sistólica medida por pletismografía en la cola en los diferentes grupos del experimento II. 108

**Figura 12.** Efectos de los RWPs en la excreción urinaria de iso-PGF<sub>2α</sub> en 24 horas en los diferentes grupos del experimento II. 110

**Figura 13.** Efectos de los RWPs en la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en anillos aórticos de los diferentes grupos del experimento II. (A) Microfotografías mostrando la localización in situ de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en anillos aórticos y el efecto de los RWPs sobre la producción vascular de radicales superóxido mediante 111

DHE y DAPI. (B) Valores promedio de la fluorescencia roja del etidio normalizada respecto a la fluorescencia azul del DAPI.

**Figura 14.** Efectos de los RWPs en la expresión de eNOS (A y B) y caveolina-1 (C y D) a nivel de mRNA por RT-PCR (A y C) y proteico por Western blot (B y D) en los diferentes grupos del experimento II. 113

**Figura 15.** Efectos de los RWPs en la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa p22phox (A y B) y p47phox (C y D) a nivel de mRNA por RT-PCR (A y C) y proteico por Western blot (B y D) en los diferentes grupos del experimento II. 114

**Figura 16.** Efectos de los RWPs sobre la expresión del receptor AT-1 a nivel de mRNA por RT-PCR (A) y proteico por Western blot (B) y en la respuesta vasoconstrictora aórtica a Ang II en anillos aórticos (C) de los diferentes grupos del experimento II. 115

**Figura 17.** Efectos de los RWPs en la respuesta relajante vascular inducida por Ach (A) o NPS (B) en aortas precontraídas con fenilefrina en los diferentes grupos del experimento II. 116

**Figura 18.** Efectos de los RWPs en las respuestas contráctiles vasculares inducidas por fenilefrina en ausencia (A) o presencia (B) de L-NAME en los diferentes grupos del experimento II. 117

**Figura 19.** Efectos de los RWPs (A) o de la apocinina (B) sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1 en anillos aórticos de rata. Curva concentración-respuesta relajante a acetilcolina en anillos aórticos precontraídos con 120

fenilefrina.

**Figura 20.** Efecto de los RWPs en la respuesta relajante a NPS en anillos aórticos de rata, incubados con ET-1, desprovistos de endotelio y precontraídos con fenilefrina. 121

**Figura 21.** Efectos de los RWPs en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en anillos incubados con ET-1 durante 4 horas. (A) Microfotografías mostrando la localización in situ de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en anillos aórticos y el efecto de los RWPs sobre la producción vascular de radicales superóxido mediante DHE y DAPI. (B) Valores promedio de la fluorescencia roja del etidio normalizada respecto a la fluorescencia azul del DAPI. 123

**Figura 22.** Efectos de los RWPs sobre la actividad NADPH oxidasa en anillos incubados con ET-1. 124

**Figura 23.** Efectos de los RWPs en la expresión de p22phox (A y E), p47phox (B y E), eNOS (C y E) y caveolina-1 (D y E) a nivel de mRNA por RT-PCR (A y C) y proteico por Western blot de p47phox (F) en anillos incubados con ET-1. 125

**Figura 24.** Papel del receptor estrogénico (ER) (A) y del receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR)  $\gamma$  (B) sobre el efecto protector de los RWPs en la disfunción endotelial inducida por ET-1 en anillos aórticos de rata. 127

**Figura 25.** Efectos de los RWPs sobre la fosforilación de kinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2) inducida por ET-1. 128

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 26.</b> Efectos de epicatequina (A), catequina (B) y resveratrol (C) sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1 en anillos aórticos de rata. Respuesta relajante vascular inducida por Ach en aortas precontraídas con fenilefrina. | 130 |
|---|-----|

## **TABLAS**

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 1.</b> Peso corporal y de órganos. Índices cardíaco y renal. Proteinuria. Experimento I.        | 98  |
| <b>Tabla 2.</b> Peso corporal y de órganos. Índices cardíaco y renal. Experimento II.                    | 109 |
| <b>Tabla 3.</b> Parámetros de las curvas concentración-respuesta a factores vasoactivos. Experimento II. | 118 |





## **Introducción.**

---



## **1. Polifenoles del vino tinto.**

El consumo de dietas ricas en frutas y verduras ha demostrado, tanto en estudios epidemiológicos como de intervención, que reduce la morbi-mortalidad cardiovascular (Lorgeril *et al.*, 1999, Broekmans *et al.*, 2001). Por ello, la American Heart Association recomienda la ingesta de frutas y verduras como parte del tratamiento de los pacientes en riesgo de cardiopatía isquémica (National Cholesterol Education Program, 2002). El efecto beneficioso de estas dietas se ha atribuido, al menos en parte, a la presencia de polifenoles. Varios estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo habitual y moderado de vino, concretamente de vino tinto, presenta efectos beneficiosos sobre la morbilidad y mortalidad cardiovascular (Frankel *et al.*, 1993, Maxwell *et al.*, 1994, Aviram *et al.*, 2002). El vino tinto es rico en compuestos polifenólicos (flavonoides, antocianos, estilbenos y ácidos hidroxicinámicos), principales candidatos para explicar su efecto cardioprotector. Se ha sugerido que los compuestos polifenólicos presentes en el vino podrían ser los responsables de la paradoja francesa, es decir, de la menor tasa de mortalidad por cardiopatía isquémica que se observa en Francia, a pesar de su elevado consumo de grasas saturadas (St Leger *et al.*, 1979, Truelsen *et al.*, 1998).

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

Estudios epidemiológicos nos indican que el consumo bajo o moderado de bebidas alcohólicas reduce la mortalidad (de Lorimier, 2000). Un consumo de alcohol en exceso es uno de los principales factores de riesgo de hipertensión y la segunda causa más importante de pérdida de años de vida ajustados por discapacidad en el mundo (López *et al.*, 2006). Sin embargo, el consumo moderado de alcohol muestra un efecto protector contra varias enfermedades cardiovasculares (Athiros *et al.*, 2008). Varios son los mecanismos que ayudan a explicar el efecto cardioprotector del consumo moderado de bebidas alcohólicas, uno de esos mecanismos implica la habilidad del alcohol para incrementar los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Schroder *et al.*, 2005), otro implicaría la capacidad del alcohol para actuar mediante mecanismos

antitrombóticos (Wannamethee *et al.*, 2003), habiendo una relación inversa entre los niveles de fibrinógeno y el consumo de alcohol. Por último, también hay estudios que demuestran efectos antiaterogénicos (Femia *et al.*, 2006).

En un reciente estudio de cohortes se ha observado un incremento significativo del riesgo de hipertensión sólo con el consumo de cerveza, licores y vino blanco, mientras que el consumo de vino tinto no mostró ningún efecto significativo (Sesso *et al.*, 2008). Este estudio está en la misma línea que otro publicado muy reciente llevado a cabo en nuestro país (Núñez-Córdoba *et al.*, 2009), donde se evaluó la relación entre el tipo, la cantidad y la frecuencia de bebida alcohólica y la incidencia de hipertensión. El estudio de Seguimiento Universidad de Navarra (SUN), es una cohorte prospectiva de graduados universitarios en España. En esta cohorte prospectiva mediterránea, el consumo total de alcohol pero no el patrón de consumo (días de consumo/semana) se asoció de manera clara con el riesgo de hipertensión. Por otro lado, se observó que los individuos con preferencia por cerveza y licores tenían un riesgo de hipertensión mayor que quienes mostraban preferencia por el vino tinto.

Estos resultados sostienen la hipótesis de que hay un efecto beneficioso del vino tinto en comparación con otras bebidas alcohólicas, en particular, el consumo de vino tinto está inversamente asociado con la mortalidad por enfermedad cardiovascular (Gronbaek, 2002), y los efectos protectores se observan a partir de un consumo de 300 mL vino al día (Rotondo *et al.*, 2001). Esto se ha visto incluso en pacientes con problemas cardiovasculares como aclaró el estudio “Lyon Diet Heart”, que se inició en 1988 y supuso una oportunidad única para examinar la asociación entre el consumo de vino y el riesgo de complicaciones cardiovasculares en una cohorte homogénea de hombres franceses de mediana edad que hacía 2 meses que habían sufrido un infarto agudo de miocardio (de Lorgeril *et al.*, 1999). Este estudio mostró que el consumo moderado de vino tinto se asoció con una reducción significativa del riesgo de complicaciones cardiovasculares en estos pacientes (de Lorgeril *et al.* 2002).

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

Se tienen noticias de observaciones de este fenómeno ya en 1819, cuando Samuel Black atribuyó efectos beneficiosos al hábito francés de consumir vino tinto con las comidas, mientras que el primer estudio científico lo publicó Cabot en 1904. La primera comparación sobre la mortalidad por enfermedad coronaria en países donde preferentemente se consumía vino frente a aquéllos donde se consumía cerveza tuvo lugar 75 años después. St. Leger *et al.*, (1979) fueron los primeros en demostrar una fuerte relación inversa entre el consumo del vino y la mortalidad por la enfermedad cardíaca isquémica basada en datos epidemiológicos de 18 países americanos y europeos desarrollados. Sus resultados fueron confirmados por análisis retrospectivos posteriores (Criqui y Ringel 1994). Paralelamente, se demostró que en las poblaciones de Francia y Suiza, a pesar de existir una distribución similar de factores de riesgo coronarios tales como presión arterial alta, hipercolesterolemia, alto índice de masa corporal y tabaquismo, la mortalidad por enfermedad cardíaca coronaria era más baja en comparación a otros países industrializados. Estos resultados fueron correlacionados positivamente con una ingesta elevada de vino en los países mencionados (Renaud *et al.*, 1992), fundamentando la llamada “paradoja francesa”.

Renaud *et al.*, (1992) introdujeron dicho término para subrayar la baja tasa de mortalidad por enfermedad isquémica cardíaca en Francia a pesar de la alta cantidad de grasas saturadas en su dieta, lo que usualmente se asocia con un incremento en la mortalidad por enfermedad cardíaca coronaria (Renaud *et al.*, 1992, Howard *et al.*, 2002, Saucier *et al.*, 1999, Araim *et al.*, 2002.). Atribuyeron este hecho inusual al consumo de vino tinto basándose en los descubrimientos del proyecto MONICA

(MONItoring system for CARdiovascular disease), un programa organizado por la Organización Mundial de la Salud. Investigadores de 21 países estudiaron a más de 7 millones de hombres y mujeres (entre 35 y 64 años de edad) de 37 poblaciones mayoritariamente europeas durante un periodo de 10 años, desde mediados de los 80 hasta mediados de los 90. Los investigadores observaron una tasa de mortalidad por enfermedad cardíaca coronaria menor en Francia comparado con el Reino Unido y los Estados Unidos, a pesar del alto consumo de grasas saturadas y de unos niveles de colesterol en plasma similares. Además, otros factores de riesgo como la presión sanguínea, el índice de masa corporal y el consumo de tabaco en Francia eran similares a lo que había en otros países industrializados (Woodward *et al.*, 1999). Aunque Francia e Italia habían reducido a la mitad su consumo de vino respecto de los años sesenta, y la media en el momento del proyecto era de 67 y 57 L/persona/año, respectivamente, aun así estos países seguían teniendo una ingesta mucho mayor a la del Reino Unido y los Estados Unidos, donde el consumo se hallaba entre 12 y 5 L/persona/año, respectivamente (Yarnell y Evans 2000).

### **1.3. Efectos cardioprotectores de los polifenoles del vino tinto (RWPs, *Red Wine Polyphenols*).**

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

### 1.3.1. Efectos antioxidantes

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

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

De acuerdo con estos resultados, Diebolt *et al.*, (2001) demostraron que el efecto relajante de los compuestos polifenólicos del vino tinto implican un mecanismo sensible a captadores de anión  $O_2^-$  y Schuldt *et al.*, (2000) expusieron que los polifenoles eran capaces de captar radicales libres del oxígeno dentro de un límite, lo que llevaba a un incremento en los niveles de NO. Aunque varios autores han visto que los compuestos polifenólicos con efecto antioxidante y aquellos con efecto vasorrelajante difieren en estructura, los RWPs pueden poseer tanto propiedades antioxidantes como vasorrelajantes.

Nigdikar *et al.*, (1998) demostraron que el vino blanco podía tener efectos prooxidantes, esto nos lleva a la conclusión de que es el vino tinto, y no el blanco, el que tiene una importante actividad antioxidante por el alto contenido en polifenoles. Con lo que, aunque el alcohol pueda contribuir al efecto cardioprotector, el principal efecto protector viene de los polifenoles. Todo esto demostraría por qué un extracto fenólico sin alcohol obtenido de vino tinto puede tener efectos similares al vino tinto en sí.



Un problema contra la hipótesis de los efectos beneficiosos antioxidantes de los polifenoles en enfermedades vasculares es que compuestos con idénticas propiedades antioxidantes tienen diferentes efectos. Sin embargo, esto podría explicarse por la capacidad de algunos polifenoles de activar enzimas antioxidantes o de inhibir enzimas como la 15-lipoxigenasa, el citocromo p450, la mieloperoxidasa (Fuhrman *et al.*, 2001), la xantina oxidasa y la nicotinamín adenín dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Nijveldt *et al.*, 2001; Orallo *et al.*, 2002), enzimas que pueden generar grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*).

*Efectos sobre las subunidades de la NADPH oxidasa.*

La NADPH oxidasa está considerada como el mayor sistema enzimático productor de  $O_2^{\cdot-}$  en la vasculatura. El incremento de la producción vascular de  $O_2^{\cdot-}$  a través del sistema NADPH oxidasa se ha visto implicado como un factor importante en la patogénesis de aterosclerosis y enfermedad coronaria arterial (Sorescu *et al.*, 2002, Jaimes *et al.*, 2004, Vendrov *et al.*, 2007). Recientemente, se ha informado del incremento en la expresión de p47phox en el endotelio vascular en humanos adultos obesos o con sobrepeso, lo que se ha relacionado con las alteraciones vasculares que acompañan a esta patología (Silver *et al.*, 2007). Se ha visto que en modelos animales de hipertensión inducida por angiotensina II (Ang II), polifenoles contenidos en el vino tinto, previenen la sobreexpresión de las subunidades de la NADPH oxidasa: p22phox y p47phox (Sarr *et al.*, 2006, Sánchez *et al.*, 2007). Este grupo recientemente (Romero *et al.*, 2009) ha demostrado que la endotelina (ET)-1 activa la NADPH oxidasa mediante la sobreexpresión de la subunidad p47phox en ratas, lo que contribuía a una mayor producción de  $O_2^{\cdot-}$ . La quercetina, uno de los polifenoles presentes en el vino tinto, era capaz de prevenir dicho aumento en la producción vascular de  $O_2^{\cdot-}$  reduciendo la sobreexpresión de esa subunidad.

La protein kinasa C (PKC) es una enzima fundamental para la activación de la NADPH oxidasa (el Benna *et al.*, 1994) ya que es la responsable de fosforilar la p47phox, paso limitante para que la NADPH oxidasa se active. Otra posible vía para disminuir la actividad de la NADPH oxidasa consistiría pues en inhibir la actividad PKC y son varios los autores que haciendo estudios en plaquetas han descrito polifenoles con esta capacidad (Pignatelli *et al.*, 2006, Nardini *et al.*, 2000). La ET-1 es un potente estimulador de la PKC (Takenaka *et al.*, 1993), en el mismo estudio ya mencionado de Romero *et al.*, (2009) se vio como la quercetina reducía de manera significativa el incremento en la actividad PKC producido por ET-1, previniendo de este modo el aumento en la producción de  $O_2^{\cdot-}$ .

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

Se ha visto que el consumo de vino (Fuhrman *et al.*, 1995), de RWP (Nigdikar *et al.*, 1998) o mosto de uva tinta (Stein *et al.*, 1999) incrementa la capacidad antioxidante del plasma y reduce la oxidabilidad de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low Density Lipoproteins*) circulantes. La oxidación de las LDL es un proceso clave en la aterogénesis (Sumpio *et al.*, 2004), con lo que resulta de gran importancia cómo los polifenoles reducen la sensibilidad de las LDL a la peroxidación. Hubo un estudio (Fuhrman *et al.*, 1995) en el que los sujetos consumieron 375 mL/día de vino tinto (cabernet sauvignon) durante 2 semanas y se cuantificaron las LDL y los polifenoles en plasma observándose una reducción del 20% en la tendencia del plasma sanguíneo a sufrir peroxidación en sujetos sanos. La ingestión a corto plazo de mosto de uva mostró una reducción en la susceptibilidad de las LDL a oxidarse en pacientes con enfermedad coronaria (Stein *et al.*, 1999).

En hámsters, los polifenoles del vino y el mosto de uva redujeron las concentraciones plasmáticas de lípidos (Vinson *et al.*, 2001), lo que concuerda con estudios en humanos (Stein *et al.*, 1999). Sin embargo, la reducción de la oxidabilidad de las LDL tras la suplementación dietética con polifenoles del vino no se ha visto en

todos los estudios realizados, a pesar del aumento de la capacidad antioxidante del plasma (Carbonneau *et al.*, 1997). Fenoles como el ácido cafeico podrían también actuar como agentes citoprotectores contra la apoptosis de células endoteliales, bloqueando las señales que generan las LDL oxidadas (Vieira *et al.*, 1998).

*Efecto prooxidante.*

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

Además, estas respuestas se redujeron por antioxidantes, como la N-acetilcisteína y análogos permeables a la membrana de la superóxido dismutasa (SOD), como la Mn (III)-tetrakis(1-metil-4-piridil) porfirina (MnTMPyP) y la polietilenglicol-SOD (PEG-SOD). Sin embargo, no están afectadas por la SOD, la catalasa o la PEG-catalasa. Además, el Difeniléniodonio (DPI, *Diphenyleneiodonium*) un inhibidor de enzimas flavín dependientes, redujo la relajación mediada por FHDE. Hay que añadir que los RWPs indujeron la formación de  $O_2^-$  en un cultivo de células endoteliales y que esta producción era sensible a MnTMPyP, como se vio en experimentos de microscopía confocal usando el colorante fluorescente hidroetidina (Ndiaye *et al.*, 2003a, b).

**1.3.2. Efectos sobre las Lipoproteínas de alta densidad.**

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High Density Lipoproteins*) previenen la acumulación de colesterol en células periféricas y protegen frente a aterosclerosis transportando el colesterol de las arterias al hígado para su posterior metabolismo y excreción. El consumo de alcohol incrementa los niveles de HDL y podría explicar, al menos en parte, el efecto protector del vino (Renaud *et al.*, 1992, Nigdikar *et al.*, 1998, Perret *et al.*, 2002, Araya *et al.*, 2001). Informes previos (Fuhrman *et al.*, 1995), en los

cuales hombres sanos recibieron 400 mL/día de vino durante 2 semanas, mostraron un incremento de las HDL con la ingesta de vino tinto, pero no con la de vino blanco, indicando una posible implicación de los RWPs en este efecto.

Aunque algunos estudios en animales han demostrado efectos positivos tras la suplementación con polifenoles derivados de uva libres de alcohol (Martín-Carrón *et al.*, 1999, Martín-Carrón *et al.*, 2000, Araya *et al.*, 2001), en estudios en humanos no se ha observado un incremento claro en las HDL (Naissides *et al.*, 2006, Avellone *et al.*, 2006). Sin embargo, Castilla *et al.*, (2006) estudiaron a veintiséis pacientes en hemodiálisis y 15 sujetos sanos que consumieron 100 mL de zumo de uva tinta al día durante 14 días. Como resultado observaron la mejora del perfil lipídico en respuesta al zumo con disminución de los niveles de LDL y un incremento en los niveles de HDL. Por lo tanto, aunque el etanol tiene un claro efecto incrementando las HDL, el incremento visto en estas lipoproteínas por el consumo de vino tinto puede deberse también al componente polifenólico.

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

#### *Efectos sobre la proliferación y la migración.*

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

observaron que el vino tinto y los RWPs inhibían la proliferación de CMLV de manera dosis-dependiente.

Los efectos antiproliferativos del vino tinto en CMLV pueden conllevar varias vías, como por ejemplo retardando el ciclo celular en la fase S de la mitosis (Ragione *et al.*, 1998, Park *et al.*, 2001). El mecanismo de esta acción no está del todo claro, pero se sabe que en presencia de iones de cobre, el resveratrol puede causar rotura de la hebra de DNA (Fukuhara *et al.*, 1998), se une al DNA celular y forma complejos con el Cu (II) reduciéndolo a Cu (I). Esto lleva a la producción de ROS que actúan como agentes que rompen el DNA. Por ello, la actividad antiproliferativa del resveratrol podría verse incrementada por el consumo de vino tinto, ya que el vino tinto es una importante fuente alimentaria de Cu.

Otro mecanismo potencial es el que implica a la ciclina A, un regulador del ciclo celular que juega un papel crítico en la replicación del DNA en la transición de la fase G1 a la S, también en la fase S y de la fase G2 a la M. Una regulación a la baja de la expresión génica de ciclina A se piensa que puede contribuir a los efectos antiproliferativos de los compuestos polifenólicos del vino tinto mediante la inhibición de la expresión de factores de transcripción (Iijima *et al.*, 2002).

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

El vino tinto representa una fuente de polifenoles como las proantocianidinas. Se informó que un extracto de proantocianidinas extraído de semillas de uva disminuyó la expresión de VCAM-1 inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF, *Tumor Necrosis Factor*) - $\alpha$  en células primarias endoteliales umbilicales humanas, lo que llevó

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

Hay estudios que han mostrado que la quercetina inhibe la proliferación e hipertrofia de CMLV en cultivos celulares. Así, los efectos inhibidores de quercetina sobre la síntesis de ADN, en CMLV estimuladas con TNF- $\alpha$ , parecen estar relacionados con una menor actividad de kinasas reguladas por señales extracelulares (ERK, *Extracelular signal-Regulated Kinases*) 1/2 (una kinasa importante en la proliferación y diferenciación celulares) (Moon *et al.*, 2003).

#### *Efectos sobre la angiogénesis.*

La angiogenesis es un proceso complejo caracterizado por la degradación de la matriz extracelular, predominantemente por metaloproteinasas, seguido de migración y proliferación de células endoteliales y la maduración de nuevos vasos sanguíneos en respuesta a factores pro-angiogénicos locales como el factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE).

Las gelatinasas, las metaloproteinasas de matriz (MPM)-2 y MPM-9, degradan la mayoría de los tipos de colágeno y han sido identificadas como las MPM más expresadas en los vasos sanguíneos y en las placas ateroscleróticas (Galis and Khatri, 2002; Pasterkamp *et al.*, 2000). La MPM-2 se secreta continuamente desde células vasculares como un precursor inactivo pro-MPM-2, que pasa a ser la forma activa de MPM-2 en la superficie por acción de una MPM de membrana, en particular, por la MPM de membrana tipo 1 (MT1-MPM). Potentes activadores fisiológicos de MPM-2 son la trombina y la plasmina. Hay estudios que indican que los RWPs previenen de manera efectiva la activación de MPM-2 inducida por trombina en células del músculo

liso vascular (El Bedoui *et al.*, 2004). Este efecto está relacionado con su habilidad para inhibir la actividad MT1-MPM de manera reversible (El Bedoui *et al.*, 2004). El efecto inhibitorio se observa a concentraciones a partir de 3 mg/l de RWPs. La catequina y la epicatequina no tuvieron tal efecto sobre la activación de MPM-2 y la actividad de MT1-MPM en este estudio (El Bedoui *et al.*, 2004). Sin embargo, la catequina previno la activación de MPM-2 dependiente de MT1-MPM en células cancerígenas (Annabi *et al.*, 2002). La habilidad de los RWPs para prevenir la degradación de la matriz también ha sido demostrada en un ensayo de invasión celular, y este efecto resultó igual de claro que el que se observó con el inhibidor de MPM de amplio espectro N-[(2R)-2-(hidroxamidocarbonilmetil)-4-metilpentanoil]-1-triptofan metilamida, GM6001 (El Bedoui *et al.*, 2004).

Hay muy pocos estudios acerca de las propiedades anti-angiogénicas de los RWPs *in vivo*, pero se ha visto que reducen la vascularización de la membrana corioalantoidea (Maiti *et al.*, 2003).

#### *Efectos sobre el FCVE.*

FCVE es un factor pro-angiogénico que estimula la migración y la proliferación de células endoteliales y también estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos tanto *in vitro* como *in vivo* (Ferrara y Davis-Smyth, 1997).

Los factores de crecimiento son potentes activadores fisiológicos de la expresión de FCVE en CMLV. Se sabe que los RWPs a concentraciones a partir de 3 mg/l (Oak *et al.*, 2003a) previenen la expresión y la liberación de FCVE. La activación de los factores de crecimiento, activa a su vez la vía p38MAPK, llevando a la expresión génica de FCVE y los RWPs son capaces de prevenir la activación de estos factores de crecimiento. Este efecto de los RWPs también lo reproducen los antocianos delphinidina y cianidina, pero no el resveratrol o la epicatequina (Oak *et al.*, 2003b).

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

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

En un modelo de arteria coronaria canina estenosada y de daño en la capa íntima (Demrow *et al.*, 1995), la administración de vino tinto vía intravenosa o intragástrica, en una dosis de 1,6 y 4,0 mL/Kg, respectivamente, eliminó las reducciones de flujo cíclicas en el flujo sanguíneo coronario por la formación periódica de trombos agudos mediados por plaquetas. Lo realmente interesante de este estudio es que el mismo efecto se observó con la administración de cantidades mayores de zumo de uva tinta, pero no con el vino blanco, sugiriendo que los polifenoles, que están presentes en más altos niveles en el vino tinto y en el mosto que en el vino blanco, son la razón para esas propiedades inhibitorias plaquetarias. Esto último está en concordancia con los estudios que determinaron que la ingesta de zumo de uva en sujetos humanos redujo la agregación plaquetaria inducida por colágeno, ADP y forbol 12-miristato 13-acetato. Esta ingesta también generó un incremento en la liberación de NO derivado de plaquetas y una disminución en la producción de  $O_2^-$  (Freedman *et al.*, 2001, Keevil *et al.*, 2000).

Los experimentos *in vitro* demuestran que quercetina incrementa los niveles plaquetarios de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y guanósín monofosfato cíclico (GMPc) provocando una disminución en los niveles de calcio citosólico y en los niveles de actividad plaquetaria. También se sabe que la quercetina potencia la acción de la prostaglandina (PG)  $I_2$  y que esto incrementa los niveles de AMPC (Pace-Asciak *et al.*, 1995). Se ha visto que el resveratrol también es capaz de inhibir en un 41,9% la agregación plaquetaria a partir de una concentración de 1,2  $\mu$ g/l (Bertelli *et al.*, 1995).



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

La absorción intestinal y el metabolismo de los polifenoles de plantas son un paso limitante para los efectos de esta clase de compuestos. Una ingesta de 100 mL de vino tinto por parte de voluntarios sanos causa un incremento de unos 3 mg/l en el contenido total de fenoles en plasma (Duthie *et al.*, 1998). Por tanto, el efecto vasorrelajante de los polifenoles en arterias aisladas es compatible con las concentraciones que se alcanzan en sangre en humanos.

Se han realizado varios estudios en pacientes y en animales sobre los efectos hemodinámicos de la administración aguda y crónica de extractos de uvas y vino. En individuos sanos, la velocidad de flujo coronario se ve incrementada 30 min después de la ingesta de vino tinto (1 g/Kg de etanol) pero no tras la ingesta de vino blanco o vodka (Shimada *et al.*, 1999). También, se ha observado por ultrasonografía en arteria braquial humana una mejora de la vasodilatación dependiente de endotelio tras la ingesta de 500 mL de vino sin alcohol tinto o blanco (Hashimoto *et al.*, 2001). La ingesta de zumo de uva durante 14 días también se ha asociado a una mejora de la vasodilatación dependiente de endotelio (Stein *et al.*, 1999).

Fitzpatrick *et al.*, (1995) describieron por primera vez que el vino tinto y las uvas producen un efecto vasodilatador dependiente de endotelio, que parece estar mediado por el incremento de la síntesis de NO y/o aumento de su actividad biológica. Estudios posteriores han confirmado la participación del NO en los efectos vasodilatadores de los polifenoles del vino (Andriambelison *et al.*, 1997, Andriambelison *et al.*, 1999, Duarte *et al.*, 2004). También se ha descrito que estos compuestos incrementan la producción de otros agentes vasodilatadores como el FHDE (Ndiaye *et al.*, 2003, Duarte *et al.*, 2004) y las prostaciclinas (Schramm *et al.*, 1997) e inhiben la síntesis del péptido vasoconstrictor, ET-1, en células endoteliales aórticas bovinas por supresión de la transcripción del gen de la ET-1.

*Los polifenoles inducen incremento de la expresión de NO sintasa endotelial.*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Papel de la vía PI3kinasa/Akt*

En células endoteliales de aorta bovina un extracto de vino tinto produjo un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  que llevó a relajaciones mediadas por NO. En arterias coronarias porcinas se vieron reducidas dichas relajaciones por inhibidores de la PI3 kinasa (wortmannin) (Ndiaye *et al.*, 2003 a, b). Estos polifenoles indujeron una fosforilación sustancial de la protein kinasa B (Akt) y de la eNOS en la Ser177 en células endoteliales, cosa que no sucedió en presencia de los inhibidores de la kinasa PI3 (Ndiaye *et al.*, 2003 a, b). En conjunto, estos datos demuestran que, en células endoteliales de arteria coronaria porcina, los RWPs inducen la activación de la vía PI3kinasa/Akt causando fosforilación de la eNOS y resultando en un incremento en la formación de NO. Una característica de este mecanismo alternativo para activar la eNOS es que lleva a una activación rápida y duradera del enzima (Ndiaye *et al.*, 2003a, b).

*Los RWPs inducen relajación mediada por FHDE.*

La primera demostración de una participación de FHDE en los mecanismos de relajación vascular inducida por polifenoles tuvo lugar en arterias coronarias aisladas porcinas (Ndiaye *et al.*, 2003 a, b). En este estudio, se vio que los compuestos polifenólicos del vino tinto en concentraciones de 1 a 100 mg/l, causan relajaciones dependientes de endotelio e hiperpolarización de las CMLV con un efecto máximo a 100 mg/l.

Estas relajaciones eran resistentes a los inhibidores de la NOS y la ciclooxigenasa (COX). Estas relajaciones se asociaron a hiperpolarizaciones dependientes de endotelio de CMLV, y eran abolidas por la combinación de dos toxinas, charibdotoxina (un inhibidor de canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de intermedia y larga conductancia y algunos canales de K<sup>+</sup> voltaje dependientes) y apamina (un inhibidor selectivo de un inhibidor de canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de pequeña conductancia). De hecho, estas dos toxinas abolen la hiperpolarización endotelial que normalmente se transmite a través de las CMLV, suprimiendo de este modo la relajación mediada por FHDE en CMLV (Busse *et al.*, 2002; Griffith, 2004).

En el apartado 1.3.1. vimos que estos efectos se redujeron con antioxidantes, análogos de SOD permeable a membranas, y DPI, el inhibidor de enzimas con grupos flavín. Esto muestra que dichos polifenoles producen una relajación mediada por FHDE relacionada con mecanismos pro-oxidantes.

*Los RWPs inducen una mayor liberación de prostaciclina de células endoteliales.*

Las procianidinas, oligómeros de 3-flavanoles (subclase de flavonoides), de semillas de *Vitis vinifera L.* provocaron una relajación concentración y endotelio-dependiente en arteria interna mamaria humana aislada, con un efecto vasorrelajante máximo a 50 µM. Este efecto se redujo de manera significativa (casi el 50 %) incubando los anillos con indometacina, un inhibidor de la COX, indicando la implicación de algún prostanoides. Además, en estos vasos, las procianidinas

estimularon, de manera concentración dependiente con un efecto máximo entre 25 y 50  $\mu\text{M}$ , la liberación de prostaciclina medida mediante la evaluación de la concentración de 6-keto-prostaglandin- $\text{F}_{1\alpha}$  en el medio del baño de órganos (Aldini *et al.*, 2003).

Parece que los polifenoles de la subclase 3-flavanol, podrían, mediante la alteración de la síntesis de eicosanoides, inhibir la activación de plaquetas y los procesos inflamatorios que contribuyen a estados patológicos. Puesto que las relajaciones dependientes de endotelio producidas por las procianidinas fueron totalmente suprimidas por la inhibición de la vía NO-GMPc, se piensa que el NO podría estar involucrado en la activación de la COX (Aldini *et al.*, 2003).

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

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

El resveratrol disminuye fuertemente la secreción de ET-1 por fuerzas de cizallamiento, es capaz también de disminuir sus niveles de mRNA y la actividad del promotor de ET-1 en HUVEC, en parte, interfiriendo con la vía de la ERK 1/2 mediante la disminución de la formación de ROS (Liu *et al.*, 2003). Se ha visto que resveratrol y quercetina, a concentraciones de 0,1-50  $\mu\text{M}$ , son capaces de inhibir la liberación de ET-1 en células endoteliales umbilicales humanas cultivadas (Zhao *et al.*, 1999). Broncel *et al.*, (2010), han demostrado recientemente que la administración crónica de

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

En un estudio randomizado y controlado por placebo en 12 hombres sanos (Loke *et al.*, 2008) el tratamiento con 200 mg de quercetina mostró una reducción significativa en la producción sistémica de ET-1, mientras que la administración de 200 mg de (-)-epicatequina mostró una disminución significativa en plasma pero no orina. En estudios previos la quercetina había mostrado una disminución en la producción de ET-1 en HUVEC estimuladas con trombina de manera dosis dependiente con una IC<sub>50</sub> de 1,54 mol/L (Zhao *et al.*, 1999).

Por tanto, la inhibición de la síntesis de ET-1 puede representar uno de los mecanismos por los que los polifenoles restablecen el equilibrio que se pierde en situaciones patológicas entre los factores vasodilatadores y vasoconstrictores derivados de endotelio. De este modo previenen el desarrollo de hipertensión o de fallo cardiaco.

*Efectos de los RWP sobre la producción de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>).*

La Ach puede generar contracciones dependientes de endotelio en aorta de rata, éstas se asocian a un incremento en los factores contractores derivados de endotelio (FCDE). Estos FCDE son metabolitos del ácido araquidónico generados a través de la vía de la COX, como el TXA<sub>2</sub>, que activa los receptores TP en CMLV (Vanhoutte *et al.*, 2005) y provoca vasoconsticción. Hay descubrimientos recientes que demuestran que los RWP son capaces de prevenir la disfunción endotelial en modelos de hipertensión inducida por Ang II, sobre todo por prevenir la expresión vascular de COX-1 y COX-2 y de este modo disminuir la consecuente formación de TXA<sub>2</sub> (Kane *et al.*, 2009).

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

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

### **1.3.6. Efectos antihipertensivos.**

Se sabe que la administración oral de un extracto de piel de uva (*Vitis labrusca*) reduce significativamente la presión sistólica, media y diastólica en el modelo acetato de deoxicorticosterona (DOCA)-sal (Soares De Moura *et al.*, 2002). En estudios previos de este grupo se comprobó que la quercetina era capaz de reducir el incremento en la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR, *Spontaneously Hypertensive Rats*) (Sánchez *et al.*, 2006) y Pecháňová *et al.* (2004) aportaron evidencias de que la



administración oral de RWPs prevenía el incremento en la presión sanguínea así como los cambios estructurales y funcionales en ventrículo izquierdo y aorta de ratas sujetas a inhibición crónica de la síntesis de NO. Además, en el último estudio mencionado, estos polifenoles fueron capaces de prevenir el engrosamiento de la aorta, atenuaron el incremento de la reactividad aórtica a noradrenalina y previnieron la disminución en la relajación a Ach dependiente de endotelio. La administración oral de RWPs produce incluso una disminución de la presión sanguínea en ratas normotensas, y este efecto hemodinámico se asoció con un aumento en la relajación dependiente de endotelio y aumentó la expresión de los genes de NOS inducible y de COX 2 en la pared arterial (Diebolt *et al.* 2001).

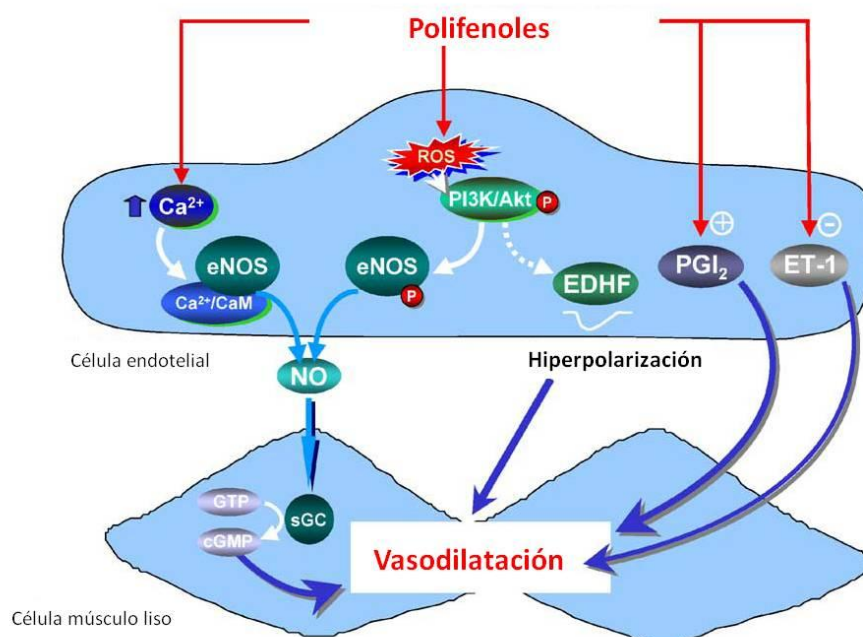
En general, en varios modelos experimentales, la hipertensión se caracteriza por un incremento en el estrés oxidativo (Kuneš *et al.*, 2004, Gomez-Amores *et al.*, 2007, Pedro-Botet *et al.*, 2000). Se ha informado de la capacidad de compuestos polifenólicos contenidos en el vino tinto, como la quercetina, de reducir los valores de malonildialdehído (MDA) en plasma y en orina (marcador de la peroxidación y el estrés oxidativo) en ratas SHR (Duarte *et al.* 2001a, b, Duthie *et al.* 1998). Pecháňová *et al.*, (2004) documentaron un incremento en el estrés oxidativo en el ventrículo izquierdo, en aorta, en cerebro y en riñón en ratas tratadas con L-NAME. Este aumento se previno parcial o completamente cuando simultáneamente al L-NAME se administró a las ratas RWPs. Estos datos sugieren que la reducción en el estrés oxidativo contribuye al efecto antihipertensivo de estos compuestos polifenólicos en distintos modelos de hipertensión.

El cambio hemodinámico más importante para el mantenimiento de la hipertensión es el incremento de las resistencias periféricas totales. Folkow relacionó estos incrementos de la resistencia vascular y de la reactividad con las alteraciones que tienen lugar en la arquitectura de la pared vascular (Folkow, 1978, Folkow *et al.*, 1958). Demostró que las alteraciones en la estructura vascular consisten en el engrosamiento de la túnica media hacia el lumen, que disminuye su diámetro, y en el consiguiente

aumento de la relación existente entre el grosor de la capa media y el diámetro del lumen (media/lumen). Estos cambios han sido confirmados posteriormente por otros autores en pequeñas arterias subcutáneas procedentes de la región glútea (Schiffrin *et al.*, 1992, Izzard *et al.*, 1991, Korsgaard *et al.*, 1991, Aalkjaer *et al.*, 1987). El tratamiento con RWPs previno parcialmente el incremento en la síntesis proteica aórtica y miocárdica, el engrosamiento de la aorta así como la fibrosis miocárdica producida por la inhibición crónica de la síntesis de NO (Pecháňová *et al.* 2004). En ratas SHR la administración de RWPs también normalizó el diámetro de arteriolas cerebrales (Chan *et al.*, 2008). Este efecto antihipertensivo contra el remodelado de los RWPs puede estar relacionado con la disminución del estado oxidativo y con el aumento en la producción de NO.

En el apartado 1.3.5. vimos que estos polifenoles son activadores de la actividad NOS en el sistema cardiovascular. La activación de la vía del NO está involucrada en la regulación de la producción de citokinas inflamatorias, moléculas de adhesión y quimioquinas por la inhibición de factores de transcripción nuclear- $\kappa$ B (Kitamoto *et al.* 2000) o del factor de crecimiento transformador-  $\beta$  (Tomita *et al.* 1998) y todo ello podría influir en el efecto sobre el remodelado que tienen los RWPs, incluso el hecho de que la expresión de la iNOS se viera reducida en ratas tratadas con estos polifenoles y L-NAME, sugiere que los polifenoles inducen restauración de la producción de NO por la eNOS y previenen la necesidad de la sobreexpresión de la iNOS en estos animales (Pecháňová *et al.* 2004).

No se puede excluir el hecho de que la reducción del engrosamiento de la pared arterial, que favorecen los RWPs, implique la regulación a la baja de la expresión del gen de la ciclina A (Iijima *et al.* 2000).



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

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

La habilidad de un componente de la dieta para influenciar la función vascular y prevenir enfermedades cardiovasculares depende de cuánta de la dosis oral sea absorbida desde el intestino. La vida media plasmática depende de la influencia del metabolismo de primer paso (intestino delgado e hígado) y de la tasa de excreción. Es posible que algunos componentes del vino se acumulen en concentraciones mayores en ciertos tejidos, en principio los polifenoles del vino no se concentran en tejidos específicos, más allá del intestinal. Sin embargo, hay evidencias que demuestran que el resveratrol se acumula de manera tiempo y dosis dependiente en hígado (Vitaglione *et al.*, 2008) y cerebro (El-Mohsen *et al.*, 2006) de ratas a las que se les había administrado resveratrol intragastricamente durante varios días, mientras que otros informes indican una fijación preferente del <sup>14</sup>C-resveratrol en los órganos de absorción y eliminación (estómago, intestino, hígado y riñón) (Vitrac *et al.*, 2003).

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

Sin embargo, para otros como las antocianinas, mucho menos de un 1% de la dosis oral se recupera en orina y las concentraciones más altas en plasma se encuentran en el rango nanomolar (Manach *et al.*, 2005). Hasta la fecha, la concentración más alta de polifenoles que se ha observado en plasma por ingestión oral en humanos se encuentra alrededor de 1-10  $\mu\text{M}$ . Estas concentraciones se observan únicamente tras la ingesta de grandes dosis de polifenoles en suplementos alimenticios, de comidas ricas en polifenoles, o de bebidas que contienen más flavonoides biodisponibles, como monómeros flavan-3-oles, isoflavonas y flavanonas.

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

Los monómeros de flavanoles, (+)-catequina y (-)-epicatequina, también se conjugan durante la absorción. La mayor parte de los productos son conjugados glucoronizados y sulfatados de la aglicona o del derivado metilado (Kroon *et al.*, 2004). Sin embargo, los antocianos (los componentes intensamente coloreados y responsables

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En el mismo estudio, ya mencionado en el apartado anterior, de Galisteo *et al.*, (2004) analizaron los efectos de la administración crónica del flavonoide quercetina y del verapamilo en la hipertensión y el estado oxidativo de ratas DOCA-sal en diferentes tejidos. En este estudio, el tratamiento DOCA-sal produjo una disminución significativa de la actividad de enzimas antioxidantes hepáticas, como la Glutation peroxidasa (GPX) y la Glutation S-Transferasa (GST). La producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) también se encontraba incrementada en el hígado y el corazón de las ratas DOCA-sal. Esta disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes es correlativa al incremento de la producción de TBARS, siendo en una proporción similar. En cambio, se detectó un aumento en el contenido de Glutation total (GSH) hepático, lo que está considerado por algunos autores como un mecanismo de adaptación para la defensa frente a una formación incrementada de radicales libres (Toth *et al.*, 1986). No se detectaron cambios en la actividad de la Glutation Reductasa en hígado en las ratas DOCA-sal, pero se observó una disminuída actividad renal de la GST, lo que sugiere una menor tasa de reacciones de detoxificación, dejando a los riñones más expuestos a sufrir daños. La quercetina fue capaz de incrementar los sistemas de defensa antioxidantes en hígado, corazón y riñón.

Consecuentemente, el estrés oxidativo está directamente relacionado con el desarrollo de la hipertensión en este modelo experimental, de hecho en un estudio de los autores Nicod *et al.*, (2000), se postuló el uso de antioxidantes, en concreto el ácido clofíbrico y el dietilmaleato, como coadyuvante a la terapia antihipertensiva. En el

grupo de ratas hipertensas tratadas con los agentes antioxidantes citados, hubo un incremento en las actividades hepáticas SOD, GPX y CAT, acompañado de una disminución de la presión sanguínea elevada.

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

Callera *et al.*, (2006) sugieren que el estrés oxidativo inducido por ET-1 en la hipertensión DOCA-sal implica mecanismos independientes de NADPH oxidasa. La xantina oxidasa (XO) y la mitocondria son fuentes generadoras de  $O_2^-$  y podrían contribuir a la disfunción vascular en la hipertensión, siendo de este modo candidatos como fuente adicional en la generación de  $O_2^-$  en ratas DOCA-sal (Viel *et al.*, 2008).

### **3. Hipertensión SHR.**

#### **3.1. Generalidades de la hipertensión SHR.**

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

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

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

### 3.2. Patogénesis de la hipertensión SHR.

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

Varios estudios han demostrado que son los mecanismos peptidérgicos y catecolaminérgicos centrales los que están alterados en varias regiones cerebrales, como el núcleo hipotalámico (Saavedra *et al.*, 1978, Versteeg *et al.*, 1976). También se ha encontrado elevada la actividad de los sistemas hipotalámico-tiroideo e hipotalámico-corticoideo.

Graham *et al.* (1982) demostraron la existencia de un incremento en la densidad de los receptores  $\alpha_2$  y  $\beta_1$  adrenérgicos en preparaciones de membrana renal de SHR respecto a las de ratas WKY, lo que explicaría la mayor retención de sodio que tiene lugar en este modelo de hipertensión. Se cree que el receptor  $\alpha_2$  adrenérgico del túbulo proximal es un sitio probable de anormalidad que predispone al desarrollo de hipertensión genética en SHR. El sistema nervioso simpático parece participar, pues, de forma decisiva en la patogénesis del modelo de hipertensión genética SHR

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



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

### **3.2. Alteraciones anatomopatológicas de la hipertensión SHR.**

El cambio hemodinámico más importante para el mantenimiento de esta hipertensión es el incremento de las resistencias periféricas totales (Folkow, 1978, Folkow *et al.*, 1958). En el modelo de hipertensión SHR se han observado cambios en la estructura de las pequeñas arterias (disminución del lumen e incremento de la relación media/lumen) independientemente de la técnica utilizada para su detección (miográfica o histológica) o del vaso de resistencia examinado: mesentérico (Deng y Schiffrin, 1992; Mulvany *et al.*, 1985), cerebral (Baumbach y Heistad, 1989) o femoral (Bund *et al.*, 1991).

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

#### *Sistema renina-angiotensina.*

En las ratas jóvenes SHR existe un claro aumento de la resistencia periférica junto con una disminución de la tasa de filtración glomerular y del flujo sanguíneo renal. Estos factores suponen bien un incremento de los sistemas vasoconstrictores, bien una disminución de los sistemas vasodilatadores o ambas cosas. En este modelo de hipertensión, aunque los valores plasmáticos de renina son normales, parece que la alteración del sistema renina-angiotensina representa un importante papel. El contenido renal de renina está elevado en ratas jóvenes (desde el nacimiento hasta 4-6 semanas de edad) (Saito *et al.*, 1976) y desciende con la edad, al contrario de lo que ocurre en ratas

WKY, cuya actividad plasmática de renina permanece estable durante toda la vida. Por otra parte, se ha comprobado que la administración crónica de un inhibidor de la enzima de conversión de la Ang II previene el desarrollo de la hipertensión en SHR jóvenes y revierte la hipertensión en SHR adultas, al reducir las resistencias periféricas (Richer *et al.*, 1983). Se han obtenido resultados contradictorios al examinar la reactividad vascular renal a Ang II exógena en riñones aislados y perfundidos de SHR; no obstante, Chatziantoniou *et al.* (1990) demostraron que la reactividad vascular a Ang II ex vivo se duplicaba en ratas SHR respecto de las ratas WKY de la misma edad. Todo esto hace suponer que el sistema renina-Ang está involucrado en la exagerada vasoconstricción que se produce en ratas jóvenes con hipertensión genética. Esta vasoconstricción inducida por la Ang II es posible que se deba a un incremento del número y/o la afinidad de los receptores de Ang II en la vasculatura renal de SHR o a un incremento, en las ratas WKY, de los sistemas vasodilatadores que se oponen a la acción de la Ang II.

Por otra parte, se ha observado que en SHR jóvenes, la Ang II estimula preferentemente la síntesis glomerular y renal de TXA<sub>2</sub>, mientras que la producción de PGI<sub>2</sub> predomina en la edad adulta (Konieczkowski *et al.*, 1983). Se supone que la vasculatura de SHR jóvenes es más sensible a Ang II, debido a una deficiencia de prostanoïdes vasodilatadores endógenos y al consiguiente predominio de los prostanoïdes vasoconstrictores, responsable de la intensa vasoconstricción que caracteriza a este modelo de hipertensión.

Otro hecho que ratifica la participación del sistema renina-Ang en este tipo de hipertensión es la reducción de presión arterial que inducen los antagonistas de los receptores de Ang II (Wong *et al.*, 1990). Dada la actividad plasmática normal de renina en SHR, se ha especulado con la posibilidad de que la renina derivada del riñon contribuya a la generación local de Ang II para mantener el tono vascular en estas ratas. Además, y puesto que los antagonistas de Ang II no promueven excreción de sodio y agua en este modelo de hipertensión y sí incrementan el flujo plasmático renal, se

sugiere que la Ang II contribuye a la elevación de la resistencia vascular renal en SHR. Todos estos datos son bastante consistentes para formular la hipótesis de que el factor responsable de la elevada resistencia periférica y vascular renal en SHR sea una anomalía en el sistema renina-angiotensina tisular (Fenoy *et al.*, 1991).

### **3.4. Reactividad Vascular en la hipertensión SHR.**

En estudios previos de este grupo en anillos aórticos de SHR se observa una clara disfunción endotelial que se manifiesta por una reducida vasodilatación dependiente de endotelio a Ach (Vera *et al.*, 2007). En aorta de rata la vasodilatación dependiente de endotelio se debe casi completamente a la liberación endotelial de NO y la subsiguiente activación de la guanilato ciclasa soluble en las células del músculo liso vascular (Ulker *et al.*, 2003). Se ha visto que la vasodilatación independiente de endotelio inducida por el activador de la guanilato ciclasa, NPS, es similar en SHR y WKY indicando que la disfunción endotelial se debe a cambios en la biodisponibilidad de NO derivado de endotelio, más que a cambios en la sensibilidad del músculo liso vascular a NO (Sánchez *et al.*, 2006).

Pueden ocurrir cambios aparentes en la vasodilatación dependiente de endotelio, debidos a la liberación de vasoconstrictores producidos y liberados por el endotelio, que originan efectos opuestos al NO (Nagao *et al.*, 1992a, b, Auch-Schwelk *et al.*, 1990). De hecho, de acuerdo con datos anteriores (Nagao *et al.*, 1992a), las SHR mostraron una vasoconstricción dependiente de endotelio inducida por Ach aumentada respecto a sus controles normotensos WKY en arterias tratadas con el inhibidor de la eNOS, L-NAME. Esta respuesta fue abolida por el antagonista del receptor de tromboxano-endoperóxido SQ-29,548 (Auch-Schwelk *et al.*, 1990), lo que indica que la Ach provoca también la liberación endotelial de prostanoïdes vasoconstrictores que modulan la vasodilatación mediada por NO.

Otro mecanismo que puede estar involucrado en la disfunción endotelial en SHR es el aumento de la producción de un factor endotelial constrictor. Se especula con un

derivado prostanoide del tipo prostaglandina  $H_2/TXA_2$  que podría expresarse localmente en exceso, puesto que la incubación de anillos aórticos de animales SHR en presencia del inhibidor de la COX, indometacina, reduce la disfunción endotelial en respuesta a la Ach (Lahera *et al.*, 1993; Luscher *et al.*, 1990). Estudios publicados por nuestro grupo señalan que puede ser la  $PGH_2$  el compuesto responsable del efecto vasoconstrictor (Vera *et al.*, 2005).

La prostaciclina  $PGI_2$  no provoca ninguna o poca relajación en aortas de SHR de edad avanzada probablemente porque la expresión génica del receptor de  $PGI_2$  (receptor IP) disminuye con la edad y además está sistemáticamente menos expresada en SHR que en WKY a cualquier edad (Numaguchi *et al.*, 1999).

### **3.5. Estrés oxidativo e hipertensión SHR.**

Está aceptado que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos involucrados en la patogénesis de la hipertensión arterial (Touyz, 2004). Hay evidencias que indican la importancia del papel del sistema renina-angiotensina (SRA) en el estrés oxidativo asociado con la hipertensión arterial (Ortiz *et al.*, 1998; Zicha *et al.*, 2006). En un estudio muy reciente de Miguel-Carrasco *et al.*, (2010) en el que se pretendía comparar el efecto antioxidante del captopril con el de la L-carnitina, se analizó la actividad de varias enzimas antioxidantes y el papel del SRA en el corazón de ratas SHR.

Para demostrar la implicación del SRA en el estrés oxidativo en este modelo, se estudiaron dos componentes de dicho sistema, el receptor 1 de angiotensina II (AT1) y la enzima convertidora de angiotensina (ECA) observándose sobrerregulación de ECA y AT1 en el ventrículo izquierdo en ratas SHR. Sin embargo, la producción de  $O_2^-$  en la hipertensión arterial no depende del estado del SRA exclusivamente. De hecho había una disminución en la expresión de mRNA de la GPX y la SOD, disminuyendo así la defensa antioxidante. Tanto la L-carnitina como el captopril aumentaron la capacidad de defensa frente al estrés oxidativo en las ratas SHR mediante la regulación de enzimas antioxidantes y la inhibición del SRA.

Este grupo observó una mayor producción de  $O_2^-$  encontrada en aorta de ratas SHR, estimulada con NADPH, que en ratas WKY, y que dicha sobreproducción era inhibida por quercetina (Sánchez *et al.*, 2006). La NADPH oxidasa es un complejo enzimático de múltiples subunidades responsable de la reducción monoelectrónica del oxígeno para producir  $O_2^-$  a expensas de NADPH (Ozgova *et al.*, 2003). Este complejo enzimático es considerado la fuente más importante de  $O_2^-$  en la pared vascular (Manach *et al.*, 2005). Un exceso en la generación de  $O_2^-$  sintetizado por NADPH oxidasa se relaciona de forma crucial con la disminución de NO asociado a disfunción endotelial en hipertensión clínica y experimental (Li y Shah, 2003, Cai y Harrison., 2000, Griendling *et al.*, 2000, Babior, 1999, Rajagopalan *et al.*, 1996, Ohara *et al.*, 1993).

Numerosos estudios han sugerido que la subunidad p47phox de NADPH oxidasa juega un papel esencial en el estrés oxidativo vascular y la presión sanguínea en respuesta a Ang II *in vivo* (Viridis *et al.*, 2004, Touyz 2001). De hecho, el inhibidor de NADPH oxidasa, apocinina, que impide la unión de las subunidades p47phox y p67phox con el complejo de membrana de la NADPH oxidasa (Meyer y Schmitt, 2000), redujo la disfunción endotelial en SHR *in vitro*. Resultados obtenidos en este laboratorio (Sánchez *et al.*, 2006) muestran que en SHR hay mayores niveles de esta proteína componente de NADPH oxidasa que en las aortas de WKY.

Como ya hemos visto se asocia la producción de radicales libres a la disfunción endotelial en el modelo SHR (Grunfeld *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1995), pero la NADPH oxidasa no es la única fuente generadora de radicales libres, de hecho, la reducción de la producción de  $O_2^-$  mediante aloxantina, un inhibidor de la XO (Miyamoto *et al.*, 1996) disminuye de forma aguda la presión arterial en ratas SHR. También se ha descrito que la administración crónica de antioxidantes como la vitamina E (Chen *et al.*, 2001) revierte la disfunción endotelial hipertensiva y reduce la presión arterial. El  $O_2^-$  tiene la capacidad, como ya se describió, de oxidar el NO (eliminando así su efecto beneficioso) y producir peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que tiene una potente

acción oxidante y produce lesión celular a nivel estructural y molecular (Rubanyi y Vanhoutte, 1986). El ONOO<sup>-</sup> reacciona con el ácido araquidónico y produce 8-isoprostaglandina PGF<sub>2α</sub>, que es un potente vasoconstrictor que incrementa la presión arterial (Morrow y Roberts, 1996). Además, varios estudios han demostrado que el O<sub>2</sub><sup>-</sup> puede actuar como vasoconstrictor (Cosentino *et al.*, 1994; Auch-Schwelk *et al.*, 1989) y estimulante de la proliferación celular por sus efectos mitogénicos directos sobre las CMLV (Gong *et al.*, 1996; Rao y Berk, 1992). En estudios recientes se ha visto que la administración crónica de N-acetilcisteína, un antioxidante con un grupo tiol, atenuó parcialmente el incremento de presión arterial que tiene lugar en ratas jóvenes SHR. Los mecanismos responsables parecen estar relacionados tanto con la disminución en los niveles de ROS como por el incremento en la producción de NO. (Pecháňová *et al.*, 2007).

## 4. Endotelina-1.

### 4.1. Biosíntesis, regulación y lugares de generación

Cada isoforma de ET está expresada por un gen diferente, que da lugar a un precursor específico para cada isoforma llamado preproendotelina (péptido de 212 Aa). La producción de las isoformas activas de ET es un proceso bifásico, con una primera fase donde los isopéptidos preproendotelina son transformados en péptidos de 37-41 Aa llamados big-endotelinas (big-ETs) por acción de endopeptidasas; y una segunda fase, donde estas big-ETs dan lugar a los péptidos activos de 21 Aa (ET-1, ET-2 y ET-3) por acción de las enzimas convertidoras de endotelina (ECEs) (Denault *et al.*, 1995, Tostes *et al.*, 2008). No obstante, la síntesis de las endotelinas puede ser llevada a cabo por otras vías ECEs-independientes, mediadas por enzimas del tipo quimasas, que rompen la big-ET en la unión Tyr<sup>31</sup>-Gly<sup>32</sup> dando lugar a las ETs de 31 Aa (ET-1<sup>1-31</sup>, ET-2<sup>1-31</sup>, ET-3<sup>1-31</sup>), o bien endopeptidasas o metaloproteinasas (metaloproteinasa-2 o metaloproteinasa-9 vasculares) (Turner *et al.*, 1997, Kishi *et al.*, 1998, D'Orléans-Juste *et al.*, 2003, Alonso y Radomski, 2003, Böhm y Pernow, 2007).

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

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

dimerizarse con las otras isoformas membranales regulando la actividad de estas últimas (Muller *et al.*, 2003).

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

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

Las endotelinas son sintetizadas en diversos tejidos del organismo. ET-1 se sintetiza fundamentalmente en las células endoteliales, lo cual está estrechamente relacionado con la mayor expresión de mRNA para pre-proendotelina-1 y la presencia de ECEs intracelulares en las células endoteliales (Plumpton *et al.*, 1993, Xu *et al.*, 1994). La ET-1 también se sintetiza en las CMLV, corazón, riñón, pituitaria posterior y sistema nervioso central (SNC), pero a una concentración mucho menor (Agapitov *et al.*, 2002). ET-2 se sintetiza en células endoteliales, corazón y riñón (Howard *et al.*, 1992). ET-3 se sintetiza en células endocrinas, gastrointestinales y del SNC, pero no en células endoteliales (Gray *et al.*, 1995). En el SNC, la ET-3 ejerce su acción a través de receptores de ET tipo B (ET<sub>B</sub>), actuando como un neuropéptido implicado en la migración de las células de las crestas neurales (Hosoda *et al.*, 1994).

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

Una vez sintetizada, la ET-1 es liberada continuamente desde las células endoteliales vasculares, actuando en la regulación del tono vascular y ejerciendo acciones paracrinas, endocrinas, autocrinas y secretoras (Brunner *et al.*, 2006). Además,



la ET-1 es liberada por otras células del organismo como CMLV, cardiomiocitos, leucocitos, macrófagos, células mesangiales y células del túbulo renal (Tostes *et al.*, 2008).

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

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

El aclaramiento de ET-1 (mecanismos por los que se degrada e inactiva) tiene lugar por diferentes mecanismos (internalización de receptores de  $\text{ET}_B$  y degradación enzimática por endopeptidasas) que se producen principalmente en pulmones y en otros órganos como riñones, hígado y corazón (Dupuis *et al.*, 1996, Dupuis *et al.*, 1999, Johnström *et al.*, 2005). El aclaramiento de ET-1 por internalización de receptores de

ET<sub>B</sub>, descrito por primera vez por Fukuroda y cols. (1994), es un mecanismo por el que se mantienen niveles plasmáticos bajos de ET-1, cercanos al rango vasodilatador.

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

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

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

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

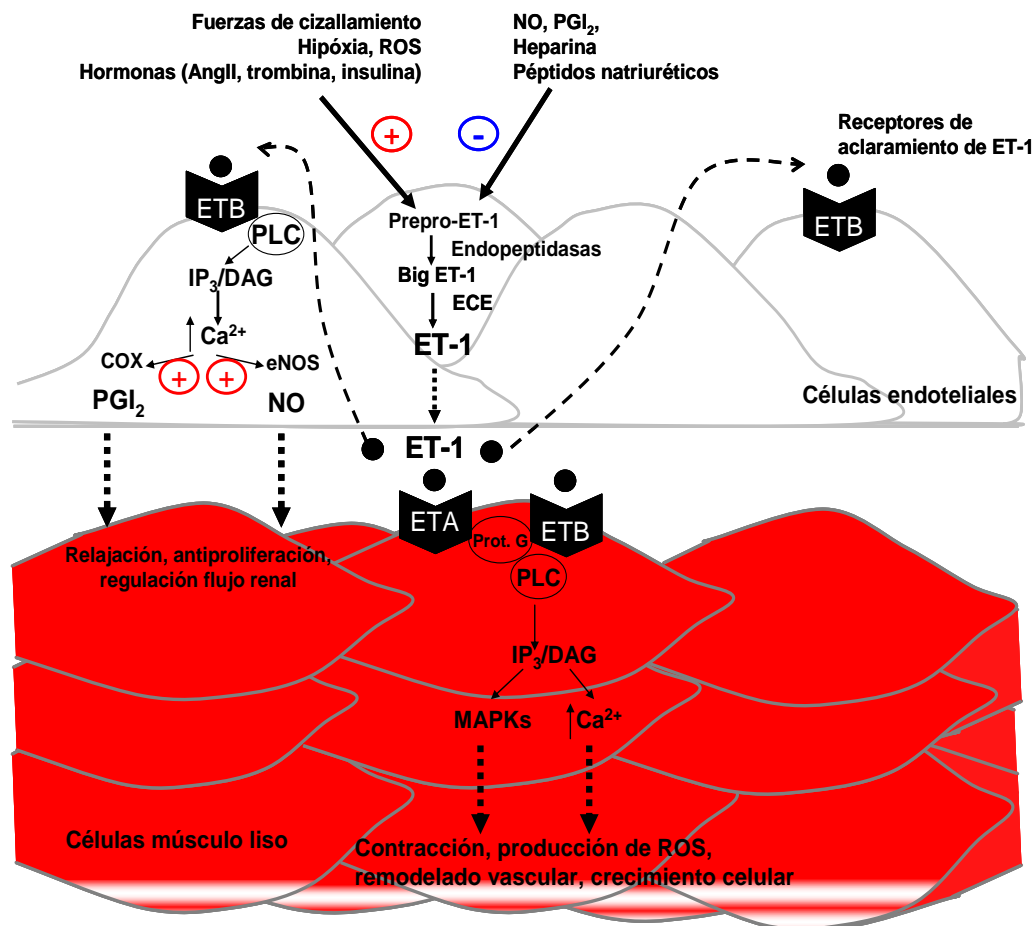
Los receptores ET<sub>A</sub> están expresados fundamentalmente en las CMLV, donde median vasoconstricción y estimulan el crecimiento y proliferación de las CMLV. También, se expresan en cardiomiocitos, fibroblastos, hepatocitos, adipocitos, osteoblastos y neuronas, donde median respuestas mitogénicas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

Se conoce la existencia de dos subtipos de receptores ET<sub>B</sub>, con diferente localización y función. Los receptores ET<sub>B1</sub> están expresados principalmente en las células endoteliales, donde originan la liberación de NO y prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), dando lugar a respuestas vasodilatadoras y antiapoptóticas. Los receptores ET<sub>B2</sub> se localizan en las CMLV, donde median respuestas vasoconstrictoras, así como en el estómago, útero,

cerebro, corteza adrenal y riñón, donde participan en respuestas mitogénicas y pro-inflamatorias. La afinidad de los receptores ET<sub>B</sub> por las endotelinas es ET-1=ET-2=ET-3 (Sakurai *et al.*, 1993, Rosendorff, 1996).

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

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



**Figura 2.** Síntesis, regulación y acciones vasculares de ET-1. La liberación de la ET-1 es regulada a nivel transcripcional y/o a nivel de la actividad de la enzima convertidora de endotelina (ECE) por la acción de diversos agentes. Una vez liberada, la ET-1 ejerce sus acciones a través de dos tipos de receptores: ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. Los receptores ET<sub>A</sub> se localizan en las CMLV donde median vasoconstricción, proliferación y remodelado vascular, debido a un aumento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular por activación de la fosfolipasa C (PLC) y liberación de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). Los receptores ET<sub>B</sub> se localizan en las células endoteliales donde median respuestas vasodilatadores y antiproliferativas, debido a un aumento en la liberación de NO y prostaglandinas (PGs), y son los responsables del aclaramiento de ET-1, mecanismo por el que se degrada e inactiva la ET-1; así como en las CMLV (ET<sub>B2</sub>), donde median vasoconstricción, proliferación y remodelado vascular.

⊕ Activación. ⊖ Inhibición.

### 4.3. Disfunción endotelial y ET-1.

NO y ET-1 son mediadores derivados del endotelio que juegan un papel importante en la homeostasis vascular. El NO es generado y liberado por las células endoteliales tanto en condiciones basales como frente a estímulos, como las fuerzas de cizallamiento o “*shear stress*” y el flujo sanguíneo (Cooke *et al.*, 1991). En el sistema cardiovascular el NO no sólo origina vasodilatación sino que también inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, la proliferación de las CMLV, la adhesión de monocitos, la expresión de diferentes moléculas de adhesión y la producción de ET-1 (Radomski *et al.*, 1987a, b, Taddei *et al.*, 2000). La ET-1 posee capacidad para producir una vasoconstricción sostenida concentración dependiente y endotelio independiente en anillos vasculares de varias especies (Hickey *et al.*, 1985, O’Brien *et al.*, 1987). ET-1 interacciona con varios sistemas biológicos como el sistema L-arginina/NO, el SRA y el sistema nervioso simpático. Además, el sistema de ETs juega un papel importante en diversas acciones biológicas como regulación del tono vascular, balance sodio-agua, desarrollo de las células de la cresta neural y en la neurotransmisión (Kedzierski y Yanagisawa, 2001). Recientes estudios han sugerido que el desequilibrio entre NO/ET-1 puede contribuir a cambios en la función vascular observados en estados patológicos. De hecho, se ha observado que algunas vasculopatías que están asociadas a una menor biodisponibilidad de NO muestran un incremento en la síntesis de ET-1, lo cual sugiere una estrecha relación entre ambos mediadores derivados del endotelio (Alonso y Radomski, 2003).

La ET-1 puede reducir la biodisponibilidad del NO por disminución de la producción de NO mediante inhibición de la eNOS a través de la caveolina-1. La caveolina-1 es la principal proteína de la caveola y actúa como un regulador negativo de la actividad de la eNOS al unirse a ella (Minshall *et al.*, 2003). En condiciones patológicas, ET-1 aumenta la expresión de caveolina-1, que inhibe la actividad de la eNOS (Kamoun *et al.*, 2006, Karaa *et al.*, 2005). O bien, por aumento de la degradación de NO mediante su interacción con ROS. *In vivo*, la sobreexpresión de ET-1 induce un aumento en la producción de ROS en el árbol vascular (Amiri *et al.*, 2004),

que pueden interactuar con el NO, o bien, con BH<sub>4</sub> e inducir el desacoplamiento de la eNOS. En ambos casos se produce una disminución en los niveles de NO, lo cual conduce a la aparición de disfunción endotelial. El papel de la ET-1 endógena para inducir disfunción endotelial por aumento en la producción de ROS se confirma en el modelo DOCA-sal, donde se observa disfunción endotelial, disminución de los niveles de BH<sub>4</sub> y aumento de la producción de ROS (Zheng *et al.*, 2003, Iglarz *et al.*, 2003). En este modelo animal de hipertensión, los niveles de BH<sub>4</sub> son restaurados por inhibición de la NADPH oxidasa, principal fuente generadora de ROS a nivel vascular, o por inhibición de los receptores de ET-1 (Zheng *et al.*, 2003).

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

Diversos estudios han sugerido la implicación de la ET-1 en la patogénesis inicial de las enfermedades cardiovasculares. Así ET-1 es un predictor temprano de la disfunción endotelial presente en las enfermedades cardiovasculares, como aterosclerosis, diabetes, hipertensión pulmonar y enfermedades autoinmunes. La implicación de la ET-1 en la disfunción endotelial observada en aterosclerosis ha sido demostrada en ratones deficientes en apoE, que es un modelo animal de hiperlipidemias

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

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

## **Justificación y objetivos.**

---





El consumo moderado de alcohol se asocia con una reducción significativa de la mortalidad cardiovascular en humanos (Flesh *et al.*, 2001). Algunos estudios indican que el vino puede ser más protector que otras bebidas alcohólicas como la cerveza o los alcoholes de alta graduación (Klatsky *et al.*, 1997, Gronbaek *et al.*, 2000). Un metaanálisis de más de 26 estudios en más de 200.000 individuos ha revelado que, en comparación con los abstemios, el riesgo cardiovascular está reducido en un 22% en bebedores de cerveza, y un 32% en bebedores de vino (Di Castelnuovo *et al.*, 2002). Este y otros estudios sugieren que el vino podría contener compuestos de naturaleza no alcohólica, que protejan frente a la enfermedad vascular aterosclerótica. Acorde con esta idea la ingesta relativamente alta de vino en Francia se piensa que pueda influir en la menor mortalidad por enfermedad cardíaca coronaria, la cual está reducida en un 50% comparado con otros países europeos y EEUU, a pesar de una ingesta similar en grasas saturadas (Renaud *et al.*, 1992, Tunstall-Pedoe *et al.*, 1999). Sin embargo, las bases moleculares de este fenómeno, conocido comúnmente como la “paradoja francesa”, siguen sin conocerse.

La hipertensión es un factor de riesgo bien establecido para el desarrollo y la aceleración de la aterosclerosis. Los polifenoles del vino tinto y extractos de piel de uva reducen la presión sanguínea en varios modelos de experimentación animal, como el inducido por inhibición crónica de la síntesis de NO por L-NAME (Bernatova *et al.*, 2002, Pechanova *et al.*, 2004), por la infusión de Ang II (Sarr *et al.*, 2006) e hipertensión DOCA-sal (Soares de Moura *et al.*, 2002), y esta reducción está relacionada con una combinación de acciones vasodilatadoras y antioxidantes. El estrés oxidativo y la inactivación del óxido nítrico por el anión  $O_2^-$  juegan un papel crítico en la patogénesis de la enfermedad vascular, incluyendo la hipertensión arterial (Griendling *et al.*, 1997, Landmesser *et al.*, 2001). El  $O_2^-$  arterial está elevado en la hipertensión inducida por Ang II (Oskarsson *et al.*, 1997), lo que es atribuible en gran parte a la activación de la NADPH oxidasa por Ang II (Rajagopalan *et al.*, 1996, Pagano *et al.*, 1997). Sin embargo, también se ha encontrado un exceso en la

producción vascular de  $O_2^-$  en la hipertensión DOCA-sal (Somers *et al.*, 2000, Wu *et al.*, 2001, Beswick *et al.*, 2001), un modelo con una baja actividad de la renina en plasma debido a la retención de sodio (Gavras *et al.*, 1975). Se ha visto que la ET-1 contribuye a la patogénesis de la hipertensión sensible a la sal en animales y humanos (Schiffrin *et al.*, 2001), secundaria a un estado de bajos niveles de renina (Letizia *et al.*, 1997, Elijevich *et al.*, 2001). La ET-1 es uno de los vasoconstrictores más potentes producidos en la pared de los vasos sanguíneos (Lariviere *et al.*, 1993), y además aumenta la producción vascular de  $O_2^-$ , al menos en parte, debido a la actividad NADPH oxidasa (Li *et al.*, 2003), lo que lleva a disfunción endotelial y a hipertensión. Un extracto de vino tinto (Corder *et al.*, 2001) y los componentes polifenólicos del mismo (Khan *et al.*, 2002) disminuyen la síntesis de ET-1 en cultivos de células endoteliales de aorta bovina, mediante la supresión de la transcripción del gen de ET-1.

Por tanto, el **primer objetivo** de esta Tesis Doctoral es examinar si la ingesta crónica de RWPs previene la hipertensión y la disfunción endotelial en un modelo DOCA-sal, buscando los posibles mecanismos implicados, centrándonos en la producción de ET-1 y el estrés oxidativo.

La incidencia de enfermedades cardiovasculares entre mujeres premenopausicas es más baja que entre hombres de la misma edad, pero crece rápidamente tras la menopausia. La presión arterial es también más alta en hombres que en mujeres en edades similares (Wiinber *et al.*, 1995) y esta diferencia se reduce o incluso se invierte tras la menopausia. La pérdida de estrógenos se ha sugerido como un factor de riesgo para la hipertensión postmenopausica. Los subtipos de receptor estrogénico  $ER\alpha$  y  $ER\beta$  se expresan en células endoteliales y en el músculo liso vascular (Linder *et al.*, 1998, Pare *et al.*, 2002, Darblade *et al.*, 2002, Zhu *et al.*, 2002). Los estrógenos aumentan la generación de NO derivado de endotelio, modulan el sistema renina angiotensina tisular y muestran efectos antioxidantes (Mendelson *et al.*, 2005, Dean *et al.*, 2005). Los tratamientos con estrógenos a largo plazo mejoran la disfunción endotelial, mediante la

regulación al alza de la eNOS (Hayashi *et al.*, 1995, Hishikawa *et al.*, 1995), la modulación postranscripcional de la actividad eNOS (Fulton *et al.*, 2001), o por efectos no genómicos, incluyendo la activación de la síntesis de NO (Caulin-Glaser *et al.*, 1997, Vera *et al.*, 2005). Sin embargo, a pesar de los efectos positivos en la función vascular encontrados en cultivos celulares (Hishikawa *et al.*, 1995, Caulin-Glaser *et al.*, 1997), en estudios en animales (Keaney *et al.*, 1994, Collins *et al.*, 1994, Dantas *et al.*, 2002) y en humanos (Gilligan *et al.*, 1994, Lieberman *et al.*, 1994, Viridis *et al.*, 2000) *ex vivo* (Vera *et al.*, 2005) e *in vivo* a corto plazo, la terapia sustitutiva de estrógenos no ha protegido de las enfermedades cardiovasculares en los ensayos controlados randomizados a gran escala (Grady *et al.*, 2002, Rossouw *et al.*, 2002).

Varias clases de compuestos polifenólicos que se consumen junto con nuestra dieta regular se asemejan tanto funcional como estructuralmente a los estrógenos y, por tanto, se han llamado generalmente “fitoestrógenos”. Estos compuestos de la dieta parece que proporcionan protección frente a enfermedades cardiovasculares (Cos *et al.*, 2003). Trabajos previos en este (Vera *et al.*, 2007) y otros laboratorios (Fang *et al.*, 2001, Peng *et al.*, 2003) demostraron que los fitoestrógenos de la soja pueden proteger a las ratas SHR con bajos niveles de estrógenos. Los polifenoles del vino tinto y los extractos de piel de uva también reducen la presión sanguínea en machos en varios modelos de hipertensión experimental (Bernatova *et al.*, 2002, Pechanova *et al.*, 2004, Sarr *et al.*, 2006, Soares de Moura *et al.*, 2002) debido a la combinación de efectos vasodilatadores y antioxidantes. *In vitro*, varios componentes polifenólicos del vino tinto incrementan la actividad transcripcional de ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Gehm *et al.*, 1997, Goodin *et al.*, 2002, Klinge *et al.*, 2005). Sin embargo, no hay estudios que analicen el posible efecto protector *in vivo* sobre la presión sanguínea y la función endotelial de los polifenoles del vino tinto en hembras y su relación con la función ovárica.

El **segundo objetivo** de esta Tesis Doctoral consiste en investigar si los polifenoles del vino tinto ejercen un efecto protector *in vivo* sobre el declive de la función vascular

en un modelo experimental de disfunción endotelial inducido tanto por una elevada presión arterial como por ovariectomía en ratas hembra.

La ET-1 es un péptido vasoconstrictor muy potente derivado de endotelio que juega un papel crucial en la fisiología cardiovascular y cuyas alteraciones se asocian con la mayoría de las formas de enfermedad cardiovascular. Los modelos experimentales de hipertensión como el modelo DOCA-sal o el modelo por infusión de Ang II, la aterosclerosis y la diabetes muestran altos niveles de ET-1 circulante y están asociados a disfunción endotelial (Bousette y Giaid, 2003, Cernacek *et al.*, 2003, Muller *et al.*, 2003, Schiffrin 2005). La disfunción endotelial, definida como un desequilibrio en los factores vasoactivos que lleva a la vasoconstricción y a cambios estructurales en la pared vascular, es un evento previo en la patofisiología de la aterosclerosis y la hipertensión, y es un marcador temprano e independiente de mal pronóstico (Schachinger *et al.*, 2000). Los datos obtenidos hasta la fecha indican que la ET-1, a través de la activación de receptores ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>, incrementa la producción de ROS en la vasculatura (por ejemplo el anión O<sub>2</sub><sup>-</sup>) resultando en disfunción endotelial (Wedgwood *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2003c, Loomis *et al.*, 2005).

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

efecto implica la activación secuencial de PKC, c-Src y ERK1/2 (Romero *et al.*, en prensa).

Los polifenoles del vino tinto reducen los factores de riesgo cardiovascular como son la hipertensión y la disfunción endotelial. De hecho, la administración crónica de RWPs reduce la presión arterial y mejora la disfunción endotelial en ratas DOCA-sal, un modelo de hipertensión con bajos niveles de renina en el que la ET-1 juega un papel predominante (Soares de Moura *et al.*, 2002). De modo similar, en ratas Zucker los RWPs reducen la liberación de  $O_2^-$  por medio de la disminución en la expresión de la subunidad de membrana de la NADPH oxidasa Nox-1 (Agouni *et al.*, 2009). Sin embargo, no está claro si estos efectos protectores de los RWPs son como resultado de una disminución en la síntesis de ET-1 y/o por interferir con las vías de señalización de la ET-1 que llevan al estrés oxidativo en la pared vascular.

El **tercer objetivo** de esta Tesis Doctoral es analizar los mecanismos implicados en los efectos protectores de una mezcla de RWPs en la disfunción endotelial y el estrés oxidativo vascular inducidos por ET-1 en anillos aórticos aislados de rata.



**Justification and aims.**

---





Moderate alcohol consumption is associated with a significant reduction of cardiovascular mortality in humans (Flesch *et al.*, 2001). Some studies indicate that wine may be more protective than other liquors such as beer or spirits (Klatsky *et al.*, 1997; Gronbaek *et al.*, 2000). A recent meta-analysis of 26 studies on more than 200.000 individuals revealed that when compared with abstainers, cardiovascular risk was reduced by 22% in beer drinkers, and by 32% in wine drinkers (Di Castelnuovo *et al.*, 2002). This and other studies suggest that wine may contain non-alcoholic compounds which, in addition to alcohol, that protect against atherosclerotic vascular disease. Consistent with this idea the relatively high wine intake in France is thought to account for the lower mortality from coronary heart disease, which is reduced by 50% compared with other European countries and the USA, despite similar intakes of saturated fats (Renaud *et al.*, 1992, Tunstall-Pedoe *et al.*, 1999). However, the molecular basis of this phenomenon, commonly known as the 'French paradox', remains unknown.

Hypertension is a well-established risk factor for the development and acceleration of atherosclerosis. RWPs and a grape skin extract also reduced blood pressure in several models of experimental hypertension, such as the one induced by chronic inhibition of NO synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Bernatova *et al.*, 2002, Pechanova *et al.*, 2004), angiotensin II (Ang II) infusion (Sarr *et al.*, 2006) and deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt-induced hypertensive rats (Soares de Moura *et al.*, 2002), which was related to a combination of vasodilator and antioxidant actions. Oxidative stress and the inactivation of nitric oxide (NO) by vascular superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) play a critical role in the pathogenesis of vascular disease, including hypertension (Griendling *et al.*, 1997, Landmesser *et al.*, 2001). Arterial  $O_2^{\cdot-}$  is elevated in Ang II-induced hypertension (Oskarsson *et al.*, 1997), attributable to a large extent to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activation by Ang II (Rajagopalan *et al.*, 1996, Pagano *et al.*, 1997). However, an excess of vascular  $O_2^{\cdot-}$  production has also been found in DOCA-salt hypertension (Somers *et al.*, 2000, Wu *et*

*al.*, 2001, Beswick *et al.*, 2001), a model with a markedly depressed plasma renin activity because of sodium retention (Gavras *et al.*, 1975). Endothelin-1 (ET-1) has been shown to contribute to the pathogenesis of salt-sensitive hypertension in animals and humans (Schiffrin *et al.*, 2001) secondary to a low-renin state (Letizia *et al.*, 1997, Elijovich *et al.*, 2001). ET-1 may be one of the most potent vasoconstrictors produced in the blood vessel wall known to date (Lariviere *et al.*, 1993) and also augments vascular  $O_2^-$  production, at least in part, via the ETA/NADPH oxidase pathway (Li *et al.*, 2003), leading to endothelial dysfunction and hypertension. Red wine extract (Corder *et al.*, 2001) and polyphenol constituents (Khan *et al.*, 2002) decreased ET-1 synthesis in cultured bovine aortic endothelial cells by suppressing transcription of the ET-1 gene.

Therefore, the **first aim** of this Doctoral Thesis is to examine whether chronic intake of RWPs prevents DOCA-salt-induced hypertension and endothelial dysfunction and, if so, to determine the underlying mechanism, focusing on the involvement of ET-1 production and oxidative stress.

The incidence of cardiovascular diseases among premenopausal women is lower than age-matched men but it rises markedly after menopause. Blood pressure is also higher in men than in women at similar ages (Wiinber *et al.*, 1995) and this difference is also reduced or even inverted after menopause. The loss of estrogens has been suggested as a major risk factor for postmenopausal hypertension. Estrogen receptor (ER) subtypes ER $\alpha$  and ER $\beta$  are expressed in endothelial and vascular smooth muscle cells (Linder *et al.*, 1998, Pare *et al.*, 2002, Darblade *et al.*, 2002, Zhu *et al.*, 2002). Estrogens increase endothelial-derived NO, modulate the local tissue renin-angiotensin system and show antioxidant effects (Mendelson *et al.*, 2005, Dean *et al.*, 2005). Long-term estrogen treatment improves endothelial dysfunction, through upregulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Hayashi *et al.*, 1995, Hishikawa *et al.*, 1995), post-translational modulation of eNOS activity (Fulton *et al.*, 2001) or nongenomic effects, including activation of nitric oxide (NO) synthesis (Caulin-Glaser *et al.*, 1997,

Vera *et al.*, 2005). However, despite the positive effects on vascular function found in both cell culture (Hishikawa *et al.*, 1995, Caulin-Glaser *et al.*, 1997) or in animals (Keaney *et al.*, 1994, Collins *et al.*, 1994, Dantas *et al.*, 2002) and human (Gilligan *et al.*, 1994, Lieberman *et al.*, 1994, Viridis *et al.*, 2000), estrogen replacement therapy has failed to protect from cardiovascular diseases in large scale randomized controlled studies (Grady *et al.*, 2002, Rossouw *et al.*, 2002).

Several classes of polyphenolic compounds which are consumed within our regular diet structurally and functionally resemble the mammalian estrogens and, thus, have been generally termed “phytoestrogens”. These dietary compounds appear to provide protection from cardiovascular diseases (Cos *et al.*, 2003). Previous works in our laboratory (Vera *et al.*, 2007) and others (Fang *et al.*, 2001, Peng *et al.*, 2003) demonstrated that soy phytoestrogens can protect estrogen-depleted spontaneously hypertensive rats (SHR). RWPs and a grape skin extract also reduced blood pressure in males in several models of experimental hypertension (Bernatova *et al.*, 2002, Pechanova *et al.*, 2004, Sarr *et al.*, 2006, Soares de Moura *et al.*, 2002), which was related to a combination of vasodilator and antioxidant actions. *In vitro*, several components of RWPs bind and increase the transcriptional activity of ER $\alpha$  and ER $\beta$  (Gehm *et al.*, 1997, Goodin *et al.*, 2002, Klinge *et al.*, 2005). However, there are not studies which analyze the possible *in vivo* protective effects on blood pressure and endothelial function of RWPs in females and its relationship with ovarian function.

The **second aim** of this Doctoral Thesis is to investigate whether RWPs exert an *in vivo* protection against the decline in vascular function in an experimental model of endothelial dysfunction induced by both blood pressure increase and ovariectomy in female rats.

ET-1 is a potent endothelial-derived vasoconstrictor peptide playing a crucial role in cardiovascular physiology and its alterations have been associated with most forms of cardiovascular disease. Experimental models of hypertension such as DOCA-salt or angiotensin II-infused rats, atherosclerosis and diabetes display high levels of circulating ET-1 and are associated with endothelial dysfunction [1-4]. Endothelial dysfunction, defined as an imbalance of endothelial derived vasoactive factors leading to vasoconstriction and structural changes in the vessel wall, is an early event in the pathophysiology of atherosclerosis and hypertension, and it is an independent predictor of poor prognosis (Schachinger et al., 2000). A significant body of evidence indicates that ET-1, through ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptor activation, increases reactive oxygen species (ROS) production in the vasculature (e.g. superoxide anion, O<sub>2</sub><sup>-</sup>), resulting in endothelial dysfunction (Wedgwood *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2003c, Loomis *et al.*, 2005).

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

Red wine polyphenols (RWPs) reduced cardiovascular risk factors such as hypertension and endothelial dysfunction. In fact, chronic administration of RWPs reduces blood pressure and improves endothelial function in DOCA-salt rats, a low renin model of hypertension in which ET-1 plays a predominant role (Soares de Moura

*et al.*, 2002). Similarly, in Zucker rats RWPs reduced  $O_2^-$  release via decreased expression of NADPH oxidase membrane sub-unit Nox-1 (Agouni *et al.*, 2009). However, it is not clear if these protective effects of RWPs are a result of decreased ET-1 synthesis and/or interference with ET-1 signaling pathways to lead oxidative stress in the vascular wall.

The **third aim** of this Doctoral Thesis is to analyze the mechanisms involved in the protective effects of a dietary mixture of RWPs in ET-1-induced vascular oxidative response and endothelial dysfunction in isolated rat aortic segments.



**Material y métodos.**

---





## 1. Estudios *in vivo*.

### 1.1. Polifenoles objeto de estudio.

La mezcla de RWPs (Provinol®) fue proporcionada por Mr. D. Ageron (Société Francaise de Distillerie, Vallont Pont d'Arc, Francia) (Fig. 3).

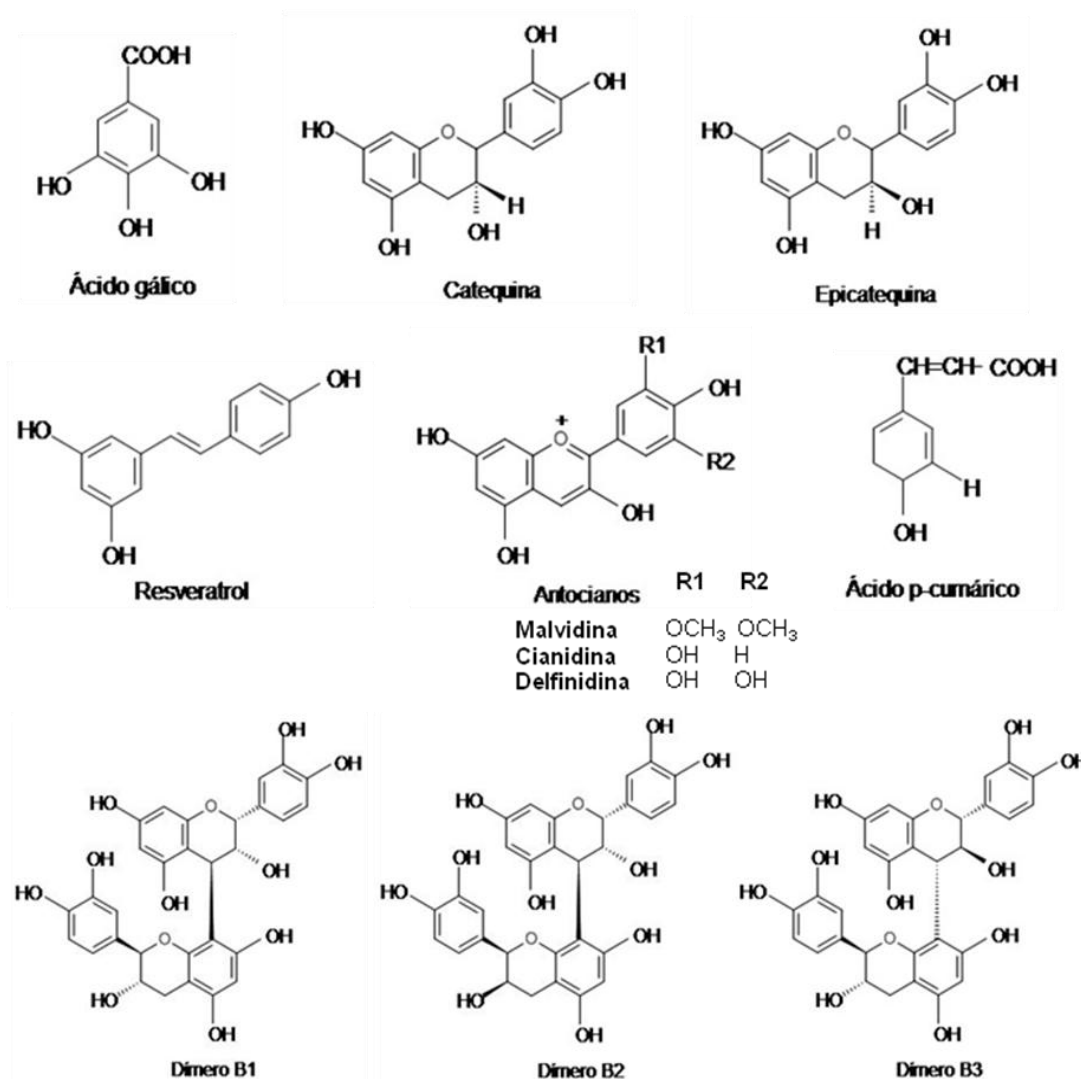


Figura 3. Componentes de la mezcla polifenólica.

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

## **1.2. Animales y grupos experimentales.**

Los protocolos experimentales siguieron las guías europeas para el buen cuidado y la protección de los animales. Todas las ratas se mantuvieron a una temperatura de  $24 \pm 1$  °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Se distribuyeron 5 ratas por batea. Hubo un periodo de adaptación para la administración oral y la medida de presión sistólica antes de comenzar los experimentos.

### **1.2.1. Experimento I: Efectos de los RWPs sobre la hipertensión DOCA-sal.**

Se utilizaron ratas Wistar macho de doce semanas de edad (250-285 g) se obtuvieron del Servicio de Laboratorio Animal de la Universidad de Granada. Las ratas se anestesiaron con una dosis intraperitoneal de 2,5 mL/Kg de equitensina (500 mL contienen 43 % w/v hidrato de coral en 81 mL etanol; 4.86 mg nembutal; 198 mL propilen glycol; 10.63 g MgSO<sub>4</sub>; agua destilada) y se uninefrectomizaron. Los animales se dividieron de forma randomizada en seis grupos (n = 7 a 10 en cada grupo):

control (CT)

RWPs

apocinina

Acetato de deoxicorticosterona (DOCA)-sal

DOCA-sal RWPs

DOCA-sal apocinina.

Al día siguiente de la uninefrectomía a los grupos DOCA-sal se les administró, vía intramuscular en la pata trasera, dicho producto a una dosis de 12,5 mg/0,5 mL vehículo/rata por semana (vehículo constituido por una suspensión de aceite de sésamo en etanol absoluto al 20 %), durante 5 semanas. A lo largo del periodo experimental, las

ratas con el tratamiento DOCA-sal tenían acceso a agua que contenía NaCl al 1 %. A los grupos RWP y apocinina se les administraba intragastricamente dosis de 40 mg/Kg y 33 µg/Kg por día, respectivamente. Esta dosis de RWP previamente se había visto que prevenía alteraciones cardiovasculares en hipertensión inducida por L-NAME (Pechanova *et al.*, 2004). La absorción media de los RWP en el tracto digestivo está entre el 5 % y el 10 % (Duthie *et al.*, 1998). De este modo, la dosis que se usó en el estudio debía alcanzar una concentración de polifenoles en plasma de alrededor de 0.01 g/L, que resulta ser la concentración que produce la máxima relajación dependiente de endotelio en tejido vascular de rata (Andriambelason *et al.*, 1997, Duarte *et al.*, 2004). La dosis de apocinina se había usado previamente para prevenir el desarrollo de la hipertensión DOCA-sal y para suprimir el incremento en la generación de  $O_2^-$  (Beswick *et al.*, 2001, Ghosh *et al.*, 2004). El peso corporal se controló una vez por semana. Los tratamientos con RWP y apocinina se detuvieron dos días antes del final de los experimentos, para poder estudiar los efectos crónicos sin la implicación de los efectos de la administración aguda. En ese momento las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas con libre acceso a comida y sus respectivos líquidos de bebida, con el fin de obtener la orina de 24 horas.

Para estudiar los niveles plasmáticos de los principales componentes de esta mezcla de polifenoles, se prepararon otros cuatro grupos de ratas: control, RWP, DOCA-sal y DOCA-sal-RWP. Después de cinco semanas de tratamiento, las ratas fueron anestesiadas con una dosis intraperitoneal de 2,5 mL/Kg de equitensina dos horas después de la última administración de RWP, y la sangre se extrajo de la aorta abdominal. Las muestras de plasma se enviaron al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca para su análisis.

### **1.2.2. Experimento II: Efectos de los RWP sobre ratas SHR con deficiencia estrogénica.**

Se utilizaron ratas hembra SHR de 24 semanas de edad (laboratorios Harlam, Barcelona, España) a las que se alimentó con una dieta libre de soja (AIN, *American Institute of Nutrition*, 76). Algunas fueron anestesiadas y posteriormente se sometieron a ovariectomía (OVX). Tres semanas después de la cirugía las ratas operadas y aquellas que aún conservaban la función ovárica se dividieron al azar en los grupos OVX y control respectivamente (n = 6 a 9 en cada grupo):

CT-placebo

CT-RWPs

OVX-placebo

OVX-RWPs

La administración de RWPs se realizó durante 5 semanas vía oral, mediante sonda esofágica a dosis de 40 mg/Kg/día. Diariamente se controlaba la cantidad de alimento ingerida y el peso corporal se midió cada semana. El tratamiento con RWPs se mantuvo hasta 2 días antes de finalizar el estudio para poder estudiar los efectos crónicos sin la implicación de los efectos de la administración aguda. En ese momento las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas con libre acceso a comida y agua, con el fin de obtener orina de 24 horas.

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

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

#### **1.4. Parámetros morfológicos.**

Al final del periodo experimental, los animales se anestesiaron con 2.5 mL/Kg de equitesina (i.p.) y la sangre se recolectó de la aorta abdominal utilizando una jeringa heparinizada. Posteriormente se obtuvo el plasma mediante centrifugación de la sangre a 3000 r.p.m durante 10 minutos. El plasma se alicuotó y se almacenó a -80 °C hasta su utilización. Seguidamente, tras la exanguinación de los animales, se extrajeron los riñones, la aorta torácica y el corazón y en el caso del experimento II también el útero. A excepción de la aorta, que se utilizó inmediatamente para las pruebas de reactividad vascular que se describirán en detalle más adelante, estos órganos se lavaron en solución de Krebs fría y se secaron para ser pesados. Tras pesar el corazón se eliminaron las aurículas y el ventrículo derecho, para quedarnos con el ventrículo izquierdo limpio (más el septo), que se pesó de nuevo. Los índices de peso cardiaco, de ventrículo izquierdo y renal se calcularon dividiendo el peso de éstos entre el peso corporal.

#### **1.5. Determinaciones plasmáticas (experimento I).**

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

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

La mezcla se incubó durante 40 minutos en un baño a 45 °C, y posteriormente se volvió a mantener en hielo, para ser centrifugada a 4 °C durante 15 minutos a 14.000 r.p.m. Posteriormente, en una placa de 96 pocillos, se cargaron 100 µl de cada mezcla y se midió su absorbancia a 586 nm en un lector de placas (Microplate Reader Model

680XR, Bio-Rad). El cálculo del contenido de MDA se realizó mediante la interpolación de los valores obtenidos con una curva patrón de 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

### **1.5.2. Determinación de los niveles de ET-1.**

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

### **1.5.3. Niveles de polifenoles en plasma.**

El análisis de los compuestos fenólicos en plasma se llevó a cabo como describen Pignatelli *et al.*, (2006). Las muestras de plasma se incubaron con una solución de hidrólisis para obtener compuestos fenólicos libres. Brevemente 0,8 mL de plasma se mezclaron con 1,1 mL de buffer de acetato 100 mM (pH 5,0) que contenía 1.000 U de glucuronidasa y 100 U de sulfatasa. La mezcla se incubó durante 90 minutos a 37°C y seguidamente se extrajo tres veces con etilacetato. Tres mililitros de etilacetato se añadieron cada vez y la mezcla se agitó en vórtex durante 4 min. Tras centrifugar la mezcla durante 15 minutos a 3500g la capa superior se eliminó. Los extractos se combinaron y secaron bajo nitrógeno y el residuo se disolvió en 300 µl de una solución acuosa al 0.1% de ácido trifluoroacético. Las muestras se almacenaron a -30°C hasta el análisis. Se hizo un análisis por espectrometría de masa- cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High performance liquid chromatography*) que se llevó a cabo utilizando un equipo Hewlett-Packard 1100 provisto de bomba cuaternaria, inyector automático, detector diode array (DAD) y una estación de tratamiento. La columna era una Phenomenex (Torrance, CA, EEUU) ODS-2 C8, 3 µm (4,6×150 mm). Los disolventes eran (A) 2,5% ácido acético, (B) ácido acético/acetonitrilo (10/90, v/v), y (C) acetonitrilo de gradiente de grado. Se estableció el siguiente gradiente: 0–5 min, 100 % A – 100 % B; 5–30 min, 100 % B – 85 % B y 15 % C; 30–35 min, 85 % B y 15 % C – 50% B y 50 % C a una tasa de flujo de 0,5 mL/min. El análisis se lleva a cabo por

HPLC usando doble detección por espectrofotometría de diodos y espectrofotometría de masas (HPLC-DAD-MS). Los análisis de cromatografía líquida por espectrometría de masas se llevaron a cabo con un detector LC-MS Finningan LCQ MS detector (Thermoquest, San Jose, CA, EEUU) equipado con una fuente API, usando una interface de ionización por electrorrociado. El gas de la vaina y el gas auxiliar eran nitrógeno con tasas de flujo de 1,2 y 6 L/min, respectivamente. El voltaje del capilar y de la fuente eran de 4 V y 4,5 kV respectivamente, y la temperatura del capilar era de 195°C. El espectro se grabó en modo ion positivo. El espectrómetro se programó para grabar la espectrometría de masas del ión a  $m/z$   $[M+H]^+$  291. La presencia positiva de catequinas se estableció por la detección de fragmentos de iones característicos a  $m/z$  123, 139, 151, 165. Las catequinas detectadas se cuantificaron por las áreas de los picos grabados en el cromatograma de masas, por comparación con una curva de calibración preparada con (+)-catequina. El límite de cuantificación del método era de 0.01  $\mu$ M.

## **1.6. Determinaciones en orina.**

### **1.6.1. Determinación de 8-iso-prostaglandina (iso-PG) $F_{2\alpha}$ .**

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

### **1.6.2. Proteinuria.**

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



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

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

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

### **1.7. Detección *in situ* de la producción vascular de $O_2^{\cdot-}$ .**

La detección *in situ* de la producción vascular de radicales  $O_2^{\cdot-}$  se realizó mediante la técnica del dihidroetidio (DHE), previamente descrita (Lodi *et al.*, 2006). El DHE es un compuesto que entra en las células y es oxidado por los radicales  $O_2^{\cdot-}$  a etidio, el cual se une al DNA dando lugar a una fluorescencia de color rojo. Los anillos de la aorta torácica fueron incluidos en OTC (Tissue-Tek® OCT Compound, Sakura) y congelados (-80° C). Posteriormente se realizaron cortes histológicos de 10 µm de cada anillo en un criostato (Microm International Model HM500 OM), que se fijaron en portas con polilisina. Los cortes histológicos se llevaron a una cámara húmeda donde se incubaron en una solución de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacínil]- etanosulfónico (HEPES) tamponada (en mM: NaCl 130, KCl 5,  $MgCl_2$  1,2, glucosa 10 y HEPES 10, ajustado a

pH 7,3 con NaOH) durante 30 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se procedió a una nueva incubación con solución HEPES que contenía DHE ( $10^{-5}$  M) durante 30 minutos y en oscuridad. A continuación, las preparaciones se tiñeron con el marcador nuclear, dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI  $3 \times 10^{-7}$  M), durante 5 minutos en cámara húmeda, a 37 °C y en oscuridad. Cuatro secciones de cada preparación fueron examinadas en un microscopio de fluorescencia (Leica DM IRB, Wetzlar, Alemania) usando un objetivo de 40x con los siguientes pares de filtros de excitación/emisión: BP 340-380 nm/LP 425 nm de longitud de onda para visualizar la fluorescencia azul del DAPI, BP 450-490 nm/LP 515 nm para visualizar la autofluorescencia verde de la elastina y BP 545/30 nm/ BP 610/75 nm para visualizar la fluorescencia roja del etidio. Las secciones fueron fotografiadas con una cámara digital a color Leica DC300F, y las imágenes se grabaron para posterior análisis. Las condiciones de microscopio y cámara fueron mantenidas constantes para todas las preparaciones.

Las fluorescencias de etidio y DAPI fueron cuantificadas usando ImageJ (ver 1.32j, NIH, <http://rsb.info.nih/ij/>). La producción de  $O_2^-$  fue calculada de la relación entre la fluorescencia de etidio/DAPI. En experimentos preliminares, la fluorescencia del DHE fue prácticamente abolida por el captador de  $O_2^-$  tirón, indicando la especificidad de la reacción.

### **1.8. Actividad NADPH oxidasa (experimento I).**

La medida de la actividad NADPH oxidasa en anillos de aorta se realizó mediante quimioluminiscencia con lucigenina, como ya está descrito (Lodi *et al.*, 2006). La técnica consiste en colocar los anillos en tubos con solución salina fisiológica, cuya composición es la siguiente (en mM): 119 NaCl, 20 HEPES, 4,6 KCl, 1 MgSO<sub>4</sub>, 0,15 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 CaCl<sub>2</sub>, y 5,5 glucosa con un pH = 7,4. La producción de radicales  $O_2^-$  fue estimulada mediante la adición de NADPH (100µM) a los anillos a la hora de realizar la medida. La lucigenina fue inyectada automáticamente

por el luminómetro a una concentración final de 5 $\mu$ M. La producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> fue medida mediante los cambios de luminiscencia registrados durante 200 segundos en el luminómetro (Lumat LB 9507, Berthold, Alemania) a intervalos de 5 segundos. Posteriormente los anillos fueron desecados y pesados. La medida de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se expresa como unidades relativas de luminiscencia (RLU)/minuto/miligramo de tejido aórtico seco.

## **1.9. Western blot.**

### *Experimento I.*

Para analizar la expresión proteica de p47<sup>phox</sup>, mediante el análisis por western blot, los anillos aórticos de los diferentes grupos, conservados a -80 °C, fueron homogeneizados en frío mediante un potter de cristal. La composición del tampón de homogeneización utilizado (pH 8) fue: HEPES 10 mM, KCl 10 mM, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM, ácido etilenglicol tetracético (EGTA) 1 mM, ditiotreitól (DTT) 1 mM, aprotinina 40  $\mu$ g/mL, leupeptina 4  $\mu$ g/mL, N- $\alpha$ -para-tosil-L-lisina clorometilamina 4  $\mu$ g/mL, NaF 5 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 10 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 0,5 mM, ácido okadaico 10 nM e igepal al 1%.

### *Experimento II.*

Para la determinación de eNOS, receptor 1 de Ang II (AT-1) y caveolina-1 la composición del tampón de homogeneización utilizado (pH 7.4) fue: HEPES 10 mM, sacarosa 320 mM, EDTA 100  $\mu$ M, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM y leupeptina 4  $\mu$ g/mL. Para la determinación de la subunidad p22<sup>phox</sup> de la enzima NADPH oxidasa, la composición del tampón de homogeneización utilizado (pH 7,5) fue: HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM,  $\beta$ -glicerolfosfato 40 mM, DTT 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 20  $\mu$ g/mL y leupeptina 20  $\mu$ g/mL. Para analizar la expresión proteica de p47<sup>phox</sup> se utilizó el tampón previamente descrito.

La expresión proteica fue medida en el sobrenadante de los homogenados aórticos tras 30 minutos de centrifugación a 14000 r.p.m a 4 °C. La cantidad de proteína por muestra se determinó mediante la técnica de Bradford. Las proteínas fueron entonces suspendidas en tampón de carga y desnaturalizadas mediante calor durante 5 minutos. Se añadieron 50 µg de proteína por pocillo. Se utilizaron geles de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida (al 10 % para p47<sup>phox</sup> y AT-1, al 15 % para p22<sup>phox</sup> y caveolina-1 y al 8 % para eNOS) para correr homogenizado de aorta y la electroforesis se realizó en un sistema de minigeles (Bio-Rad Laboratories S.A., Madrid, Spain). Las proteínas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Posteriormente se realizó el bloqueo de las membranas con TBS-T + 5% de leche desnatada durante 1 hora y 30 minutos. Luego fueron incubadas con el anticuerpo primario policlonal de ratón anti-p47<sup>phox</sup> (dilución 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, EEUU), el policlonal de cabra anti-p22<sup>phox</sup> (dilución 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, EEUU), el policlonal de ratón anti-AT-1 (dilución 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, EEUU), el policlonal de ratón anti-eNOS o el policlonal de ratón anti-caveolina-1 (dilución 1:1000, Transduction Laboratories, EEUU) durante toda la noche, en agitación y a 4 °C. Se realizaron tres lavados de las membranas con TBS-T durante 5 minutos y finalmente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (dilución 1:2000, Sigma-Aldrich, Madrid, España) durante 1 hora, en agitación y a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo las membranas de la forma arriba descrita, la unión del anticuerpo a la proteína se detectó mediante su incubación durante un minuto con un sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) y una película autorradiográfica para ver la quimioluminiscencia. Las películas fueron escaneadas y la densidad de las bandas fue analizada. Las películas se escanearon y se realizó en estas imágenes un análisis densitométrico usando el software Scion Image-Release Beta 4.02. ([http:// www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com)).

Como un control adicional las membranas se reutilizaron para estudiar la expresión de  $\alpha$ -actina. Finalmente se calculó la relación entre la intensidad de banda para p47<sup>phox</sup>,

p22<sup>phox</sup>, AT-1, eNOS y caveolina-1 y la correspondiente  $\alpha$ -actina de cada muestra. Los datos se expresaron como la relación entre la abundancia de proteína/ $\alpha$ -actina, para el experimento I, o como el porcentaje de dicha relación respecto al grupo CT-placebo en el caso del experimento II.

### **1.10. Reacción en cadena de la polimerasa.**

El RNA se extrajo de aorta por homogenización y se convirtió a DNA complementario (cDNA) por métodos estándar. La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo con un termociclador Techne Techgene (Techne, Cambridge, Reino Unido). La desnaturalización inicial se hizo a 95°C durante 3 minutos y le siguieron de 30 a 40 ciclos de amplificación (30 para caveolina-1, p22<sup>phox</sup> y eNOS, 32 para AT-1 y 40 para p47<sup>phox</sup>). Cada ciclo consiste de un minuto de desnaturalización a 94°C, 45s de unión del cebador a la cadena de cDNA a 60°C para p47<sup>phox</sup> o 55°C para p22<sup>phox</sup> o caveolina-1, 77°C para AT-1 o 63°C para eNOS y un minuto para la amplificación del gen a 72°C. Tras el ciclo final la temperatura se mantuvo a 72°C durante 10 minutos para permitir la hibridación de los productos amplificados. Los productos de la RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) fueron fraccionados por tamaño en un gel de agarosa al 1,5%, y las bandas se visualizaron con bromuro de etidio y se cuantificaron por análisis densitométrico sobre las imágenes escaneadas con el programa Scion Image Release Beta 4.02 software (<http://www.scioncorp.com>).

#### *Experimento I.*

Las secuencias para los cebadores de p47<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> se seleccionaron de acuerdo a las secuencias publicadas en el Banco de Genes y son las que siguen: p47<sup>phox</sup> (191 pares de bases) sense, 5'-CCCAGCGACAGATTAGAAGC -3' y antisense, 5'-TGGATTGTCCTTTGAGTCAGG -3'; p22<sup>phox</sup> (220 pares de bases) sense 5'-GCGGTGTGGACAGAAGTACC- 3' y antisense, 5'-CTTGGGTTTAGGCTCAATGG- 3'. La  $\beta$ -actina, un gen que se expresa de manera

constitutiva, se eligió como control para el experimento I. La secuencia para la  $\beta$ -actina (200 pares de bases) era sense 5'-AATCGTGCGTGACATCAAAG-3' y antisense, 5'-ATGCCACAGGATTCCATACC -3'.

### *Experimento II.*

Las secuencias para los cebadores de p47<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup> son las anteriormente descritas. Las secuencias de los cebadores de caveolina-1, AT-1 y eNOS son las que siguen: caveolina-1 (304 pares de bases) sense, 5'- TCTACAAGCCCAACAACAAGG-3' y antisense, 5'- AGGAAAGAGAGGATGGCAAAG-3'; AT-1 (452 pares de bases) sense 5'- ACCCTCTACAGCATCATCTTTGTGGTGGGG-3' y antisense, 5'- GGGAGCGTCGAATTCCGAGACTCATAATGA-3'; eNOS (164 pares de bases) sense 5'- CGAGATATCTTCAGTCCCAAGC-3' y antisense 5' GTGGATTTGCTGCTCTCTAGG-3'. La GADPH se usó como control para la amplificación. Las señales se expresaron relativas a la intensidad de la GADPH en cada muestra del experimento II.

### **1.11. Estudios de reactividad vascular.**

Tras el sacrificio de los animales y posterior exanguinación, la arteria aorta fue cuidadosamente extraída desde el diafragma hasta el cayado aórtico y depositada en una placa Petri que contenía solución de Krebs (con una composición en mM de: NaCl 118, KCl 4,75, NaHCO<sub>3</sub> 25, MgSO<sub>4</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 y glucosa 11). Seguidamente se eliminaron los restos de tejido conjuntivo y adiposo adheridos a la aorta y ésta se dividió en segmentos de unos 3 mm de longitud para proceder a su montaje en un sistema de baño de órganos. Para ello se introdujeron en el lumen de dichos anillos dos alambres rígidos de acero inoxidable con forma de L, de 0,2 mm de diámetro, uno de los cuales se fijó a la pared del baño, y otro que podía desplazarse paralelo al anterior hacia arriba y abajo, se conectó a un transductor isométrico de fuerza-desplazamiento (Letigraph 2000, Cibertec S.A., Madrid) (Galisteo et al. 2004). Los baños de órganos

contenían 5 mL de la solución de Krebs, mantenida a 37 °C y constantemente burbujeada con O<sub>2</sub> al 95% y CO<sub>2</sub> al 5% (gas carbógeno) para mantener un pH comprendido entre 7,3 y 7,4. Los anillos fueron sometidos a una tensión de 2 g y se dejaron estabilizar durante 60-90 minutos antes de la adición de los fármacos. Posteriormente fueron retensionados según las necesidades para mantener la tensión final estable de 2 g. En algunos experimentos se eliminó el endotelio de los anillos de forma mecánica mediante una ligera fricción de éstos con un alambre de acero inoxidable insertado en el lumen.

### **Protocolos Experimentales.**

#### *Experimento I.*

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

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

#### *Experimento II.*

Se llevaron a cabo los mismos protocolos que en el experimento I, para evaluar la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio e independiente de endotelio, con la diferencia de que se utilizó fenilefrina ( $10^{-6}$  M) como agente vasoconstrictor.

Para evaluar la respuesta contráctil a Ang II, en anillos sin endotelio, se llevó a cabo una curva concentración-respuesta a dicho compuesto adicionando concentraciones acumulativas ( $10^{-10}$  –  $10^{-6}$  M).

Para evaluar la formación basal de NO se midió la contracción inducida por fenilefrina ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M) tras 30 minutos de incubación con el inhibidor de la NOS, L-NAME, ( $10^{-4}$  M) (Schiffrin et al., 2001, Galisteo et al., 2004).

### **1.12. Reactivos.**

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

### **1.13. Análisis estadístico.**

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



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

### **2.1. Polifenoles objeto de estudio.**

La mezcla de polifenoles de vino tinto proporcionada por Mr. D. Ageron (Société Francaise de Distillerie, Vallont Pont d'Arc, Francia), fue la misma que la ya nombrada en los experimentos *in vivo* en el apartado 1.1. (Fig. 3).

### **2.2. Animales de experimentación.**

Se utilizaron ratas macho Wistar de 200-250 gramos. Fueron mantenidas en el animalario cinco ratas por batea, con libre acceso a una dieta estándar y agua corriente, a una temperatura constante de  $24 \pm 1$  °C y con un ciclo de luz- oscuridad de 12 horas. Todos los experimentos fueron llevados a cabo según las Guías Institucionales para el cuidado ético de los animales.

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

Para la realización de los experimentos, las ratas fueron sacrificadas mediante la administración de una dosis letal de pentobarbital sódico (120 mg/Kg intraperitoneal). La aorta torácica descendiente fue extraída y limpiada como previamente hemos descrito (apartado 1.11.). Seguidamente, los anillos fueron incubados en solución de Krebs durante 4 horas en un incubador de células en ausencia o presencia de ET-1 ( $10^{-9}$  M) y en presencia de RWPs ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  g/L) o apocinina ( $10^{-4}$  M).

En experimentos previos se comprobó que la ET-1 induce disfunción endotelial a partir de las 2 horas de incubación. Una vez finalizada la incubación, los anillos aórticos fueron inmediatamente usados para las pruebas de reactividad vascular o para la medida de la producción vascular de  $O_2^{\cdot-}$ . En otras ocasiones los anillos también eran congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C para analizar la expresión proteica por

western blots o génica por PCR, o incluidos en OCT “optimal cutting temperature” (Tissue-Teck<sup>®</sup> OCT compound, Sakura) y después congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C para posteriormente llevar a cabo el análisis de la producción *in situ* de O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

## **2.4. Estudios de reactividad vascular.**

Tras el periodo de incubación ya mencionado en el punto 2.3., los anillos aórticos se montaron en un sistema convencional de baño de órganos como hemos descrito previamente para los experimentos *in vivo*.

### **Protocolos experimentales.**

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

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

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

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

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

**2.4.6.** Para determinar si la activación de receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR, *peroxisome proliferator activator receptor*)  $\gamma$  está implicada en el efecto protector que ejercen los RWPs en la disfunción endotelial inducida por ET-1, los anillos aórticos se co-incubaron con el antagonista de PPAR $\gamma$  GW9662 (1  $\mu$ M, Fu *et al.*, 2001) en presencia de ET-1 ( $10^{-9}$  M) y de RWPs ( $10^{-2}$  g/L) durante 4 horas. Para después llevar a cabo la correspondiente precontracción con fenilefrina ( $10^{-7}$  M- $10^{-6}$  M) y curva concentración-respuesta de relajación a Ach ( $10^{-9}$  M- $10^{-4}$  M).

**2.4.7.** Para analizar cuál de los componentes de la mezcla polifenólica podía ser el responsable del efecto protector frente a la disfunción endotelial inducida por ET-1, los anillos aórticos se incubaron en presencia de ET-1 ( $10^{-9}$  M) y epicatequina ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  M) o catequina ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  M) o resveratrol ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  M) durante 4 horas. Después se llevó a cabo la correspondiente precontracción con fenilefrina ( $10^{-7}$  M- $10^{-6}$  M) y curva concentración-respuesta de relajación a Ach ( $10^{-9}$  M- $10^{-4}$  M).

### **2.5. Detección *in situ* de la producción vascular de $O_2^{\cdot-}$ .**

Utilizamos dihidroetidido para localizar la producción *in situ* de  $O_2^{\cdot-}$  en secciones aórticas. El DHE entra en las células y es oxidado por el  $O_2^{\cdot-}$  para formar etidio, que se une al DNA para producir una fluorescencia brillante de color rojo. Anillos aórticos (de 2 - 3 mm), previamente incubados en las condiciones ya conocidas, fueron incluidos en OCT, y siguieron el mismo tratamiento mencionado en el apartado 1.7. La producción de  $O_2^{\cdot-}$  fue calculada de la relación entre la fluorescencia de etidio/DAPI.

### **2.6. Actividad NADPH oxidasa.**

La medida de la producción de radicales  $O_2^{\cdot-}$  en los anillos de aorta se realizó mediante quimioluminiscencia con lucigenina ( $5\mu\text{M}$ ), mediante la técnica descrita en el punto 1.8. Tras la incubación de 4 horas en las condiciones previamente descritas los cambios en la liberación de  $O_2^{\cdot-}$  se determinaron midiendo la luminiscencia de la lucigenina con un luminómetro (Lumat LB 9507, Berthold, Alemania) durante 200 segundos en intervalos de 5 segundos. Posteriormente, los anillos fueron desecados y se determinó su peso en seco. La producción de  $O_2^{\cdot-}$  se expresó como unidades relativas de luminiscencia (RLU)/minuto/mg de tejido aórtico seco.

## **2.7. Western Blot.**

Para analizar la expresión proteica de p47<sup>phox</sup> mediante el análisis por western blot, los anillos aórticos se sometieron al mismo proceso que se describe en el apartado 1.9. Se calculó la relación entre la intensidad de banda para p47<sup>phox</sup> y la correspondiente  $\alpha$ -actina de cada muestra. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de dicha relación respecto al grupo control.

Para evaluar la participación de las principales proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) en la vía de señalización implicada en el aumento de la producción vascular de O<sub>2</sub><sup>-</sup> inducida por ET-1, determinamos la expresión proteica de fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 en anillos aórticos incubados con ET-1 (10<sup>-9</sup> M) en presencia o ausencia de RWP (10<sup>-3</sup> g/L) durante una hora. Para analizar la expresión proteica de fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 mediante el análisis por western blot, los anillos aórticos de los diferentes grupos, conservados a -80 °C, fueron homogeneizados en frío mediante un potter de cristal. La composición del tampón de homogeneización utilizado (pH 7,5) fue: HEPES 20 mM, EGTA 10 mM,  $\beta$ -glicerol fosfato 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, DTT 1 mM, aprotinina 40  $\mu$ g/mL, leupeptina 4  $\mu$ g/mL, iodometamida 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, PMSF 0,5 mM e igepal al 1%. La expresión proteica de fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 fue medida en el sobrenadante de sus homogenados aórticos tras 30 minutos de centrifugación a 13000 r.p.m. a 4 °C.

Los western blots se llevaron a cabo con 25  $\mu$ g de proteína. La electroforesis se realizó en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Se siguieron los mismos pasos según el método descrito anteriormente (apartado 1.9.). Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario policlonal de conejo ERK1/2 (dilución 1:1000, Cell Signaling Technology), o con el anticuerpo primario monoclonal de ratón fosfo-ERK1/2 (dilución 1:1000, Sigma-Aldrich), toda una noche a 4 °C. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo secundario caprino anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:2000, Sigma-Aldrich) para determinar ERK1/2, y con anticuerpo secundario caprino anti-ratón conjugado con peroxidasa (1:2000, Sigma-Aldrich) para determinar fosfo-ERK1/2. De

nuevo, la detección y la medida de las bandas se realizó de manera similar a la descrita en el apartado 1.9. Se calculó la relación entre la intensidad de banda para fosfo-ERK1/2 y su correspondiente ERK1/2 de cada muestra. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de dicha relación de cada grupo con respecto al grupo control.

### **2.8. Reacción en cadena de la polimerasa.**

Para analizar la expresión génica de p47<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, caveolina-1 y eNOS (secuencias de los cebadores en el apartado 1.10.) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), el RNA total fue extraído mediante homogenización y siguió el mismo tratamiento que se describe en el apartado 1.10. Los productos amplificados por la RT-PCR fueron separados a través de un gel de agarosa al 1,5%, y las bandas fueron visualizadas con bromuro de etidio y cuantificadas mediante análisis densitométrico de las imágenes escaneadas usando el software Scion Image-Release Beta 4.02 (<http://www.scioncorp.com>).

### **2.9. Reactivos.**

Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical, exceptuando la mezcla de polifenoles de vino tinto (Provinol®), proporcionada por Mr. D. Ageron (Société Francaise de Distillerie, Vallont Pont d'Arc, Francia).

### **2.10. Análisis estadístico.**

Los resultados se expresaron como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (SEM, *standard error of mean*). Diferencias significativas entre grupos fueron calculadas mediante el test de la t de Students.  $P < 0,05$  fue considerada estadísticamente significativa.



**Resultados.**

---

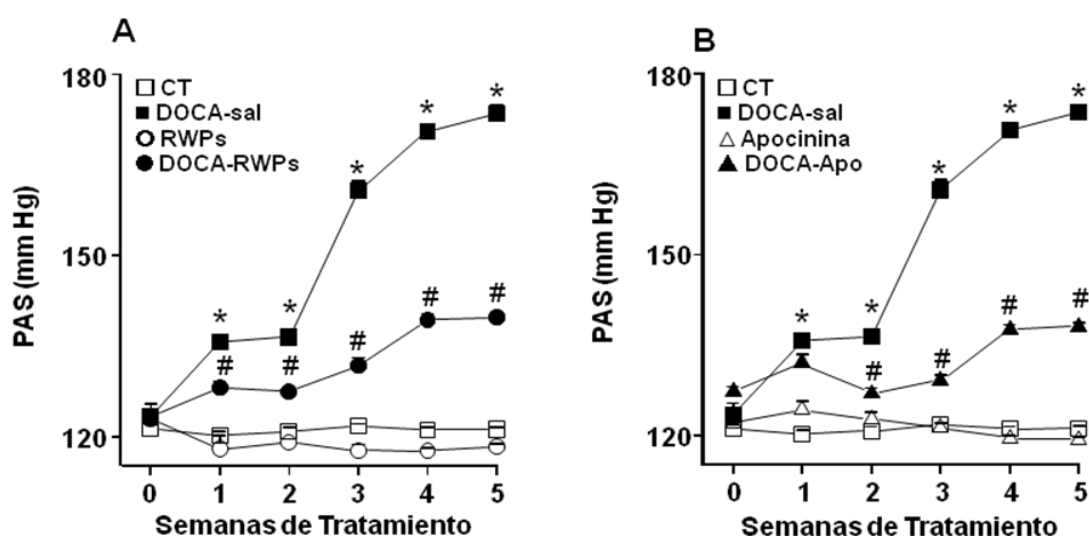




## 1. Efectos de los RWP's sobre la hipertensión DOCA-sal.

### 1.1. Efectos sobre la presión arterial.

Las ratas que recibieron el tratamiento DOCA-sal mostraron un aumento progresivo en la presión arterial sistólica (PAS) en comparación con el grupo control (Fig. 4). Este incremento fue significativo ( $P < 0.05$ ) desde la primera semana, alcanzando una diferencia de aproximadamente 40 mmHg al final del tratamiento. El tratamiento crónico con RWP's o apocinina previno ( $P < 0.05$ ) el incremento de la PAS (aproximadamente un 68% y 78% respectivamente) en las ratas con el tratamiento DOCA-sal desde la primera semana. Un pequeño descenso de la PAS se observó en animales control tratados con RWP's en la tercera semana de tratamiento.



**Figura 4.** Efectos del tratamiento crónico con RWP's (A) o apocinina (B) sobre la evolución en el tiempo de la presión arterial sistólica (PAS), medida por pletismografía en la cola. Grupos experimentales: control (□) ( $n = 10$ ), DOCA (■) ( $n = 10$ ), RWP's (○) ( $n = 10$ ), DOCA-RWP's (●) ( $n = 7$ ), apocinina (△) ( $n = 10$ ), y DOCA-apocinina (▲) ( $n = 9$ ). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  comparado con el grupo control. # $P < 0,05$  comparado con el grupo DOCA.

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

Los valores de peso corporal y los índices cardíaco y renal y la proteinuria se muestran en la Tabla 1. Al final del tratamiento las ratas DOCA-sal mostraron un incremento significativo del índice de peso cardíaco ( $\approx 25\%$ ), del ventrículo izquierdo ( $\approx 24\%$ ) y renal ( $\approx 83\%$ ), comparado con las ratas control. No se observaron modificaciones de estos parámetros en las ratas que recibieron tratamiento DOCA-sal junto con RWPs o apocinina. Sin embargo, tanto el tratamiento con RWPs como con apocinina redujo la marcada proteinuria detectada en las ratas DOCA-sal.

**Tabla 1.** Peso corporal y de órganos. Índices cardíaco y renal. Proteinuria.

| Grupos             | PC<br>(g)       | PCo<br>(mg)     | PVI<br>(mg)    | PR<br>(mg)                   |
|--------------------|-----------------|-----------------|----------------|------------------------------|
| Control            | 352±8           | 835±29          | 593±17         | 883±27                       |
| RWPs               | 333±6           | 780±22          | 543±15         | 828±21                       |
| Apocinina          | 335±5           | 798±15          | 551±9#         | 837±21                       |
| DOCA-sal           | 299±10*         | 875±26          | 621±22         | 1371±46*                     |
| DOCA-sal-RWPs      | 287±8*          | 822±28          | 578±16         | 1223±40#*                    |
| DOCA-sal-Apocinina | 298±7*          | 893±34          | 620±16         | 1302±75*                     |
| Grupos             | PCo/PC<br>Ratio | PVI/PC<br>Ratio | PR/PC<br>Ratio | Proteinuria<br>(mg/100g/24h) |
| Control            | 2,37±0,06       | 1,69±0,04       | 2,51±0,06      | 8,1±2,2                      |
| RWPs               | 2,35±0,06       | 1,63±0,04       | 2,49±0,06      | 13,7±2,1                     |
| Apocinina          | 2,39±0,05       | 1,65±0,02       | 2,50±0,07      | 14,5±2,7                     |
| DOCA-sal           | 2,95±0,13*      | 2,10±0,12*      | 4,60±0,14*     | 27,5±7,2*                    |
| DOCA-sal-RWPs      | 2,87±0,13*      | 2,02±0,07*      | 4,27±0,16*     | 12,2±2,1#                    |
| DOCA-sal-Apocinina | 3,01±0,11*      | 2,09±0,06*      | 4,36±0,20*     | 8,2±1,6#                     |

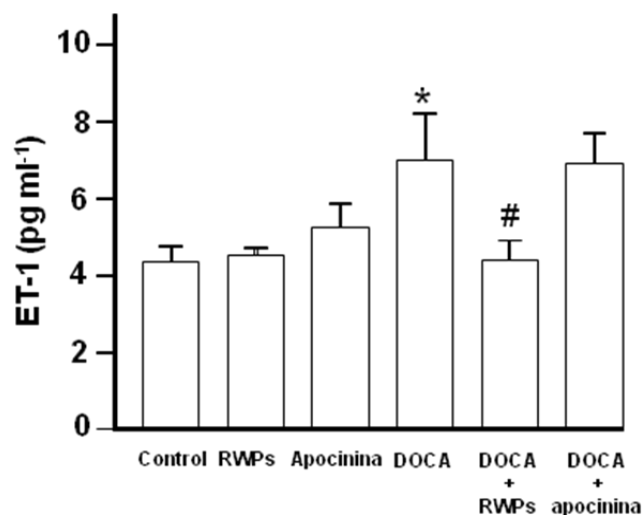
PC, peso corporal; PCo, peso corazón; PVI, peso ventrículo izquierdo; PR, peso riñón. La proteinuria se expresó como miligramos de proteína excretados por 100 g de rata durante 24 horas. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM. Control ( $n = 10$ ), RWP ( $n = 10$ ), Apocinina ( $n = 10$ ), DOCA ( $n = 10$ ), DOCA-RWP ( $n = 7$ ), DOCA-Apocinina ( $n = 9$ ). \* $P < 0,05$  comparado con el grupo control. # $P < 0,05$  comparado con el grupo DOCA-sal.

### **1.3. Efectos sobre la concentración de polifenoles en plasma.**

Los análisis de plasma por HPLC y espectrometría de masas revelaron la presencia de catequinas (catequina y epicatequina) en las muestras de plasma de las ratas (control o DOCA-sal) tratadas con RWPs mientras que no se detectaron catequinas en ninguna de las muestras correspondientes a los animales no tratados. La cantidad de catequinas detectadas fue siempre inferior (aunque alrededor) del límite de cuantificación del método empleado, lo que significa que sus concentraciones en plasma eran inferiores a 0,01  $\mu\text{M}$ . No se detectaron ni dímeros ni oligómeros mayores de catequina en ninguna de las muestras de plasma, lo que nos sugiere que en este modelo sólo hay catequinas monoméricas biodisponibles.

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

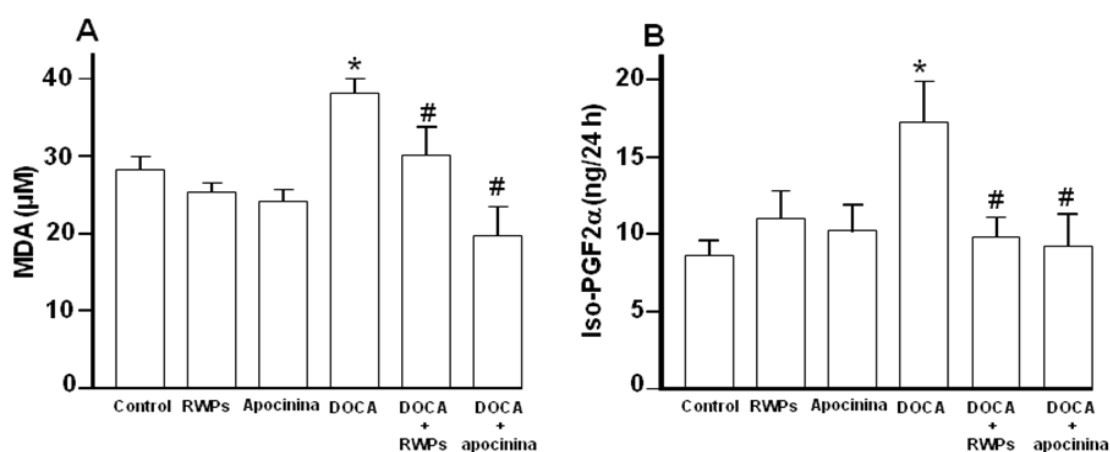
Los niveles de ET-1 en plasma fueron significativamente mayores en las ratas con el tratamiento DOCA-sal que en las ratas control. El tratamiento crónico de las ratas DOCA-sal con RWPs redujo los niveles de ET-1 a valores similares a aquellos encontrados en el grupo control. Sin embargo, la apocinina no pudo prevenir la acumulación plasmática de ET-1 en los animales DOCA-sal (Fig. 5).



**Figura 5.** Niveles plasmáticos de ET-1 de todos los grupos experimentales. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 7-10$ ). \* $P < 0,05$  comparado con el grupo control. # $P < 0,05$  comparado con el grupo DOCA.

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

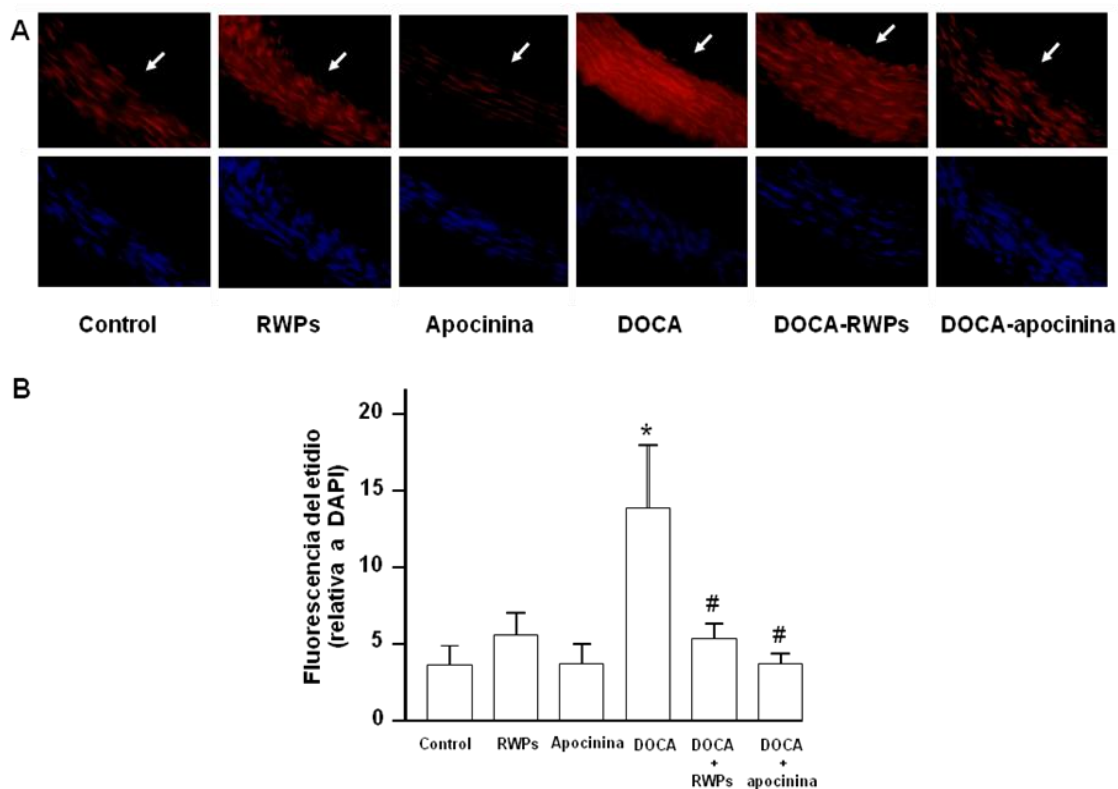
Los niveles plasmáticos de MDA, un marcador de peroxidación lipídica producido por ROS, de los animales con el tratamiento DOCA-sal se incrementaron con respecto al grupo control. En los grupos DOCA-sal tratados con RWPs o apocinina, la concentración de MDA se vio reducida a niveles similares a los encontrados en ratas control (Fig. 6A). La excreción urinaria en 24h de iso-PGF<sub>2α</sub>, un marcador más específico de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, también estaba incrementado en el grupo DOCA-sal. En los grupos DOCA-sal con RWPs y apocinina, la excreción de iso-PGF<sub>2α</sub> mostró valores similares a aquellos encontrados en las ratas control (Fig. 6B).



**Figura 6.** Niveles plasmáticos de MDA (A) y excreción urinaria de iso-PGF<sub>2α</sub> en 24 horas (B) de todos los grupos experimentales. Valores expresados como la media ± SEM (n = 7-10). \*P < 0,05 comparado con el grupo control. #P < 0,05 comparado con el grupo DOCA.

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

Para caracterizar y localizar la producción de  $O_2^-$  en la pared vascular, la fluorescencia roja del etidio se analizó en cortes histológicos de aorta incubados con DHE. Se sabe que el DHE se oxida por la acción del  $O_2^-$  que produce etidio que tiñe el DNA. La producción de  $O_2^-$  tiene lugar en toda la pared vascular (adventicia, media y células endoteliales) (Fig. 7A). La fluorescencia del etidio se cuantificó y los resultados se normalizaron con la fluorescencia azul del marcador nuclear DAPI. (Fig. 7B). La fluorescencia roja fue suprimida casi totalmente cuando las secciones se incubaron durante 30 minutos con tirón (10mM), un captador intracelular de  $O_2^-$ . Los anillos de las ratas DOCA-sal mostraron mayor fluorescencia en toda la pared vascular comparado con las ratas control. El tratamiento crónico con RWPs o con apocinina previno el incremento en la fluorescencia roja a etidio incrementada en el grupo DOCA-sal.

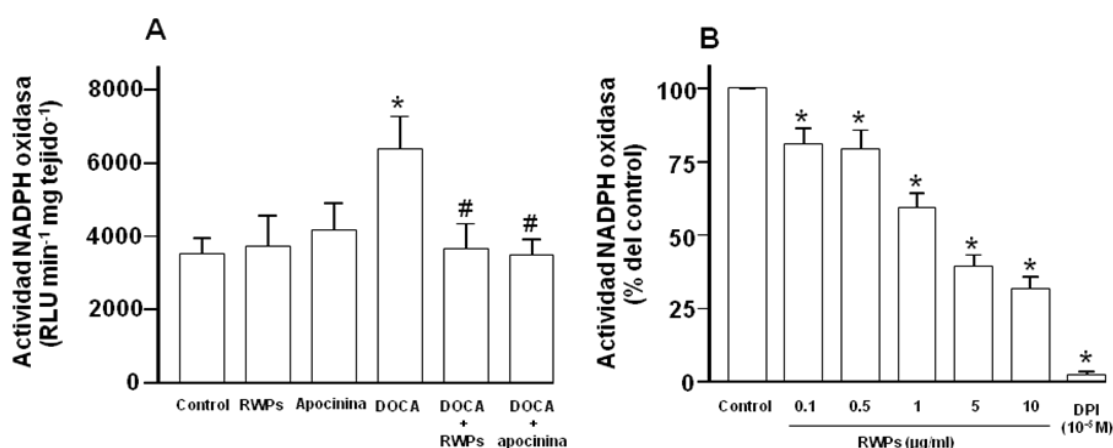


**Figura 7.** Localización *in situ* de la producción de  $O_2^-$  en anillos aórticos de todos los grupos experimentales. (A) Las fotografías en la parte superior muestran cortes histológicos de arterias incubadas en presencia de dihidroetidio (DHE) que produce fluorescencia roja cuando se oxida a etidio por el anión  $O_2^-$ . Las fotografías en la parte inferior muestran los mismos cortes histológicos con fluorescencia azul por el marcador nuclear dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ( $\times 40$  aumentos). El lumen viene indicado por la flecha. (B) Valores promedio, media  $\pm$  SEM ( $n = 3-4$ ), de la fluorescencia roja del etidio normalizada respecto a la fluorescencia azul del DAPI. \* $P < 0,05$  comparado con el grupo control. # $P < 0,05$  comparado con el grupo DOCA.



### 1.7. Efectos sobre la actividad NADPH oxidasa.

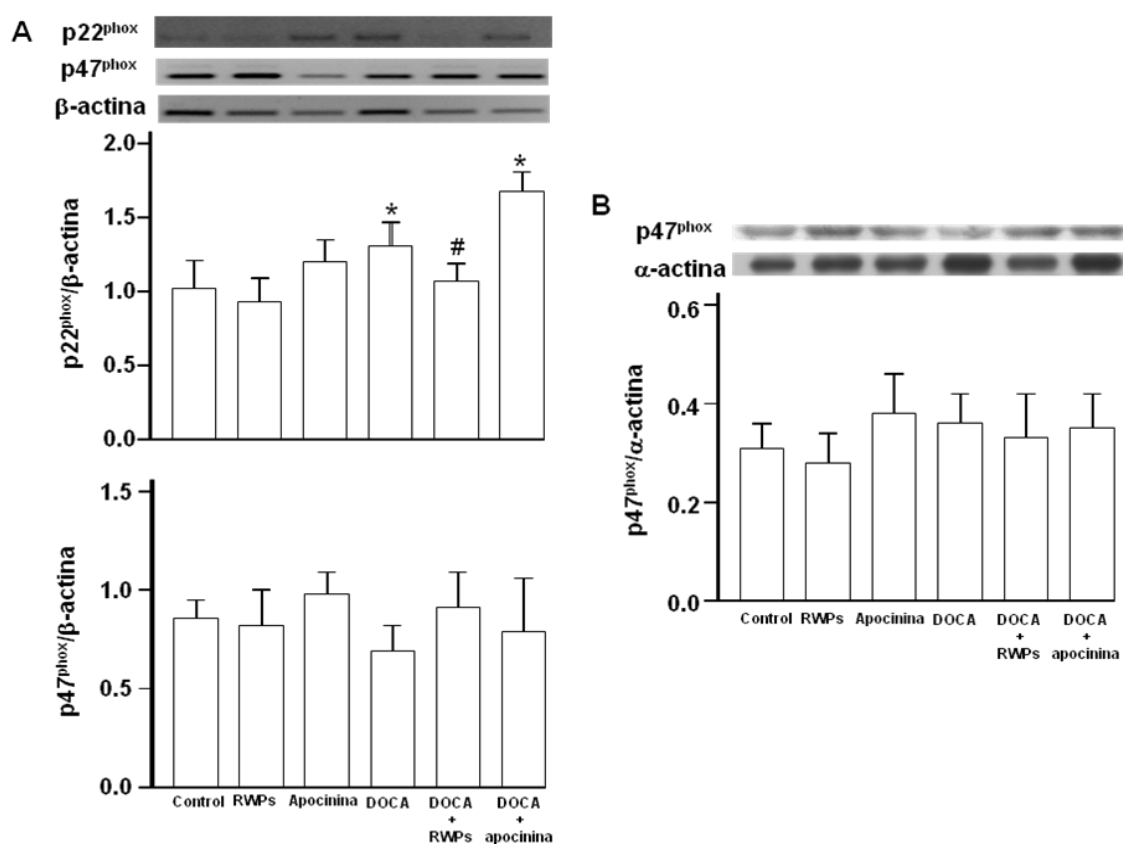
El NADPH incrementa la quimioluminiscencia con lucigenina en anillos aórticos normales, lo que fue prácticamente suprimido por incubación previa de 30 minutos con el inhibidor de flavoproteínas DPI (10  $\mu\text{M}$ ) o con el inhibidor selectivo de la NADPH oxidasa apocinina (100  $\mu\text{M}$ ), lo que demuestra que el NADPH externo aumenta la actividad NADPH oxidasa en tejido vascular. La actividad NADPH oxidasa se vio incrementada en anillos aórticos de ratas DOCA-sal, comparado con las ratas control. El tratamiento crónico con RWPs o apocinina redujo significativamente dicha actividad sólo en los animales con tratamiento DOCA-sal, no teniendo efecto en animales control (Fig. 8A). En otros experimentos, la actividad NADPH oxidasa medida en homogenado de cultivos de células de músculo liso vascular obtenidas de ratas control fue de  $1197 \pm 361 \times 10^3$ . Los RWPs de manera concentración dependiente disminuyeron la actividad NADPH oxidasa (Fig. 8B).



**Figura 8.** Actividad NADPH oxidasa medida por luminiscencia con lucigenina. En (A) anillos aórticos de todos los grupos experimentales, y en (B) homogenados de cultivos celulares de músculo liso vascular aórtico de ratas control incubados durante 30 min con RWPs o el inhibidor de NADPH oxidasa DPI. Los resultados son la media  $\pm$  SEM, el número de anillos aórticos en (A) era de 7-10, y el número de experimentos en (B) fue 5, con células de tres aortas diferentes. En (A) \* $P < 0,05$  comparado con el grupo control. #  $P < 0,05$  comparado con el grupo DOCA-sal. En (B) \* $P < 0,05$  comparado con homogenado de cultivos celulares de musculatura lisa vascular aórtica de controles no tratados.

### 1.8. Efectos sobre la expresión génica y proteica de subunidades de la NADPH oxidasa.

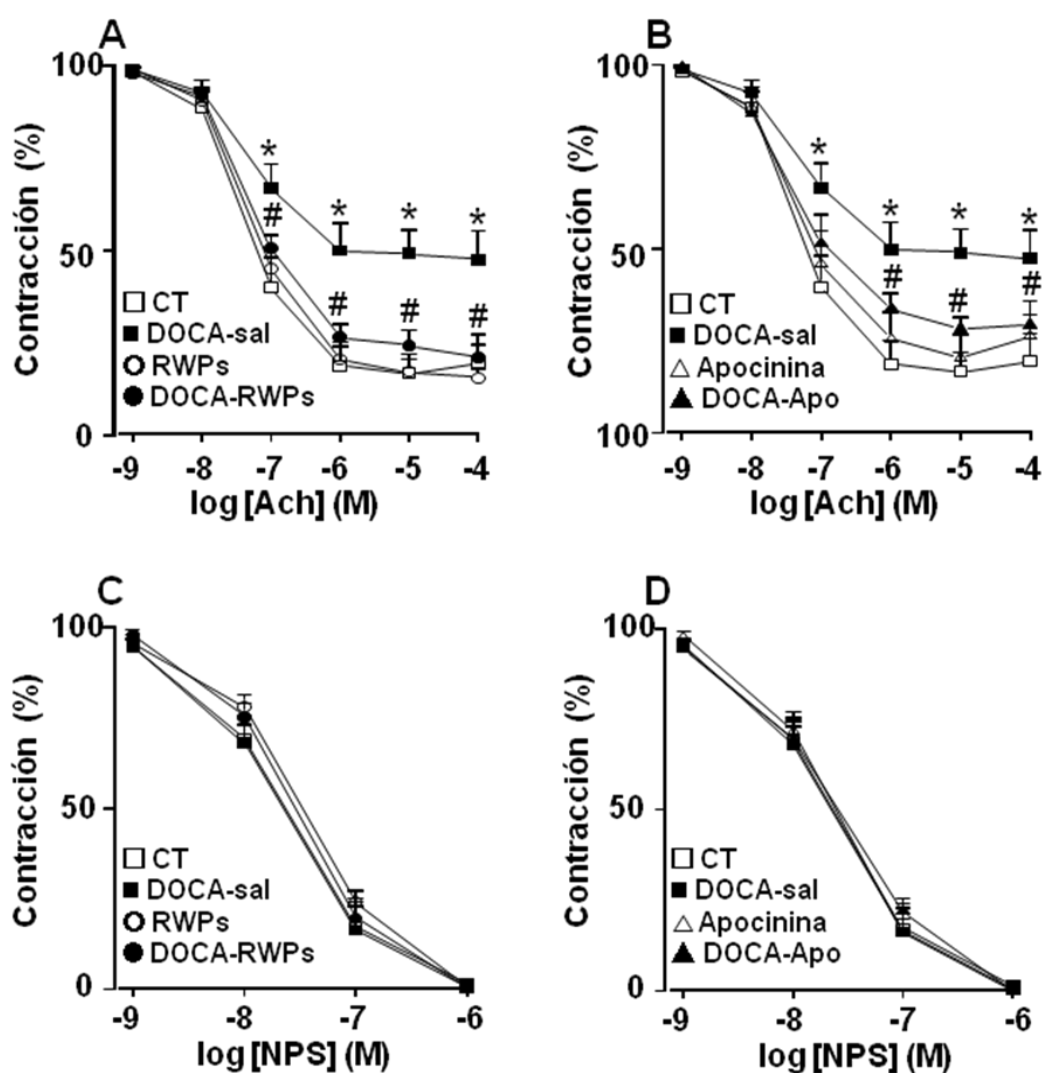
En tejido aórtico de ratas DOCA-sal hubo una mayor expresión génica de  $p22^{phox}$ , sin cambios en la expresión de  $p47^{phox}$  comparado con las ratas control (Fig. 9A). La expresión proteica de  $p47^{phox}$  también fue similar en animales DOCA-sal y control (Fig. 9B). Los RWPs fueron capaces de inhibir la mayor expresión de  $p22^{phox}$  en ratas DOCA-sal, pero la apocinina no.



**Figura 9.** Expresión vascular génica y proteica de subunidades de la NADPH oxidasa en (A) productos representativos de RT-PCR ( $p22^{phox}$  y  $p47^{phox}$ ) de RNA total extraído de arterias de todos los grupos experimentales. Los histogramas representan valores densitométricos respecto a la  $\beta$ -actina ( $n = 3$ ). (B) Expresión proteica de  $p47^{phox}$  total en anillos aórticos de todos los grupos experimentales. \* $P < 0,05$  comparado con el grupo control. # $P < 0,05$  comparado con el grupo DOCA.

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

Anillos aórticos de animales tratados con DOCA-sal mostraron una fuerte reducción de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio a Ach en arterias estimuladas con noradrenalina en comparación con los anillos control (Fig. 10). Los anillos aórticos obtenidos de ratas DOCA-sal tratadas con RWPs (Fig. 10A) y apocinina (Fig. 10B) mostraron un incremento significativo de la vasodilatación inducida por Ach comparado con los animales DOCA-sal. No se observaron efectos significativos en los anillos de las ratas control tratadas con RWPs y apocinina respecto a los controles no tratados. Tampoco se observaron diferencias en la respuesta vasodilatadora independiente de endotelio al donador de NO, NPS, en arterias precontraídas con noradrenalina. (Fig. 10 C y D).

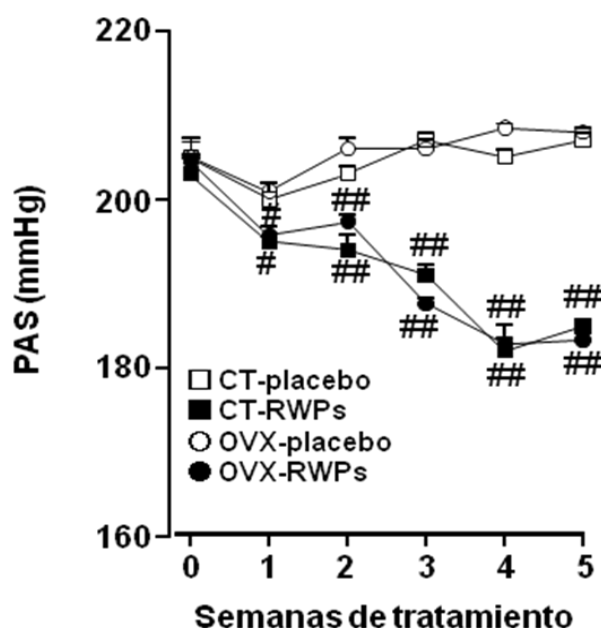


**Figura 10.** Efectos en la función vascular. Respuestas relajantes inducidas por acetilcolina (Ach) (A, B), y por nitroprusiato sódico (NPS) (C, D) en aortas con o sin endotelio respectivamente. Grupos experimentales: control (□) ( $n = 10$ ), DOCA (■) ( $n = 10$ ), RWP (○) ( $n = 10$ ), DOCA-RWP (●) ( $n = 7$ ), apocinina (△) ( $n = 10$ ), y DOCA-apocinina (▲) ( $n = 9$ ). Las respuestas relajantes se analizaron en arterias previamente contraídas con noradrenalina  $10^{-6}$  M. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  comparado con el grupo control. # $P < 0,05$  comparado con el grupo DOCA.

## 2. Efectos de los RWP's sobre ratas SHR ovariectomizadas.

### 2.1. Efectos sobre la presión arterial.

No se encontraron diferencias en la PAS medida en la cola entre los animales ovariectomizados y los controles. La administración crónica de RWP's a largo plazo indujo una reducción progresiva en la PAS que fue similar en controles y ratas ovariectomizadas tratadas. Al final de las 5 semanas de tratamiento, la reducción fue, aproximadamente del 9% para los grupos tratados con RWP's (Fig. 11).



**Figura 11.** Efectos del tratamiento crónico con RWP's en la evolución en el tiempo de la presión arterial sistólica (PAS) medida por pletismografía en la cola en ratas SHR hembras controles (CT) y ovariectomizadas (OVX). Grupos experimentales: CT-placebo (□), CT-RWPs (■), OVX-placebo (○), OVX-RWPs (●). Valores expresados como la media  $\pm$  SEM (n = 6-9 ratas). #P < 0,05 y ##P < 0,01, RWP's comparado con el respectivo grupo placebo.

## 2.2. Efectos sobre las variables morfológicas.

El peso corporal final se incrementó en ratas ovariectomizadas comparado con las controles y no se vio modificado por el tratamiento con RWPs en ningún grupo (Tabla 2). El peso del útero, un parámetro que indica la activación de ER $\alpha$  a largo plazo, fue más bajo en ovariectomizadas que en las ratas control, y no se vio afectado por el tratamiento con RWPs. La ovariectomía también condujo a una disminución del peso del absoluto y relativo del riñón, lo que fue prevenido por el tratamiento con RWPs. El peso del ventrículo izquierdo y su peso relativo al peso del corazón, considerado un índice de hipertrofia ventricular, fueron similares en los 4 grupos de animales. De este modo, cambios en el peso del ventrículo izquierdo referido al peso corporal (Tabla 2) se deben a cambios en el peso corporal más que a verdaderos cambios en la hipertrofia ventricular.

**Tabla 2.** Peso corporal y de órganos. Índices cardiaco y renal.

| Grupos      | PC<br>(g)           | PCo<br>(mg) | PVI<br>(mg) | PR<br>(mg) |
|-------------|---------------------|-------------|-------------|------------|
| CT-placebo  | 205±3               | 883±13      | 688±7       | 614±12     |
| CT-RWPs     | 204±6               | 854±21      | 670±19      | 594±14     |
| OVX-placebo | 245±10 <sup>†</sup> | 929±43      | 735±29      | 677±25*    |
| OVX-RWPs    | 239±3 <sup>†</sup>  | 890±24      | 697±17      | 625±16     |

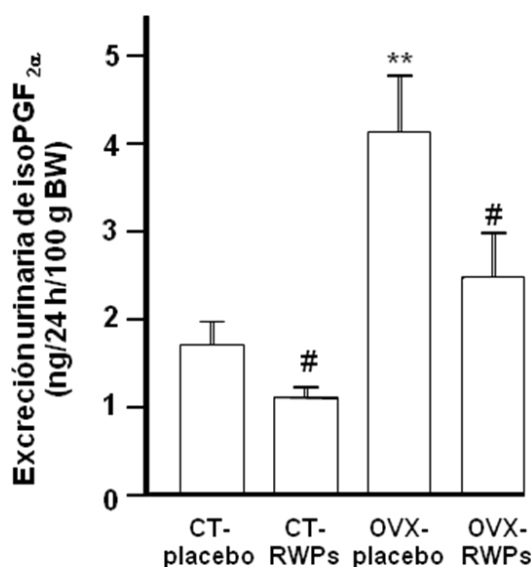
  

| Grupos      | PVI/PCo<br>Ratio | PVI/PC<br>Ratio        | PR/PC<br>Ratio         | PU<br>(mg) |
|-------------|------------------|------------------------|------------------------|------------|
| CT-placebo  | 0.78±0.01        | 3.37±0.06              | 3.00±0.07              | 598±43     |
| CT-RWPs     | 0.78±0.01        | 3.29±0.05              | 2.92±0.06              | 627±57     |
| OVX-placebo | 0.79±0.01        | 3.00±0.11 <sup>†</sup> | 2.75±0.07*             | 176±11*    |
| OVX-RWPs    | 0.78±0.02        | 2.91±0.09 <sup>†</sup> | 2.61±0.05 <sup>†</sup> | 208±25*    |

PC, peso corporal; PCo, peso corazón; PVI, peso ventrículo izquierdo; PR, peso riñón; PU, peso útero. Valores expresados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 6-9$  ratas). # y ## indican  $P < 0,05$  y  $P < 0,01$ , comparado con el respectivo grupo placebo. \* $P < 0,05$ , <sup>†</sup> $P < 0,01$  comparado con el respectivo grupo control.

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

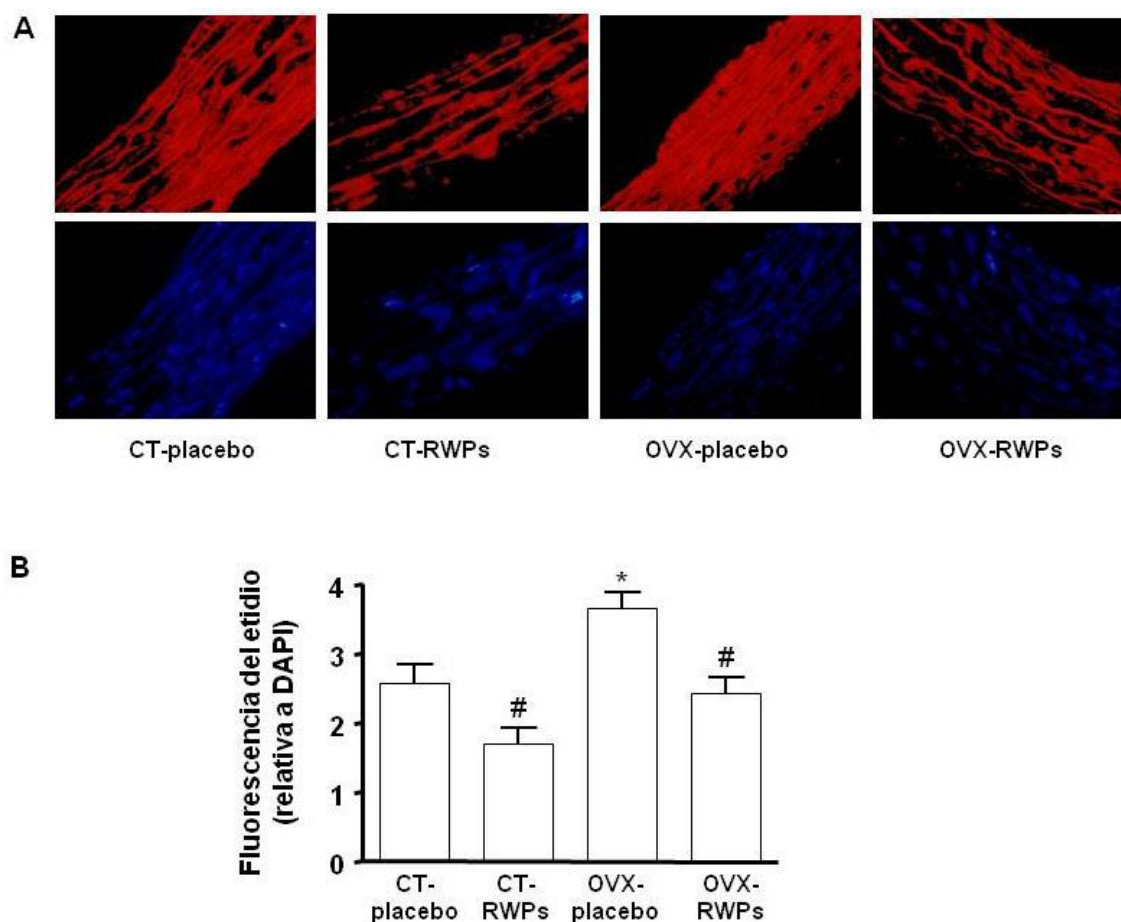
La excreción de iso-PGF<sub>2α</sub> en orina de 24 horas, un marcador específico de la producción sistémica de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, estaba incrementada en ratas ovariectomizadas comparada con las control (Fig. 12). En ambos grupos, el tratamiento crónico con RWP disminuyó significativamente la excreción urinaria de isoprostanos.



**Figura 12.** Efectos de los RWP en la excreción de iso-PGF<sub>2α</sub> en orina de 24 horas en ratas SHR hembras controles y ovariectomizadas. Valores expresados como la media ± SEM (n = 6-9 ratas). \*\*P < 0,01 comparado con el grupo CT-placebo. #P < 0,05 grupos RWPs comparados con el respectivo grupo placebo.

### 2.4. Efectos sobre la producción *in situ* de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en aorta de rata.

Para caracterizar y localizar la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en la pared vascular, se analizó la fluorescencia del etidio en secciones de aorta incubadas con DHE. En las ratas SHR operadas los anillos aórticos mostraron un marcado incremento en la fluorescencia en la adventicia, la capa media y en células endoteliales comparados con la de las ratas control. Dicho incremento se vio significativamente reducido por los RWP tanto en las ratas control como en las ovariectomizadas (Fig. 13).



**Figura 13.** Efectos de los RWPs en la producción de  $O_2^{\cdot -}$  en anillos aórticos de ratas hembra SHR controles (CT) y ovariectomizadas (OVX). (A) Las fotografías en la parte superior muestran cortes histológicos de arterias incubadas en presencia de dihidroetidio (DHE) que produce fluorescencia roja cuando se oxida a etidio por el anión  $O_2^{\cdot -}$ . Las fotografías en la parte inferior muestran los mismos cortes histológicos con fluorescencia azul por el marcador nuclear dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (x 40 aumentos). (B) Valores promedio, media  $\pm$  SEM ( $n = 4$  anillos de distintas ratas), de la fluorescencia roja del etidio normalizada respecto a la fluorescencia azul del DAPI. \* $P < 0,05$  comparado con el grupo CT-placebo. # $P < 0,05$  grupos RWPs comparados con el respectivo grupo placebo.

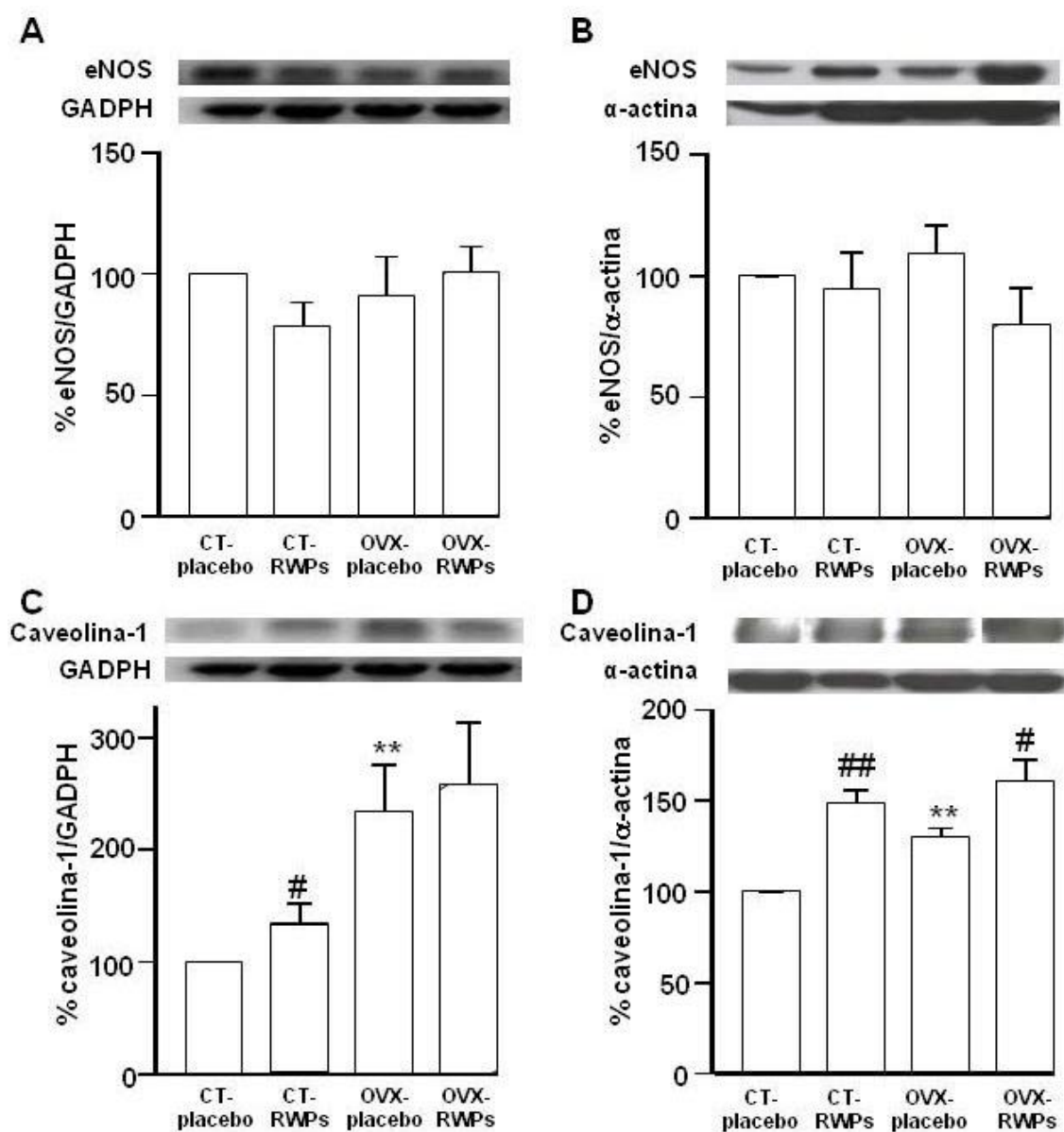


## **2.5. Efectos sobre la expresión génica y proteica de eNOS, caveolina-1, p47<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup> y receptor AT-1 en aorta de rata.**

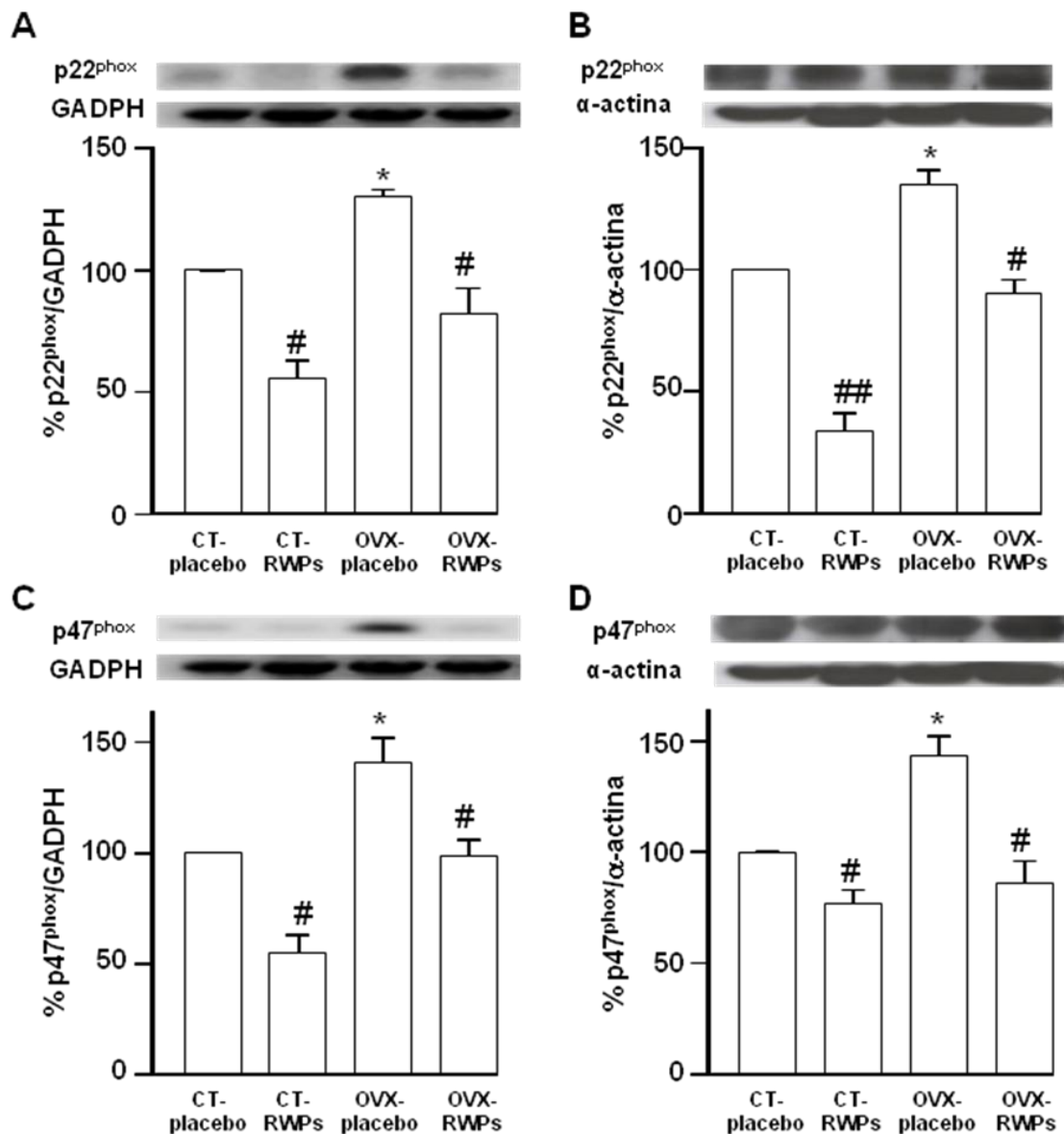
La expresión génica y proteica de eNOS se mantuvo inalterada en ratas ovariectomizadas en comparación con las ratas control (fig. 14 A y B). Seguidamente se examinaron cambios en la expresión de caveolina-1, un regulador alostérico negativo de eNOS. La expresión de caveolina-1 fue mucho mayor en aortas del grupo ovariectomizadas que en las controles (Fig. 14 C y D). Tras el tratamiento de los animales con RWPs durante 5 semanas, la expresión génica y proteica de eNOS no se alteró (Fig. 14 A y B), mientras que la caveolina-1 se vio incrementada tanto en controles como en ratas ovariectomizadas (Fig. 14 C y D).

Se observó una sobreexpresión significativa tanto proteica como de mRNA de las subunidades de la NADPH oxidasa p22<sup>phox</sup> (Fig. 15 A y B) y p47<sup>phox</sup> (Fig. 15 C y D) en tejido aórtico de ratas operadas comparado con los controles no operadas. El tratamiento crónico con RWPs fue capaz de reducir la expresión génica y proteica de ambas subunidades en SHR independientemente de la función ovárica (Fig. 15).

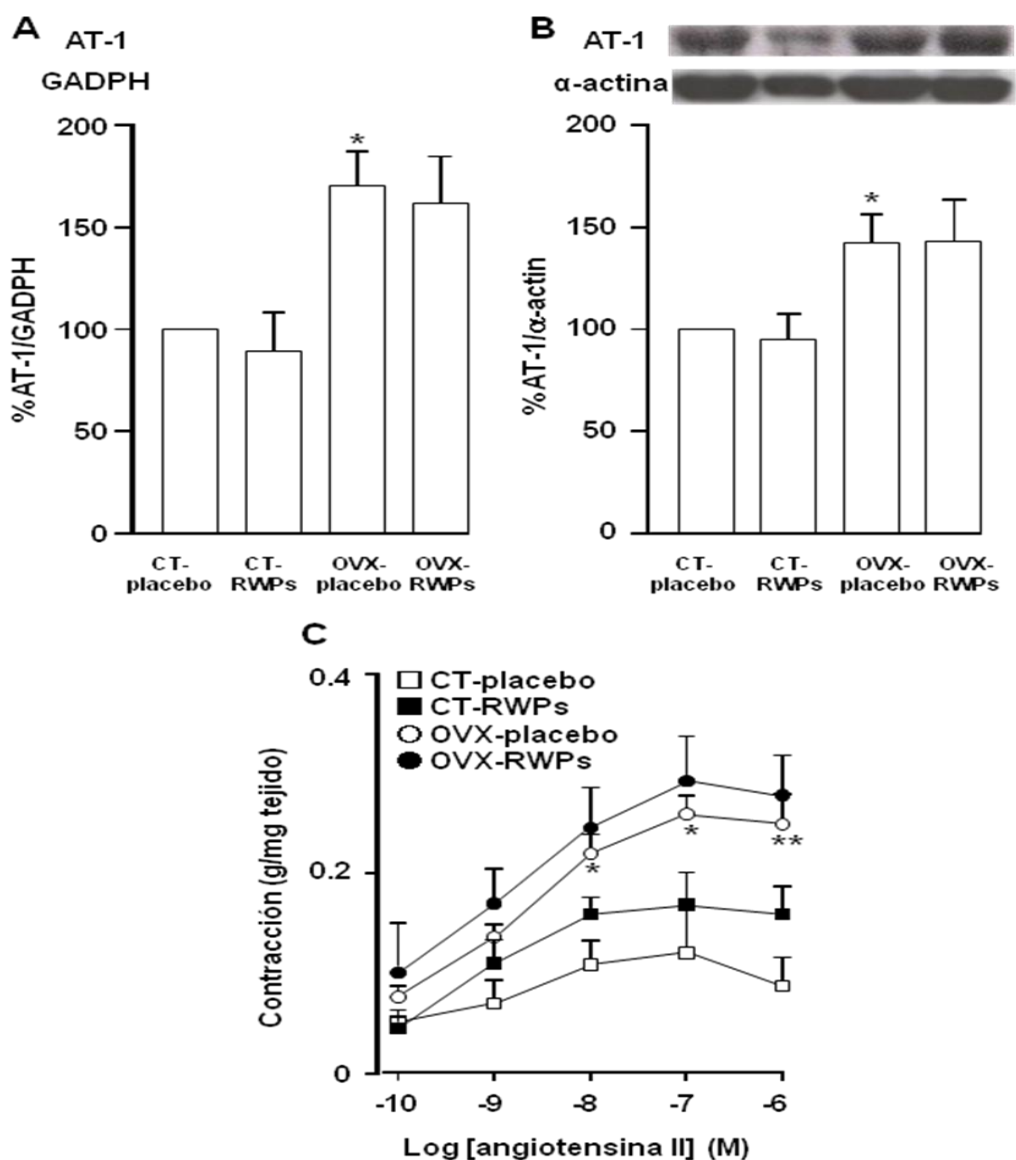
Tanto el mRNA como la expresión proteica del receptor AT-1 fue mayor en aortas de ratas ovariectomizadas comparado con los controles (Fig. 16 A y B). El tratamiento con RWPs en ratas controles u ovariectomizadas no modificó la expresión proteica ni génica del receptor AT-1. Además, las contracciones inducidas por Ang II, que fueron mayores en ratas operadas que en no operadas, tampoco fueron modificadas por el tratamiento crónico con RWPs (Fig. 16C, Tabla 3).



**Figura 14.** Efectos de los RWPs en la expresión de eNOS (A y B) y caveolina-1 (C y D) a nivel de mRNA por RT-PCR (A y C) y proteico por Western blot (B y D) en ratas hembra SHR controles (CT) y ovariectomizadas (OVX). Los paneles muestran bandas representativas y los histogramas representan valores densitométricos normalizados con el correspondiente producto de RT-PCR GADPH (A y C) o normalizado con la correspondiente  $\alpha$ -actina (B y D) ( $n = 3$  a  $5$ ) y expresado como porcentaje del grupo control-placebo.  $**P < 0.01$  comparado con el grupo CT-placebo.  $\#P < 0,05$ ,  $##P < 0,01$ , grupos RWPs comparados con su respectivo grupo placebo.



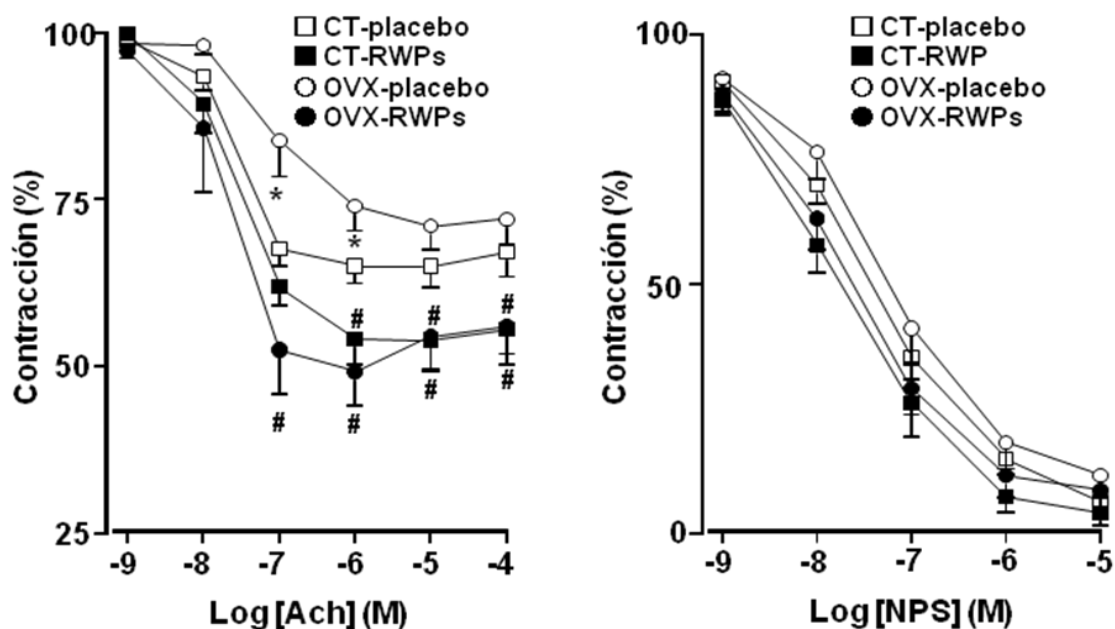
**Figura 15.** Efectos de los RWPs en la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa  $p22^{phox}$  (A y B) y  $p47^{phox}$  (C y D) a nivel de mRNA por RT-PCR (A y C) y proteico por Western blot (B y D) en ratas hembra SHR controles (CT) y ovariectomizadas (OVX). Los paneles muestran bandas representativas y los histogramas representan valores densitométricos normalizados con el correspondiente producto de RT-PCR GADPH (A y C) o normalizado con la correspondiente  $\alpha$ -actina (B y D) ( $n = 3$  a  $5$ ) y expresado como porcentaje del grupo control-placebo. \*\* $P < 0.01$  comparado con el grupo CT-placebo. \* $P < 0,05$  comparado con el grupo CT-placebo. # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , grupos RWPs comparados con su respectivo grupo placebo.



**Figura 16.** Efectos de los RWPs sobre la expresión del receptor AT-1 a nivel de mRNA por RT-PCR (A) y proteico por Western blot (B) y en la respuesta vasoconstrictora aórtica a Ang II en anillos aórticos (C) de ratas hembra SHR controles y ovariectomizadas. Los paneles muestran bandas representativas y los histogramas representan valores densitométricos normalizados con el correspondiente producto de RT-PCR GADPH (A) o normalizado con la correspondiente  $\alpha$ -actina (B) ( $n = 3$  a  $5$ ) y expresado como porcentaje del grupo control-placebo.  $**P < 0.01$  comparado con el grupo CT-placebo. El panel C muestra la respuesta contráctil inducida por Ang II en anillos aórticos sin endotelio. Grupos experimentales: CT-placebo ( $\square$ ) ( $n = 9$ ), CT-RWPs ( $\blacksquare$ ) ( $n = 9$ ), OVX-placebo ( $\circ$ ) ( $n = 6$ ), OVX-RWPs ( $\bullet$ ) ( $n = 7$ ).  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  comparado con el grupo CT-placebo.

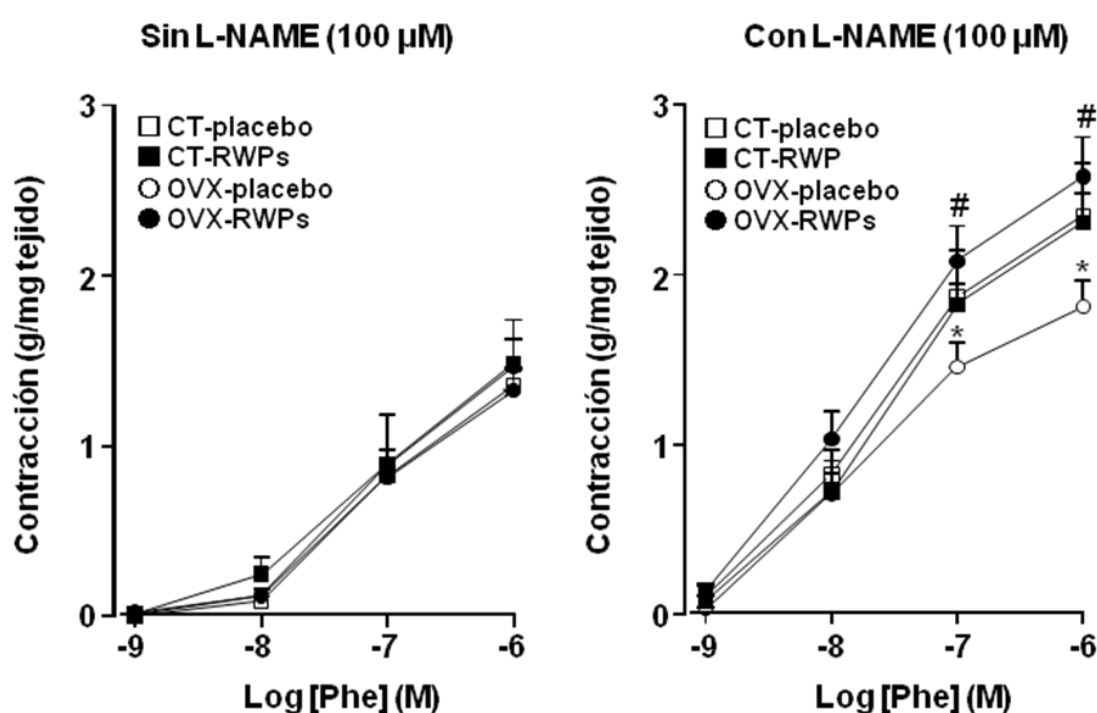
## 2.6. Efectos sobre la reactividad aórtica *ex vivo*.

En anillos precontraídos con fenilefrina, la Ach indujo una respuesta relajante que fue suprimida por la eliminación del endotelio. La depleción de la mayoría de los estrógenos endógenos (vía ovariectomía) y exógenos (fitoestrógenos de la soja en la dieta, vía dieta AIN 76) disminuyó la relajación provocada por Ach si lo comparamos con las ratas control. El tratamiento con RWP's aumentó significativamente la relajación inducida por Ach de anillos aórticos de ambos grupos SHR, independientemente de los niveles de estrógenos (Fig. 17A, el  $pD_2$  se muestra en la Tabla 3). No se vieron diferencias en la relajación independiente de endotelio inducida por NPS entre los grupos experimentales (Fig. 17B).



**Figura 17.** Efectos de los RWP's en la respuesta relajante vascular inducida por acetilcolina (Ach) (A), y nitroprusiato sódico (NPS) (B), en aortas precontraídas con  $10^{-6}$  M fenilefrina en ratas SHR hembras controles (CT) y ovariectomizadas (OVX). Grupos experimentales: CT-placebo (□) ( $n = 9$ ), CT-RWP's (■) ( $n = 9$ ), OVX-placebo (○) ( $n = 6$ ), OVX-RWP's (●) ( $n = 7$ ). Valores expresados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 6-9$  anillos de ratas diferentes). \* $P < 0,05$  comparado con el grupo CT-placebo. # $P < 0,05$  grupos RWP's comparados con el respectivo grupo placebo.

No se encontraron diferencias entre los grupos experimentales en la curva concentración-respuesta contractora inducida por fenilefrina en anillos aórticos intactos (Fig 18; Tabla 3). Sin embargo, esta respuesta se vio reducida significativamente en aortas de ratas ovariectomizadas comparado con animales sin operar (Fig. 18, Tabla 3) cuando los anillos fueron previamente incubados con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NAME, indicando una reducción en la formación basal de NO en ratas ovariectomizadas. Los RWPs incrementaron la respuesta contráctil sólo en anillos de ratas ovariectomizadas, sugiriendo una mayor formación de NO en dichos vasos.



**Figura 18.** Efectos de los RWPs en las respuestas contráctiles vasculares inducidas por fenilefrina (Phe) en ausencia (A) o presencia (B) de  $N^G$ -nitro-L-arginine metil éster (L-NAME,  $10^{-4}$  M) en ratas SHR hembras control y ovariectomizadas. Grupos experimentales: CT-placebo (□) ( $n = 9$ ), CT-RWPs (■) ( $n = 9$ ), OVX-placebo (○) ( $n = 6$ ), OVX-RWPs (●) ( $n = 7$ ). Valores expresados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 6-9$  anillos de ratas diferentes). \* $P < 0,05$  comparado con el grupo CT-placebo. # $P < 0,05$  grupos RWPs comparados con el respectivo grupo placebo.

Tabla 3. Parámetros de las curvas concentración-respuesta a factores vasoactivos.

|   | Control-placebo (n = 9) |                  | Control-RWPs (n = 9) |                  |
|---|-------------------------|------------------|----------------------|------------------|
|   | pD <sub>2</sub>         | E <sub>max</sub> | pD <sub>2</sub>      | E <sub>max</sub> |
| Acetilcolina<br>(10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-4</sup> mol/L)             | 7.58 ± 0.21             | 35.0 ± 2.6       | 7.29 ± 0.15          | 46.1 ± 4.6 #     |
| Nitroprusiato sódico<br>(10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-5</sup> mol/L)     | 7.43 ± 0.11             | 93.6 ± 3.6       | 7.72 ± 0.11          | 95.9 ± 2.4       |
| Fenilefrina (sin L-NAME)<br>(10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-6</sup> mol/L) | 7.13 ± 0.05             | 1.4 ± 0.1        | 7.15 ± 0.13          | 1.5 ± 0.3        |
| Fenilefrina (con L-NAME)<br>(10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-6</sup> mol/L) | 7.59 ± 0.11             | 2.3 ± 0.1        | 7.51 ± 0.10          | 2.35 ± 0.3       |
| Angiotensina II<br>(10 <sup>-10</sup> - 10 <sup>-6</sup> mol/L)         | 8.96 ± 0.33             | 0.12 ± 0.04      | 9.04 ± 0.19          | 0.17 ± 0.03      |
|   | OVX-placebo (n = 6)     |                  | OVX-RWPs (n = 7)     |                  |
|   | pD <sub>2</sub>         | E <sub>max</sub> | pD <sub>2</sub>      | E <sub>max</sub> |
| Acetilcolina<br>(10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-4</sup> mol/L)             | 7.03 ± 0.18             | 29.0 ± 3.1*      | 7.47 ± 0.24          | 50.8 ± 5.1 #     |
| Nitroprusiato sódico<br>(10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-5</sup> mol/L)     | 7.37 ± 0.10             | 88.4 ± 4.5       | 7.66 ± 0.13          | 91.3 ± 3.9       |
| Fenilefrina (sin L-NAME)<br>(10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-6</sup> mol/L) | 7.14 ± 0.06             | 1.5 ± 0.2        | 7.12 ± 0.08          | 1.3 ± 0.1        |
| Fenilefrina (con L-NAME)<br>(10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-6</sup> mol/L) | 7.62 ± 0.06             | 1.8 ± 0.2 *      | 7.64 ± 0.06          | 2.6 ± 0.2 #      |
| Angiotensina II<br>(10 <sup>-10</sup> - 10 <sup>-6</sup> mol/L)         | 9.30 ± 0.21             | 0.26 ± 0.02*     | 90.4 ± 0.29          | 0.29 ± 0.04      |

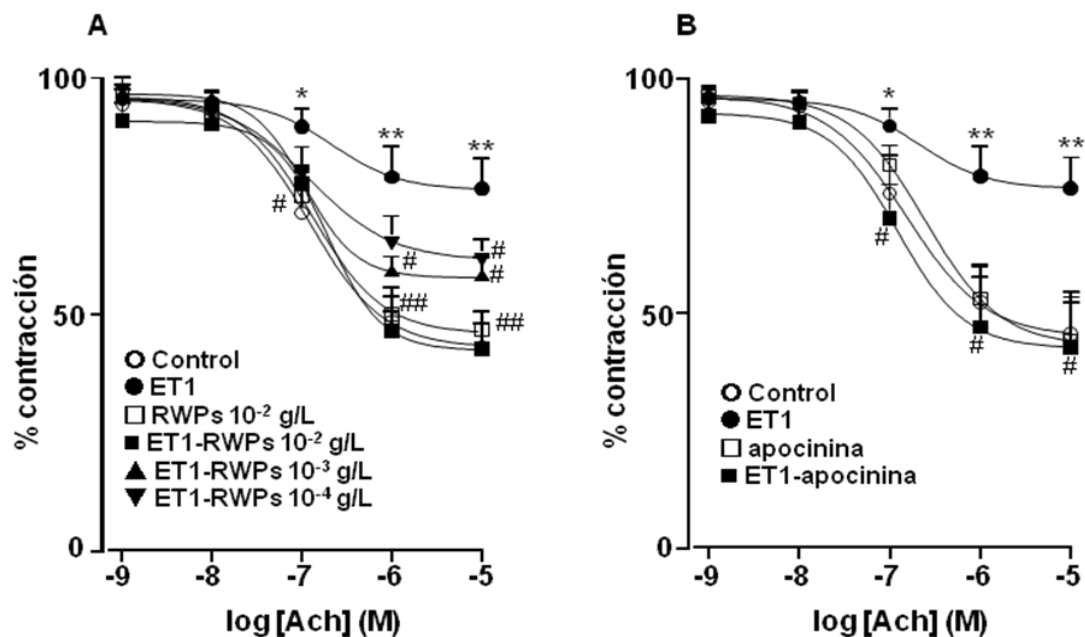
Valores expresados como la media ± SEM. E<sub>max</sub> (efecto máximo) para fenilefrina y angiotensina II están expresados como g de contracción/mg de tejido, y para acetilcolina (Ach) y nitroprusiato sódico (NPS) como el porcentaje de la relajación de la precontracción con fenilefrina. pD<sub>2</sub> es la concentración de fármaco que genera el 50% del E<sub>max</sub> expresado como el logaritmo negativo de la molaridad. \*P < 0,05 comparado con el grupo CT-placebo. #P < 0,05 para los grupos RWPs comparados con su respectivo grupo placebo.

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

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

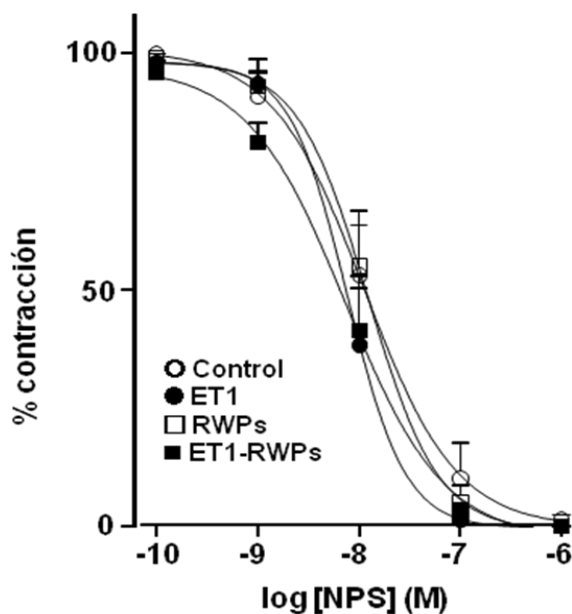
En estudios previos observamos que la incubación de anillos aórticos en solución Krebs durante 4 horas en ausencia de ET-1 no produce cambios significativos en la respuesta contráctil a fenilefrina o en la respuesta a Ach. Sin embargo, la incubación de los anillos aórticos con ET-1 durante 4 horas induce al desarrollo de disfunción endotelial como se indica por la reducción en la respuesta relajante máxima a Ach (Fig. 19). La co-incubación con RWPs durante 4 horas previno la disfunción endotelial inducida por ET-1 de manera concentración-dependiente (Fig. 19A). De manera similar, el inhibidor de NADPH oxidasa apocinina, también restableció el empeoramiento en la respuesta relajante a Ach que induce la ET-1 (Fig. 19B). La respuesta relajante a Ach se suprimió por el inhibidor de la NOS, L-NAME, tanto en controles como en anillos aórticos tratados con ET-1 (datos no incluidos). Para determinar si el estiramiento de los anillos aórticos podía modificar los efectos de la ET-1 en la disfunción endotelial, en otro grupo de experimentos, los anillos se montaron en baños de órganos con o sin ET-1 durante 4 horas. Tras esto se eliminó la ET-1 del medio y se analizó la respuesta a Ach en anillos precontraídos con fenilefrina. En estas condiciones experimentales más fisiológicas, la incubación con ET-1 también modificó la vasodilatación inducida por Ach en comparación con los anillos controles (Efectos máximos (%):  $35,2 \pm 4,6$ ,  $n = 6$ ;  $69,2 \pm 5,1$ ,  $n = 6$ , respectivamente,  $P < 0,01$ ).





**Figura 19.** RWPs previenen la disfunción endotelial inducida por ET-1 en anillos aórticos de rata. Los anillos se incubaron con o sin RWPs ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  g/L) (A) o con apocinina ( $10^{-4}$  M) (B) y con o sin ET-1 (1 nM) durante 4 horas. Los anillos se estimularon con fenilefrina ( $10^{-6}$  M) y finalmente se indujo una relajación dependiente de endotelio mediante adición de acetilcolina (ACh). Condiciones experimentales: (○) Control, (●) ET1, (□) RWPs  $10^{-2}$  g/L, (■) ET1-RWPs  $10^{-2}$  g/L, (▲) ET1-RWPs  $10^{-3}$  g/L, (▼) ET1-RWPs  $10^{-4}$  g/L. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM,  $n = 5-6$ . \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  ET-1 vs control y # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  ET-1+RWPs vs ET-1.

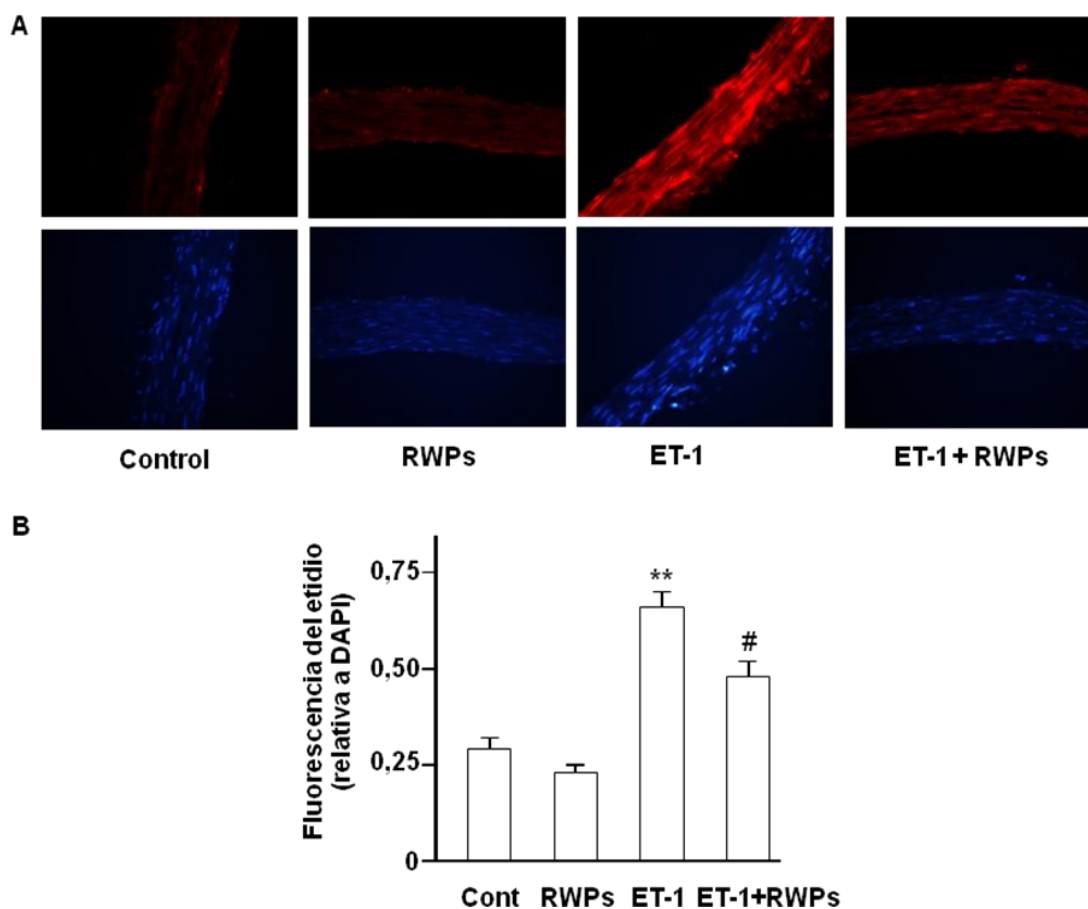
No se observaron diferencias en las respuestas relajantes independientes de endotelio al NPS en anillos aórticos tratados con vehículo, ET-1 y ET-1+RWPs (Fig. 20).



**Figura 20.** Efecto de los RWPs sobre la relajación a nitroprusiato sódico (NPS) de anillos aórticos de rata desprovistos de endotelio. Los anillos se incubaron con o sin RWPs ( $10^{-2}$  mg/ml) y con o sin ET-1 (1 nM) durante 4 horas y después de la eliminación mecánica del endotelio se montaron en un baño de órganos, se estimularon con fenilefrina ( $10^{-6}$  M) y finalmente se indujo una relajación independiente de endotelio mediante adición de NPS. Condiciones experimentales: (○) Control, (●) ET1, (□) RWPs  $10^{-2}$  g/L, (■) ET1-RWPs  $10^{-2}$  g/L. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM,  $n = 6$ .

### **3.2. Efectos sobre la producción de $O_2^-$ .**

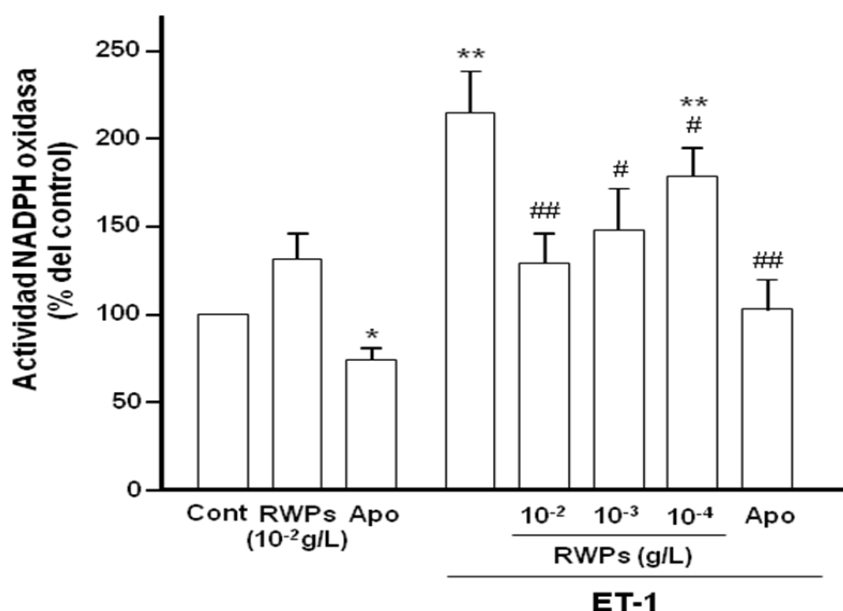
Para caracterizar la producción de  $O_2^-$  y localizarla en la pared vascular, se analizó la fluorescencia roja del etidio en secciones de aorta incubadas con DHE, el cual se convierte a etidio por la oxidación inducida por  $O_2^-$ . La tinción de núcleos se vio prácticamente suprimida por el captador de  $O_2^-$  intracelular tirón. Núcleos teñidos de rojo pudieron observarse en la adventicia, la media y las células endoteliales (Fig. 21A). Se cuantificó la fluorescencia y los datos se normalizaron respecto a la fluorescencia azul de la tinción nuclear del DAPI (Fig. 21B). A 4 horas, la ET-1 indujo un incremento en la producción de  $O_2^-$  que resultó evidente en todas las capas del vaso. Los RWPs ( $10^{-3}$  g/L) previnieron el incremento en la tinción por DHE inducido por ET-1. (Fig. 21 A y B).



**Figura 21.** Efectos de los RWPs en la producción de  $O_2^-$  en anillos incubados con o sin RWPs ( $10^{-3}$  g/L) y con o sin ET-1 (1 nM) durante 4 horas. (A) Las fotografías en la parte superior muestran cortes histológicos de arterias incubadas en presencia de dihidroetidido (DHE) que produce fluorescencia roja cuando se oxida a etidio por el anión  $O_2^-$ . Las fotografías en la parte inferior muestran los mismos cortes histológicos con fluorescencia azul por el marcador nuclear dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ( $\times 40$  aumentos) (B) (B) Valores promedio, media  $\pm$  SEM ( $n = 4$  anillos de distintas ratas), de la fluorescencia roja del etidio normalizada respecto a la fluorescencia azul del DAPI. \*\* $P < 0,01$  ET-1 vs control y # $P < 0,05$  ET-1+RWPs vs ET-1.

### 3.3. Efectos sobre la actividad NADPH oxidasa.

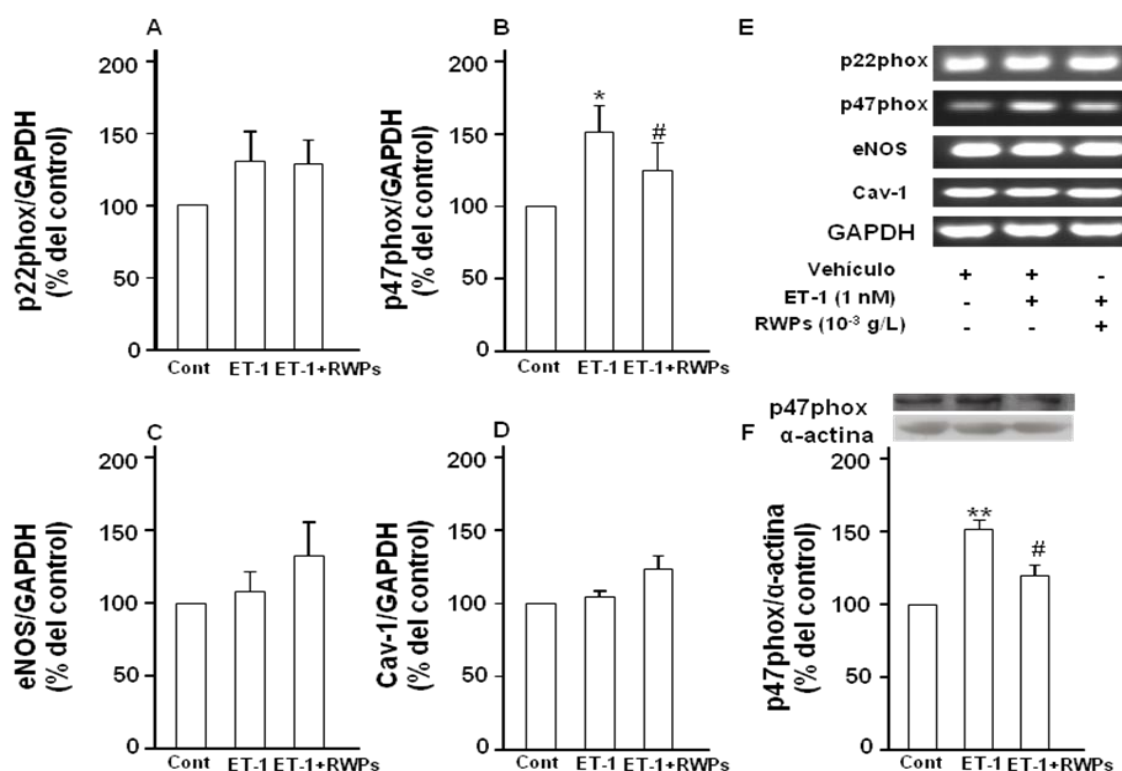
El NADPH incrementa la luminescencia de la lucigenina en anillos aórticos normales, efecto que resulta prácticamente eliminado previa incubación durante 30 minutos con el inhibidor de flavoproteínas DPI (10  $\mu$ M). La incubación con ET-1 durante 4 horas induce un incremento en la actividad NADPH oxidasa.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



**Figura 22.** RWPs previenen el aumento en la actividad NADPH oxidasa mediado por ET-1. Los anillos se incubaron con o sin RWPs ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  g/L), o apocinina (Apo,  $10^{-4}$  M) y con o sin ET-1 (1 nM) durante 4 horas antes de su incorporación al tubo del luminómetro. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM,  $n = 5-6$ . \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  ET-1 vs control y # $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$  ET-1+RWPs o ET-1+apo vs ET-1.

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

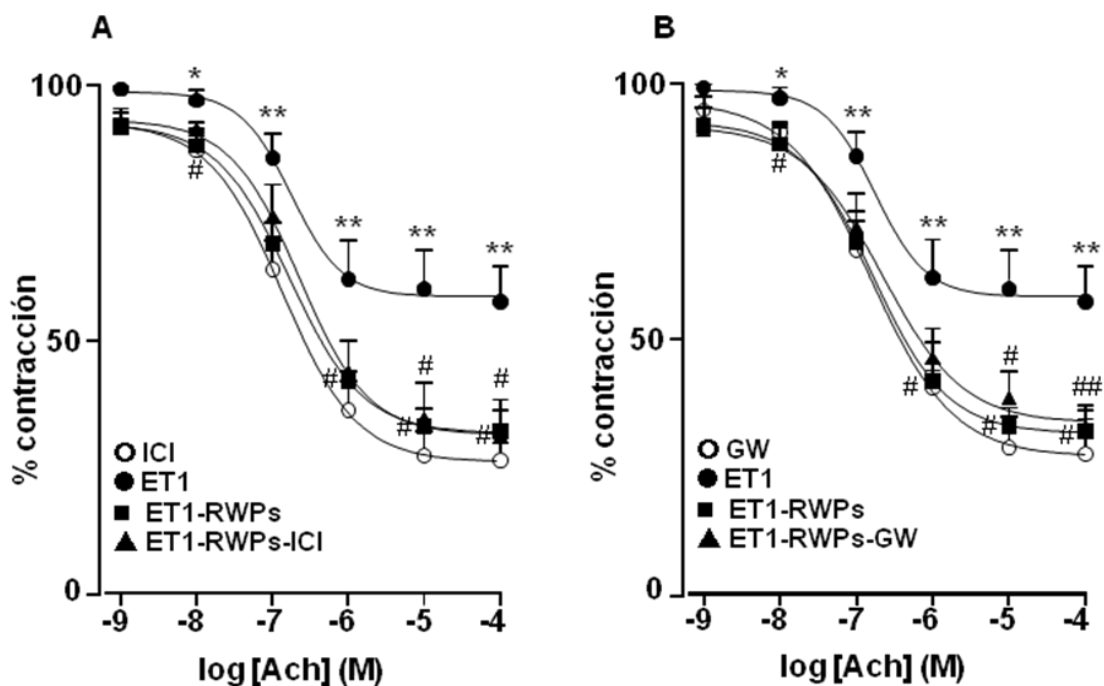
En segmentos aórticos la incubación con ET-1 durante 4 horas aumentó tanto la expresión génica como proteica de p47<sup>phox</sup> (Fig. 23 B, E y F) sin afectar la expresión génica de p22<sup>phox</sup> (Fig. 23 A y E), eNOS (Fig. 23 C y E) y caveolina-1 (Fig. 23 D y E) medida por RT-PCR. La coincubación con RWPs ( $10^{-3}$  g/L) previno el aumento en la expresión de p47<sup>phox</sup> inducido por ET-1.



**Figura 23.** Efectos de los RWPs en la expresión de p22<sup>phox</sup> (A, E), p47<sup>phox</sup> (B, E), eNOS (C, E) y caveolina-1 (D, E) a nivel de mRNA por RT-PCR (A y C) y proteico por Western blot de p47<sup>phox</sup> (F) en anillos aórticos incubados con o sin RWPs ( $10^{-3}$  g/L) y con o sin ET-1 (1 nM) durante 4 horas. Los paneles muestran bandas representativas y los histogramas representan valores densitométricos normalizados con el correspondiente producto de RT-PCR GAPDH (A, B, C, D, E) o normalizado con la correspondiente  $\alpha$ -actina (F) ( $n=3$  a 5). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM,  $n = 5-6$ . \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  ET-1vs control y # $P < 0,05$  ET-1+RWPs.

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

Para probar la implicación del ER $\alpha$  en la mejora que ejercen los RWPs sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1, incubamos los anillos con el antagonista no selectivo de ER, ICI-182780. Este agente no modificó el efecto beneficioso de los RWPs en la mejora de la disfunción endotelial inducida por ET-1 (Fig. 24A). Para determinar si la activación PPAR $\gamma$  estaba implicada en el efecto protector de los RWPs, los anillos aórticos fueron coincubados con el antagonista de PPAR $\gamma$ , GW9662. La mejora que ejercen los RWPs sobre el deterioro en la relajación a Ach inducido por ET-1 no se vio afectado por GW9662 (Fig. 24B).

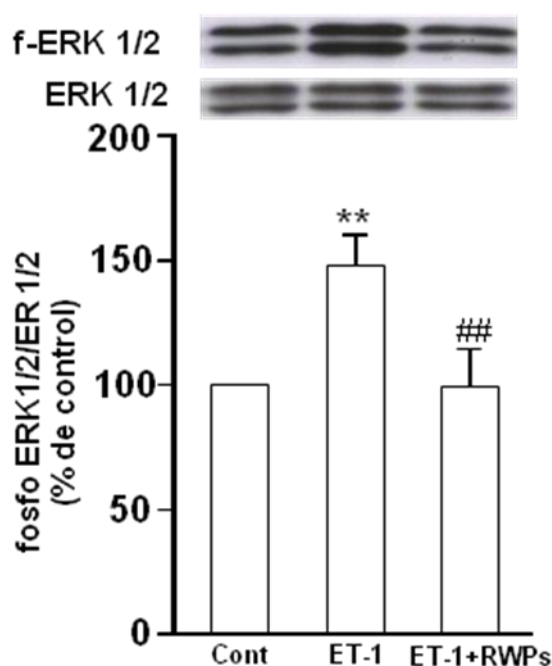


**Figura 24.** Papel del receptor estrogénico (ER) (A) y del receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR) (B) sobre el efecto protector de los RWPs en la disfunción endotelial inducida por ET-1 en anillos aórticos de rata. Los anillos se incubaron con ET-1 ( $10^{-9}$  M) y con RWPs ( $10^{-2}$  g/L) en presencia o ausencia de ICI-182780 ( $10^{-6}$  M) (A) o de GW9662 ( $10^{-6}$  M) (B) durante 4 horas. Los anillos se estimularon con fenilefrina ( $10^{-6}$  M) y finalmente se indujo una relajación dependiente de endotelio mediante adición de acetilcolina (Ach). Condiciones experimentales: (○) ICI-182780 (A) GW9662 (B), (●) ET1, (■) ET1-RWPs, (▲) ET1-RWPs-ICI-182780 (A) ET1-RWPs-GW9662 (B). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM,  $n = 5-6$ . \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  ET-1 vs control y # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  El resto de los grupos vs ET-1.



### 3.6. Papel de las Kinasas reguladas por señales extracelulares.

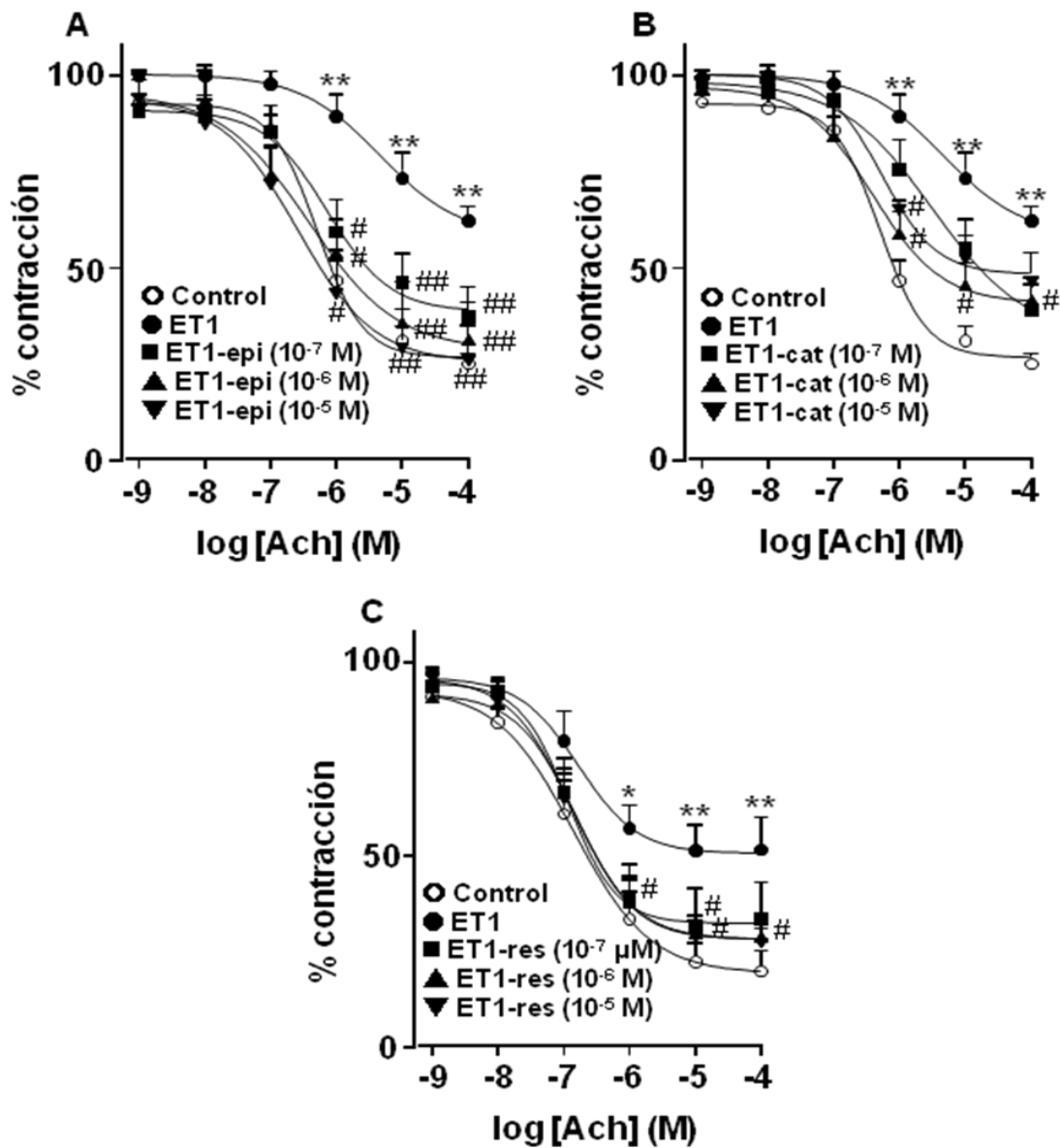
Analizamos si los RWPs modifican el grado de fosforilación de ERK1/2. Para ello, estudiamos el estado de fosforilación de ERK1/2 mediante western blot en anillos aórticos incubados con ET-1 a una hora en presencia o ausencia de RWPs. Se observa que la incubación con ET-1 induce un aumento significativo en el grado de fosforilación de ERK1/2 con respecto a los anillos control, y que los RWPs son capaces de revertir este efecto (Fig. 25).



**Figura 25.** Efectos de los RWPs sobre la fosforilación de kinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2). Los anillos se incubaron una hora con ET-1 ( $10^{-9}$  M) en presencia o ausencia de RWPs ( $10^{-3}$  g/L). Posteriormente, los homogenados fueron utilizados para realizar western blot para fosfo-ERK1/2 y ERK1/2. Los resultados se expresaron como la media aritmética  $\pm$  SEM de los valores de densidad de la banda para fosfo-ERK1/2 normalizados con los correspondientes valores de ERK1/2 y expresados como porcentaje de los anillos control,  $n = 4$ . \*\*  $P < 0,01$  vs anillos control. ##  $P < 0,01$  vs ET-1.

### **3.7. Papel protector de polifenoles aislados de la mezcla de RWPs frente a la disfunción endotelial inducida por ET-1.**

La incubación de los anillos aórticos con ET-1 durante 4 horas induce al desarrollo de disfunción endotelial como se observa en la Fig. 19. La co-incubación con RWPs durante 4 horas previno la disfunción endotelial inducida por ET-1 de manera concentración-dependiente (Fig. 19A). Para determinar cuál de los componentes de la mezcla polifenólica pudiera ser el responsable de la mejora en la disfunción endotelial realizamos incubaciones a 4 horas de anillos aórticos con epicatequina, catequina o resveratrol en presencia de ET-1. Posteriormente, se analizó la respuesta relajante a Ach. La incubación con epicatequina a  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M, catequina a  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M y resveratrol a  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M, mejoró la vasodilatación a Ach en anillos incubados con ET-1 (Fig. 25 A, B y C respectivamente).



**Figura 26.** Epicatequina (epi, A), catequina (cat, B) y resveratrol (res, C) previenen la disfunción endotelial inducida por ET-1 en anillos aórticos de rata. Los anillos se incubaron con o sin epicatequina, catequina o resveratrol ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M) y con ET-1 ( $10^{-9}$  M) durante 4 horas. Los anillos se estimularon con fenilefrina ( $10^{-6}$  M) y finalmente se indujo una relajación dependiente de endotelio mediante adición de acetilcolina (ACh). Condiciones experimentales: (○) Control, (●) ET1, (■) ET1-epi  $10^{-7}$  M (A), ET1-cat  $10^{-7}$  M (B) o ET1-res  $10^{-7}$  M (C), (▲) ET1-epi  $10^{-6}$  M (A), ET1-cat  $10^{-6}$  M (B) o ET1-res  $10^{-6}$  M (C), (▼) ET1-epi  $10^{-5}$  M (A), ET1-cat  $10^{-5}$  M (B) o ET1-res  $10^{-5}$  M (C). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM,  $n = 5-6$ . \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  ET-1 vs control y # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  vs ET-1.

**Discusión.**

---



## 1. Efectos preventivos de los RWPs sobre la hipertensión DOCA-sal.

Los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que el tratamiento crónico con RWPs previene el incremento en la presión sistólica, la proteinuria y la disfunción endotelial en ratas uninefrectomizadas sujetas a un tratamiento DOCA-sal, y que este efecto parece estar relacionado con la disminución de la producción vascular de  $O_2^-$  mediada por NADPH oxidasa. En definitiva, por primera vez se muestra que una mezcla de compuestos polifenólicos del vino tinto disminuye la producción de ET-1 *in vivo*, lo que podría colaborar con sus efectos cardiovasculares beneficiosos.

Este estudio confirma e incrementa las evidencias previas de los efectos antihipertensivos y la mejora de la función endotelial de los RWPs en varios modelos animales de hipertensión (Bernátová *et al.*, 2002, Pechánová *et al.*, 2004, Sarr *et al.*, 2006, Soares de Moura *et al.*, 2002). En ratas con inhibición crónica de la síntesis de NO y en ratas infundidas con Ang II, dos modelos experimentales en los que el estrés oxidativo vascular mediado por renina y Ang juega un papel fundamental en el desarrollo de la hipertensión (Kitamoto *et al.*, 2000, Sainz *et al.*, 2005).

Los compuestos polifenólicos del vino tinto previenen la hipertensión, al menos en parte, mediante la reducción de la producción vascular de  $O_2^-$ . Además, un extracto de polifenoles derivado de uva (Soares de Moura *et al.*, 2002) también previene el incremento de la presión sanguínea inducido por el tratamiento DOCA-sal, un modelo de hipertensión independiente de Ang II, puesto que el bloqueo del receptor AT-1 no redujo la presión arterial (Kim *et al.*, 1994, Lacour *et al.*, 1994, Wada *et al.*, 1995, De Gracia *et al.*, 2000).

En concordancia con estudios previos (Beswick *et al.*, 2001, Ghosh *et al.*, 2004, Elmarakby *et al.*, 2005) hemos encontrado que el estrés oxidativo está íntimamente relacionado con el desarrollo de hipertensión DOCA-sal, puesto que la administración a largo plazo de apocinina (un inhibidor del sistema NADPH oxidasa) a las ratas DOCA-sal disminuyó significativamente los niveles de iso-PGF<sub>2α</sub> (producto de la reacción no

enzimática del ácido araquidónico y el  $O_2^-$ ), los niveles de MDA en plasma (un marcador de la peroxidación lipídica y del estrés oxidativo sistémico) y la presión arterial sistólica comparada con la de las ratas tratadas sólo con DOCA-sal. De forma similar los RWP también normalizaron la excreción urinaria de iso-PGF<sub>2α</sub>, el MDA plasmático y previnieron el incremento en la presión arterial sistólica en ratas DOCA-sal. Además, el daño renal característico de la hipertensión mineralocorticoide está asociado con el estrés oxidativo y es en parte independiente de la presión sanguínea (De Gracia *et al.*, 2000, Jin *et al.*, 2006). En nuestro estudio, la proteinuria, un marcador del daño renal, estaba incrementada en ratas DOCA-sal y tanto el tratamiento crónico con RWP como con apocinina redujeron la excreción de proteínas a valores similares a los encontrados en las ratas control.

Los análisis de polifenoles en plasma revelaron la presencia de pequeñas concentraciones ( $< 0,01 \mu\text{M}$ ) de catequinas (componente mayoritario de la mezcla de polifenoles) en ratas tratadas con RWP. Sin embargo, no fue posible la cuantificación de los niveles circulantes, con lo que no puede concluirse si los efectos vasculares observados en ratas tratadas pueden relacionarse directamente a los niveles plasmáticos de catequinas, aunque los bajos niveles detectados no apoyan esto último. Por otro lado, la baja tasa de absorción de catequinas se debería, al menos en parte, a una extensa degradación por la microflora intestinal (presente en grandes cantidades en el intestino delgado de rata comparado con el humano). Se sabe que las catequinas son ampliamente degradadas a una variedad de polifenoles pequeños, sobre todo ácidos fenólicos (Gonthier *et al.*, 2003). Los niveles plasmáticos de estos metabolitos podrían ser de 8 a 25 veces mayor que el nivel medido para las catequinas originales y ser responsables de algunos de los efectos atribuidos a éstas.

La presión arterial alta y mantenida es un potente determinante para el desarrollo de la hipertrofia cardíaca y renal (Frohlich *et al.*, 1992). De hecho, las ratas con hipertensión DOCA-sal mostraron un aumento en el índice de peso cardíaco, del ventrículo izquierdo y del riñón comparado con los controles normotensos. Sin

embargo, ni el tratamiento con RWP's ni el tratamiento con apocinina redujeron significativamente estos índices, a pesar de su efecto preventivo en el desarrollo de la hipertensión. Vemos que no existe asociación entre la alta presión sanguínea y la hipertrofia cardiaca en este modelo de hipertensión, mostrando el papel de otro estímulo trófico, que no se vio afectado por sustancias antioxidantes, como los RWP's o la apocinina, o por sustancias sin propiedades antioxidantes como el verapamilo (Galisteo *et al.*, 2004). Sin embargo nuestros resultados contrastan con otros estudios, que reportan que los RWP's previenen la hipertensión y la hipertrofia cardiaca en ratas resistentes a la insulina alimentadas con fructosa (Al-Awwadi *et al.*, 2004).

La ET-1 está relacionada con el desarrollo del estrés oxidativo y la hipertensión en las ratas DOCA-sal, puesto que el bloqueo del receptor ET<sub>A</sub> reduce los niveles arteriales de O<sub>2</sub><sup>-</sup> con un descenso concomitante de presión sistólica (Li *et al.*, 2003c). Sin embargo, encontramos que el tratamiento con apocinina es capaz de prevenir la hipertensión y los niveles vasculares de O<sub>2</sub><sup>-</sup> sin reducir los niveles plasmáticos de ET-1. Estos resultados están en concordancia con un estudio previo de Sedeek *et al.*, (2003) que encontró que el incremento en la presión arterial en respuesta a ET-1 fue suprimida por completo por el captador de O<sub>2</sub><sup>-</sup> tempol y sugiere que el estrés oxidativo juega un papel clave en el desarrollo de la hipertensión en este modelo de hipertensión con bajos niveles de renina. En nuestro estudio, tanto los RWP's como la apocinina redujeron la generación aórtica intracelular de O<sub>2</sub><sup>-</sup> medida por la fluorescencia del etidio, pero sólo los RWP's redujeron los niveles plasmáticos de ET-1 en las ratas DOCA-sal. La ET-1 se sintetiza en varios pasos a partir de un precursor, la pre-proendotelina. La expresión de ET-1 en cultivos de células endoteliales y de la musculatura lisa vascular se puede estimular con varias sustancias, incluidas las ROS (Kahler *et al.*, 2000, Ruef *et al.*, 2001). El peróxido de hidrógeno incrementa la síntesis de ET-1 por inducción de ECE, que catalizan la conversión de un precursor inactivo "big endotelina" al péptido biológicamente activo ET-1 (Lopez-Ongil *et al.*, 2002). Sin embargo, el O<sub>2</sub><sup>-</sup> inhibe las ECE, reduciendo la síntesis de ET-1 (Lopez-Ongil *et al.*, 2000). Estos resultados



mostraron que el papel de las ROS en el control de la síntesis de ET-1 es bastante complejo. El equilibrio local entre el  $O_2^-$ , el NO y el peróxido de hidrógeno determinaría los niveles de ET-1. En nuestro experimento sólo analizamos los efectos de los RWPs y la apocinina en los niveles vasculares de  $O_2^-$ . Con lo que no tenemos argumentos suficientes para explicar los mecanismos involucrados en los efectos de ambas sustancias en los niveles plasmáticos de ET-1. Además, los efectos inhibitorios inducidos por los RWPs en la liberación de ET-1 serían independientes de sus propiedades antioxidantes y estarían relacionadas a cambios en tirosin kinasas o señalización por protein kinasa C (Corder *et al.*, 2001). Se necesitan estudios más profundos para clarificar esta cuestión.

Está bien establecido que la ET-1 activa la NADPH para producir  $O_2^-$  vascular en ratas con hipertensión DOCA-sal (Beswick *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2003), aunque la ET-1 también incrementa las ROS mitocondriales en este modelo de hipertensión (Callera *et al.*, 2006). Hemos encontrado que la actividad NADPH oxidasa está incrementada en la aorta de ratas hipertensas DOCA-sal y que este incremento está asociado con una producción de  $O_2^-$  elevada. En nuestro estudio de detección *in situ* de producción de  $O_2^-$  encontramos que los anillos de las ratas DOCA-sal mostraron mayor fluorescencia roja que las ratas control, y que dicha fluorescencia estaba distribuída en todas las capas de la pared aórtica. Por ello, nuestras observaciones sugieren que todas las células vasculares, aunque especialmente las células del músculo liso vascular, están involucradas en el aumento de la producción de  $O_2^-$  derivado de NADPH oxidasa en ratas con hipertensión DOCA-sal. El inhibidor específico de la NADPH oxidasa, apocinina, redujo de manera muy marcada tanto la fluorescencia del etidio como la actividad NADPH oxidasa en anillos aórticos de ratas DOCA-sal. El tratamiento con RWPs indujo cambios similares a los provocados por la apocinina en la producción vascular de  $O_2^-$  y en actividad NADPH oxidasa en ratas DOCA-sal. Sin embargo ni los RWPs ni la apocinina redujeron de forma significativa estos parámetros en las ratas control, sugiriendo que estos productos reducen los cambios que encontramos en

arterias de ratas DOCA-sal en las subunidades de la NADPH oxidasa, como el incremento de la p22<sup>phox</sup> (Callera *et al.*, 2006, Beswick *et al.*, 2001) y/o el incremento en la traslocación a membrana de p47<sup>phox</sup> (Callera *et al.*, 2006). De hecho, hemos visto un incremento en la expresión de p22<sup>phox</sup> en ratas DOCA-sal, prevenido por los RWPs, sugiriendo que la regulación de la p22<sup>phox</sup> está involucrada en la reducción de la producción vascular de O<sub>2</sub><sup>-</sup> derivado de NADPH oxidasa en ratas DOCA-sal tratadas con RWPs. De manera alternativa, los efectos inhibitorios de los RWPs sobre el incremento de la actividad NADPH oxidasa en ratas DOCA-sal podría estar también relacionado con la reducción de los niveles de ET-1, lo que reduciría la actividad NADPH oxidasa. De manera interesante hemos visto que los RWPs reducen la actividad NADPH oxidasa, cuando los incubamos durante 30 minutos, en células de músculo liso vascular de ratas control. Este efecto inhibitorio, independiente de los efectos sobre los niveles de ET-1 y sobre cambios en la expresión génica, podría colaborar en su comportamiento antioxidante actuando a nivel celular.

Nuestros descubrimientos están en relación con estudios previos que muestran que la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, inducida por Ach, está alterada en los vasos de conductancia en hipertensión DOCA-sal (Galisteo *et al.*, 2004, Somers *et al.*, 2000). El incremento en el O<sub>2</sub><sup>-</sup> vascular se relaciona de forma crucial con la inactivación de NO endógeno asociado a una menor respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio. De este modo el equilibrio local entre O<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO en la pared de los vasos controla el tono vascular. Nuestros resultados confirman el papel esencial de la generación vascular de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en la disfunción endotelial que muestran los anillos aórticos de las ratas DOCA-sal, puesto que el tratamiento crónico con apocinina mejora la respuesta relajante inducida por Ach. También hemos visto que los RWPs revierten esta disfunción endotelial en ratas DOCA-sal, posiblemente reduciendo la generación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en aorta, y protegiendo el NO de la inactivación. La disfunción endotelial no estuvo relacionada con cambios en la vía guanilato ciclasa-cGMP, ya que las respuestas al donador de NO, NPS, no mostraron cambios. Existen estudios previos que muestran que

la exposición de células endoteliales a RWPs (Leikert *et al.*, 2002), o ratas tratadas con estos polifenoles (Pechanova *et al.*, 2004) manifestaron un incremento en la expresión de eNOS, así que cambios en la expresión de eNOS podrían estar implicados en el mecanismo protector de los RWPs.

## 2. Efectos de los RWPs en SHR ovariectomizadas.

Al igual que el tratamiento anterior este estudio también confirma y extiende evidencias previas acerca de los efectos antihipertensivos y de la mejora de la función endotelial por RWPs en ratas macho hipertensas (Bertanova *et al.*, 2002, Pechanova *et al.*, 2004, Sarr *et al.*, 2006, Soares de Moura *et al.*, 2002). Del mismo modo que en ratas con hipertensión DOCA-sal, encontramos que los efectos antihipertensivos de los compuestos polifenólicos del vino tinto parecen estar relacionados con la atenuación del estrés oxidativo, porque las iso-PGF<sub>2α</sub> fueron significativamente reducidas por los RWPs tanto en SHR control como en las ovariectomizadas.

La característica más particular de la disfunción endotelial es una disminución de la bioactividad del NO derivado de endotelio. En aorta de rata, la vasodilatación dependiente de endotelio está casi exclusivamente relacionada con la liberación endotelial de NO. Las ratas SHR son un modelo bien conocido y ampliamente utilizado de disfunción endotelial que se agrava tras la ovariectomía, reflejando lo que ya se ha observado en mujeres hipertensas postmenopáusicas (Dantas *et al.*, 1999). Más específicamente, el grupo de ratas ovariectomizadas-placebo mostró una respuesta relajante reducida a Ach, un vasodilatador dependiente de endotelio y NO, y una respuesta inalterada a NPS, un donador de NO que relaja arterias de manera independiente de endotelio. Además, anillos aórticos intactos de ratas ovariectomizadas mostraron una contracción reducida a fenilefrina en presencia de L-NAME, un inhibidor de la eNOS, comparado con ratas control. Teniendo en cuenta todo lo anterior, estos datos indican que las ratas ovariectomizadas muestran disfunción endotelial caracterizada por una reducción en la biodisponibilidad del NO. Los RWPs fueron capaces de mejorar la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio a Ach tanto en ratas ovariectomizadas como en ratas controles sin afectar la respuesta a NPS, y restablecieron la contracción inducida por L-NAME en ratas operadas. Estos datos sugieren firmemente que los RWPs mejoran la función endotelial en SHR mejorando la bioactividad del NO.

Varios mecanismos potenciales podrían estar involucrados en el incremento de las respuestas a NO derivado de endotelio inducidas por los RWP, como cambios en la actividad o la expresión de la eNOS, cambios en los niveles vasculares de  $O_2^-$  y por tanto en la inactivación de NO conducida por  $O_2^-$ , y cambios en la sensibilidad al NO o a la vía del GMP cíclico en las células de músculo liso vascular (Cai *et al.*, 2000, Hayashi *et al.*, 1995). Como la respuesta a NPS no se vio modificada por los RWP, el tercer mecanismo puede ser descartado.

La reducción en la síntesis de NO asociada a disfunción endotelial puede venir causada por cambios en la expresión de eNOS, modificaciones postranscripcionales del enzima (ej, fosforilaciones o modificaciones en ácidos grasos), interacciones con *heat shock protein* (hsp) 90 y caveolina, o concentraciones por debajo de los niveles óptimos del sustrato L-arginina o del cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) (Hayashi *et al.*, 1995). De acuerdo con nuestros estudios previos (Vera *et al.*, 2007), encontramos que la expresión proteica y de mRNA de la eNOS en aortas de SHR no se ve alterada por la ovariectomía. La estimulación celular con agonistas movilizadores de  $Ca^{2+}$  promueve la unión de la calmodulina a la eNOS y la disociación de la caveolina del enzima, dejando el enzima activo (Feron *et al.*, 1996). Estudios previos (Xu *et al.*, 2001, Vera *et al.*, 2007) han encontrado incrementos en la expresión de caveolina-1 y una menor dilatación dependiente de NO tras la ovariectomía. De acuerdo con estos estudios nosotros también encontramos que la ovariectomía en SHR lleva a un incremento de la expresión génica y proteica de caveolina-1. Por tanto estos cambios en la expresión en este modulador de la eNOS están en consonancia con la ampliamente observada disfunción endotelial tras la ovariectomía.

Resulta interesante que los RWP no cambiaran la expresión de eNOS pero incrementaran la expresión de caveolina-1 tanto en ratas controles como en las ovariectomizadas, a pesar de que los RWP incrementan la bioactividad del NO. Este fenómeno se sostiene con estudios recientes que han demostrado que el NO ejerce una retroalimentación negativa en la regulación de la expresión de la eNOS y su regulador

alostérico, caveolina-1 (Vaziri *et al.*, 1999). De hecho, en el caso de estrés oxidativo aumentado y de disfunción endotelial, como en las SHR, niveles vasculares reducidos de NO inducen cambios coordinados en la expresión de eNOS (aumento) y su regulador alostérico negativo, caveolina-1 (reducción). Este fenómeno debería verse como un mecanismo para mantener la producción de NO bioactivo (Piech *et al.*, 2003). Los RWPs inducen cambios en la expresión de caveolina-1 (incremento) en SHR, lo que parece estar relacionado con la reducción del estrés oxidativo vascular encontrada en aortas de los animales tratados con RWPs y el consecuente aumento en la bioactividad del NO.

La NADPH oxidasa es un complejo enzimático de varias subunidades responsable de la reducción monoelectrónica del oxígeno para producir  $O_2^-$  a expensas de NADPH (Babior *et al.*, 1999). De modo similar a la oxidasa de neutrófilos, la NADPH oxidasa vascular se compone de un heterodímero del flavocitocromo b558 unido a la membrana (formado por gp91<sup>phox</sup> [nox2] u homólogos de gp91<sup>phox</sup> [nox1 y nox4] y p22<sup>phox</sup>) y tres subunidades citoplasmáticas, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y p40<sup>phox</sup>. Este complejo enzimático está considerado como la fuente más importante de  $O_2^-$  en la pared vascular (Griendling *et al.*, 2000). Previamente, se vio que la deficiencia de estrógenos llevó a un incremento de la actividad de la NADPH oxidasa, asociado con un incremento de la expresión vascular de las subunidades p22<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> en aorta de ratas ovariectomizadas, y la suplementación de estrógenos previno este efecto (Wassmann *et al.*, 2005). En nuestras condiciones experimentales también hemos encontrado en ratas ovariectomizadas un incremento en la producción de  $O_2^-$ , asociado a un incremento en la expresión de p22<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup> en la pared vascular. Los RWPs redujeron la expresión de estas subunidades tanto en ratas control como en los grupos con depleción de estrógenos.

La activación del receptor AT-1 induce vasoconstricción y crecimiento celular y lleva a la liberación de radicales libres en la pared vascular (Griendling *et al.*, 1993). Se ha demostrado que los estrógenos provocan una menor expresión de los receptores AT-1 vasculares y que la deficiencia estrogénica viene acompañada por sobreexpresión de

receptor AT-1 (Nickenig *et al.*, 1998). En ratas ovariectomizadas-placebo también encontramos un incremento en la expresión del receptor AT-1 a nivel proteico y de mRNA, y claras correlaciones funcionales, por ejemplo, cambios paralelos en la vasoconstricción inducida por Ang II en ratas operadas. El aumento en la expresión del receptor AT-1 en ratas ovariectomizadas también puede contribuir al incremento en la producción de  $O_2^-$  y al empeoramiento de la función endotelial. Sin embargo, los RWPs no modificaron la sobreexpresión del receptor AT-1 en ratas ovariectomizadas. Con lo que la mejora de la función endotelial y la reducción de la producción de  $O_2^-$  inducida por los RWPs son independientes de la regulación de la expresión del receptor AT-1.

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

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

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

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

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



y mejora la disfunción endotelial (resultados de esta tesis, Soares de Moura *et al.*, 2002), estos efectos protectores se asocian a sus propiedades antioxidantes, con lo que se reduce el estrés oxidativo sistémico y vascular.

Sin embargo, no estaba claro si los efectos en la función endotelial se debían a un efecto directo sobre la pared vascular, secundarios a la disminución en la presión sanguínea o si se deben a mecanismos neurohumorales de los RWPs. De hecho, en esta Tesis hemos visto como los RWPs reducen los niveles plasmáticos de ET-1 en ratas DOCA-sal, sin afectar a los animales control. Los resultados presentes muestran que los RWPs también son efectivos *in vitro*, aumentando la relajación inducida por Ach. Además, debería tenerse en cuenta que la concentración de RWPs fue efectiva a partir de  $10^{-4}$  g/L, indicando que este efecto pudiera ser fisiológicamente relevante (Diebolt *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta la dosis utilizada de RWPs en los tratamientos *in vivo* anteriormente descritos y sabiendo que la absorción media de los RWPs en el tracto digestivo humano está entre el 5 % y el 10 % (Duthie *et al.*, 1998), podría alcanzarse en plasma una concentración de 0,01 g/L de RWPs. Ensayamos con catequina, epicatequina y resveratrol su posible papel protector frente a la disfunción endotelial inducida por ET-1 y los tres compuestos resultaron ser eficaces en unas concentraciones entre  $10^{-7}$  y  $10^{-5}$  M. Conociendo la composición de la mezcla polifenólica utilizada, de los tres compuestos estudiados, la epicatequina es el único que a la concentración que teóricamente alcanzaría en plasma tiene efectos beneficiosos.

El efecto de la ET-1 se observó a partir de las 4 horas de incubación, incluso cuando la ET-1 estuvo ausente durante la curva a fenilefrina o Ach. De manera similar, los RWPs estuvieron presentes durante la exposición a ET-1 pero ausentes durante las pruebas de función endotelial. Estos cambios lentos y persistentes inducidos por la ET-1 son acordes con los cambios en la expresión génica de los sistemas generadores de  $O_2^-$ , como las subunidades de la NADPH oxidasa.

El exceso en la generación de  $O_2^-$  está críticamente involucrado con la inactivación de NO asociada a la disfunción endotelial en anillos aórticos de ratas DOCA-sal

(Galisteo *et al.*, 2004b, Li *et al.*, 2003c) y en anillos incubados con ET-1 (Kamata *et al.*, 2004). En nuestros experimentos, la presencia de SOD en el baño de órganos mejoró la respuesta relajante inducida por Ach en anillos aórticos expuestos a ET-1. De manera similar, Kamata *et al.*, (2004) encontraron que la co-incubación de anillos aórticos con ET-1 y PEG-SOD, un captador de  $O_2^-$  permeable a la membrana, previno por completo el empeoramiento en la relajación dependiente de endotelio a Ach inducida por ET-1. En este estudio, la apocinina, que inhibe selectivamente la actividad NADPH oxidasa, revirtió el empeoramiento en la respuesta relajante a Ach en anillos tratados con ET-1. Estos resultados muestran un papel crítico de la actividad NADPH oxidasa como moduladora del tono vascular.

Hemos visto que el incremento en la tinción a DHE inducido por ET-1 en las capas media y adventicia del vaso, donde no se expresa la eNOS, sugiere que la ET-1 activa la NADPH oxidasa llevando a un incremento en la producción aórtica de  $O_2^-$ . De hecho hemos observado que la ET-1 produce un aumento en la actividad NADPH oxidasa, efecto que previno la co-incubación con el inhibidor selectivo de la NADPH oxidasa apocinina. Los RWPs previnieron tanto el incremento en la producción vascular de  $O_2^-$  como el incremento en la actividad NADPH oxidasa, medida en ausencia de RWPs, lo que sugiere una posible interferencia con la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa. En nuestros experimentos, anillos aórticos incubados durante 4 horas con ET-1 mostraron un incremento en la expresión de p47<sup>phox</sup> pero no en la de p22<sup>phox</sup>. De este modo, este incremento en la expresión proteica de p47<sup>phox</sup> es acorde con la producción aumentada de  $O_2^-$  que encontramos en aortas estimuladas con ET-1. La co-incubación con RWPs disminuyó los niveles de esta proteína en aortas tratadas con ET-1. Todos estos resultados sugieren que los RWPs reducen el aumento en la producción de  $O_2^-$  estimulada por ET-1 disminuyendo la expresión de la subunidad p47<sup>phox</sup> de la NADPH oxidasa vascular. En resultados previos de esta Tesis (efectos sobre los modelos DOCA-sal y SHR) y en ratas con infusión de Ang II (Sarr *et al.*, 2006) la mejora de la función endotelial por la administración crónica de RWPs se asocia a una reducción en la

actividad NADPH oxidasa, que es anormalmente alta en estos animales comparado con los controles normotensos. Nuestros resultados sugieren que la disminución del  $O_2^{\cdot -}$  derivado de NADPH oxidasa, y por tanto, la disminución en la inactivación del NO pueden ser un mecanismo muy importante de la administración crónica de RWPs que contribuya a la prevención de la disfunción endotelial mediada por ET-1.

El ER $\alpha$  es una diana fundamental en la acción que tienen en el endotelio los RWPs (Chapolin *et al.*, 2010). La activación de ER por 17 $\beta$ -estradiol inhibe la actividad NADPH oxidasa mediante la regulación del mRNA y de la expresión proteica de p47<sup>phox</sup> (Sumi *et al.*, 2003). Sin embargo, en nuestros experimentos el antagonista de ER, ICI 182780, no pudo reducir el efecto protector de los RWPs en la disfunción endotelial inducida por ET-1, lo que sugiere que los ER $\alpha$  no están implicados en este efecto beneficioso. Algunos RWPs aislados parecen tener efectos agonistas sobre los PPAR $\gamma$  (Liang *et al.*, 2001). Puesto que los ligandos de PPAR $\gamma$  reducen la generación de  $O_2^{\cdot -}$  estimulada por Ang II en células endoteliales de arteria coronaria humana (Mehta *et al.*, 2003), podría ser posible que los RWPs previnieran la disfunción endotelial activando estos receptores. Sin embargo, el antagonista de PPAR $\gamma$ , GW9662, no alteró los efectos inducidos por RWPs, lo que sugiere que estos efectos protectores están desvinculados de la activación PPAR $\gamma$ .

Un paso fundamental provocado por la ET-1 en la pared vascular es la activación de la cascada de protein kinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Foschi *et al.*, 1997, Daou *et al.*, 2004, Yogi *et al.*, 2007). De las principales MAPKs, las kinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), p38 MAPK y la proteína kinasa activada por estrés/c-Jun N-terminal kinasa (SAPK/JNK) son las mejor caracterizadas (Pearson *et al.*, 2001). Recientemente en este laboratorio, Romero *et al.*, (2010), haciendo uso de la inhibición farmacológica de estas MAPKs principales encontraron que sólo la inhibición de ERK1/2 era capaz de prevenir el incremento tanto de la producción de  $O_2^{\cdot -}$  como de la expresión de p47<sup>phox</sup> inducidos por ET-1, no teniendo ningún efecto la inhibición de p38MAPK o de JNK. Los vinos tintos inhiben la fosforilación de ERK1/2

inducida por el factor de crecimiento derivado de plaquetas en CMLV de rata y humanas. Este efecto inhibitorio estaba relacionado con la acumulación de flavonoides en el vino (Sparwel *et al.*, 2009). En nuestras condiciones experimentales la ET-1 estimula la fosforilación de ERK1/2 y este efecto fue inhibido por los RWPs, lo que sugiere que este efecto inhibitorio podría ser responsable, al menos en parte, de la reducción en la producción de  $O_2^-$  por la NADPH oxidasa inducida por estos compuestos en anillos aórticos estimulados con ET-1.



**Conclusiones.**

---



1. El tratamiento crónico con una mezcla de polifenoles del vino tinto a la dosis de 40 mg/Kg/día por vía oral en ratas DOCA-sal, previene el desarrollo de hipertensión y disfunción endotelial. La mejora de la función endotelial se debe a que los polifenoles del vino tinto disminuyen la actividad del sistema NADPH oxidasa y/o reducen la liberación de ET-1 en ratas hipertensas, lo que conduce a una menor generación de  $O_2^{\cdot-}$ .
2. El tratamiento crónico con una mezcla de polifenoles del vino tinto a la dosis de 40 mg/Kg/día por vía oral en SHR ovariectomizadas, disminuye la hipertensión y la disfunción endotelial. Estos efectos se deben una menor expresión de las subunidades p22<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup> del sistema NADPH oxidasa, lo que conduce a una menor generación de  $O_2^{\cdot-}$  y a un aumento de la biodisponibilidad de NO.
3. Los polifenoles del vino tinto previenen la disfunción endotelial originada por ET-1. Este efecto está relacionado con la reducción de la generación de radicales  $O_2^{\cdot-}$ , mediada por la inhibición de la sobreexpresión de la subunidad citosólica p47<sup>phox</sup>, que conduce a una menor actividad NADPH oxidasa. Estos efectos parecen ser independientes de la activación de ER $\alpha$  y PPAR $\gamma$  y estar relacionados con la inhibición de ERK1/2.





**Conclusions.**

---



1. Chronic treatment with a mixture of red wine polyphenolic compounds at a dose of 40 mg/Kg/day by gavage in DOCA-salt hypertensive rats prevents the development of hypertension and endothelial dysfunction. The improvement in endothelial function is due to the ability of red wine polyphenols to decrease NADPH oxidase activity and/or to reduce ET-1 release in hypertensive rats, which leads to a lower generation of  $O_2^-$ .
2. Chronic treatment with a mixture of red wine polyphenolic compounds at a dose of 40 mg/Kg/day, by gavage in ovariectomized SHR rats reduces hypertension and endothelial dysfunction. These effects are due to a decrease in NADPH oxidase subunits, p22<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup>, which leads to a reduced  $O_2^-$  production and an increase in NO bioactivity.
3. Red wine polyphenols prevent ET-1-induced endothelial dysfunction. This effect is related to the reduction of vascular  $O_2^-$  production through down-regulation of the cytosolic subunit p47<sup>phox</sup>, which results in reduced NADPH oxidase activity. These effects seem to be independent of ER $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activation and related to ERK1/2 inhibition.



## **Bibliografía.**

---



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bae EH, Kim IJ, Ma SK, Kim SW. Rosiglitazone prevents the progression of renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2010; 33:255-62.

Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, Ray SD, Sen CK, Preuss HG. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 957:260-70.

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

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

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

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

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

Best PJ, McKenna CJ, Hasdai D, Holmes DR Jr, Lerman A. Chronic endothelin receptor antagonism preserves coronary endothelial function in experimental hypercholesterolemia. *Circulation* 1999; 99:1747–52.

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

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

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

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

Bouallegue A, Daou GB, Srivastava AK. Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Curr Vasc Pharmacol* 2007; 5:45-52.

Boulanger C y Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990; 85:587-90.

Bousette N, Giaid A. Endothelin-1 in atherosclerosis and other vasculopathies. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:578-87.

Brenna O, Pagliarini E. Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *J Agric Food Chem* 2001; 49:4841–4844.

Broekmans WM, Klöpping-Ketelaars WA, Kluft C, van den Berg H, Kok FJ, van Poppel G. Fruit and vegetables and cardiovascular risk profile: a diet controlled intervention study. *Eur J Clin Nutr.* 2001; 55:636-42.

Broncel M, Kozirog M, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Chojnowska-Jeziarska J. Aronia melanocarpa extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit.* 2010; 16:CR28-34.

Brunner F, Brás-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: Essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 2006; 111:508–31.

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

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

Callera, G.E.; Tostes, R.C.; Yogi, A.; Montezano, A.C.; Touyz, R.M. Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. *Clin. Sci. (Lond.)* 2006; 110:243-253.

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

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

Carbonneau, M.A., Leger, C.L., Monnier, L., Bonnet, C., Michel, F., Fouret, G., Dedieu, F., Descomps, B. Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without

changing the lipoprotein Cu(2+)-oxidizability: possible explanation by phenolic location. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1997; 51:682–690.

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

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

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

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

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

Chalopin M, Tesse A, Martínez MC, Rognan D, Arnal JF, Andriantsitohaina R. Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium. *PLoS One.* 2010 1;5:e8554.

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

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

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

Cishek, M.B., Galloway, M.T., Karim, M., German, J.B., Kappagoda, C.T. Effect of red wine on endothelium-dependent relaxation in rabbits. *Clin. Sci. (Lond.)* 1997; 93:507–511.

Collins P, Shay J, Jiang C, Moss J. Nitric oxide accounts for dose-dependent estrogen-mediated coronary relaxation after acute estrogen withdrawal. *Circulation*. 1994;90:1964–1968.

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

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

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

Corder, R., Douthwaite, J.A., Lees, D.M., Khan, N.Q., Viseu Dos Santos, A.C., Wood, E.G., Carrier, M.J. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* 2001; 414:863–864.

Cos P, De Bruyne T, Apers S, Vanden Berghe D, Pieters L, Vlietinck AJ. Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med*. 2003;69:589–599.

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

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

Cuman, R.K.N., Nigro, D., Carvalho, M.H.C., Scivoletto, R., Fortes, Z.B. Influence of enalapril treatment on the vascular reactivity of DOCA-salt hypertensive rats. *Endothelium*, 1994; 2, 105-111.

Dantas AP, Tostes RC, Fortes ZB, Costa SG, Nigro D, Carvalho MH. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2002;39: 405– 411.

Dantas AP, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999; 34:914–919.

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

Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res.* 2002;90:413– 419.

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

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

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

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

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

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

Dean SA, Tan J, O'Brien ER, Leenen FH. 17 beta-estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 288:R759–R766.

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

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

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

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

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

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

Donovan, JL.; Manach, C.; Faulks, RM.; Kroon, PA. Absorption and metabolism of plant secondary metabolites. In: Crozier, A.; Clifford, MN.; Ashihara, H., editors. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing; Oxford, UK: 2006. p. 303-351.

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

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

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

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

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

Duthie, G.G., Pedersen, M.W., Gardner, P.T., Morrice, P.C., Jenkinson, A.M., McPhail, D.B., Steele, G.M. The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1998; 52, 733–736.

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

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

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

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

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

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

Elmarakby, A.A.; Loomis, E.D; Pollock, J.S.; Pollock, D.M. NADPH oxidase inhibition attenuates oxidative stress but not hypertension produced by chronic ET-1. *Hypertension* 2005; 45:283-287.

Emori T, Hirata Y, Imai T, Eguchi S, Kanno K, Marumo F. Cellular mechanism of natriuretic peptides-induced inhibition of endothelin-1 biosynthesis in rat endothelial cells. *Endocrinology* 1993; 133:2474-80.

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



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

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

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

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

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

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

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

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

Fitzpatrick, D.F., Hirschfield, S.L., Coffey, R.G. Endotheliumdependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am. J. Physiol*. 1993; 265:H774–H778.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fu M, Zhang J, Zhu X, Myles DE, Willson TM, Liu X, Chen YE. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with Smad3. *J Biol Chem*. 2001 Dec 7;276(49):45888-94.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S, Eto M, Ako J, Liang YQ, Sudoh N, Hosoda K, Nakahara K, Toba K, Ouchi Y: Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation* 2000; 101:805-811.

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

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

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

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

Jin, L.; Beswick, R.A.; Yamamoto, T.; Palmer, T.; Taylor, T.A.; Pollock, J.S.; Pollock, D.M.; Brands, M.W.; Webb, R.C. Increased reactive oxygen species contributes to kidney injury in mineralocorticoid hypertensive rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006; 57:343-357.

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

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

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

Kamata K, Kanie N, Matsumoto T, Kobayashi T. Endothelin-1-induced impairment of endothelium-dependent relaxation in aortas isolated from controls and diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:S186-S90.

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

Kane MO, Etienne-Selloum N, Madeira SV, Sarr M, Walter A, Dal-Ros S, Schott C, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Endothelium-derived contracting factors mediate the Ang II-induced endothelial dysfunction in the rat aorta: preventive effect of red wine polyphenols. *Pflugers Arch.* 2009 Nov 29.

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

Katusić ZS, Shepherd JT. Endothelium-derived vasoactive factors: II. Endothelium-dependent contraction. *Hypertension.* 1991; 18,:III86-92.

Keaney JF Jr, Shwaery GT, Xu A, Nicolosi RJ, Loscalzo J, Foxall TL, Vita JA. 17 beta-estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. *Circulation.* 1994;89:2251–2259.

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

Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AL. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *phytochem* 2000; 55:77-85.

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

Keevil JG, Osman HE, Reed JD, et al. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr* 2000; 130, 53-56.

Khan, N.Q., Lees, D.M., Douthwaite, J.A., Carrier, M.J., Corder, R. Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. *Clin. Sci.* 2002 ; (Lond.) 103 (Suppl. 48):72S-75S.

Kim, S.; Ohta, K.; Hamaguchi, A.; Omura, T.; Yukimura, T.; Miura, K.; Inada, Y.; Wada, T.; Ishimura, Y.; Chatani, F.; Iwao, H. Role of angiotensin II in renal injury of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* 1994; 24:195-204.

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

Kitamoto, S.; Egashira, K.; Kataoka, C.; Usui, M.; Koyanagi, M.; Takemoto, M.; Takeshita, A. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats increases aortic superoxide anion production via the action of angiotensin II. *J. Hypertens.* 2000; 18:1795-1800.

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

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

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

Kohno M, Yokokawa K, Horio T, Yasunari K, Murakawa K, Takeda T. Atrial and brain natriuretic peptides inhibit the endothelin-1 secretory response to angiotensin II in porcine aorta. *Circ Res* 1992; 70:241-7.



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

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

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

Kozararevic D, McGee D, Vojvodic N, Racic Z, Dawber T, Gordon T, Zukel W. Frequency of alcohol consumption and morbidity and mortality: The Yugoslavia Cardiovascular Disease Study. *Lancet*. 1980; 1:613-6.

Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* 2004; 80:15-21.

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

Kuhlmann D, Ragan C, Ferrebee JW, Atchley DW, Loeb RF. Toxic effects of desoxycorticosterone esters in dogs. *Science*. 1939 Nov 24; 90:496-497.

Kumar KV, Das UN. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commun*. 1993; 19:59-66

Kuneš J, Hojná S, Kadlecová M, Dobešová Z, Rauchová H, Vokurková M, Loukotová J, Pecháňová O, Zicha J: altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: the role of relative NO deficiency. *Physiol Res* 2004; 53: S23-S34.

Lahera V, Navarro J, Biondi ML, Ruilope LM, Romero JC. Exogenous cGMP prevents decrease in diuresis and natriuresis induced by inhibition of NO synthesis. *Am J Physiol* 1993; 264:F344-F347.

Lancaster JR: nitric oxide in cell. *am sci* 1992; 80: 248-249.

Lacour, C.; Canals, F.; Galindo, G.; Cazaubon, C.; Segondy, D.; Nisato, D. Efficacy of SR 47436 (BMS-186295), a non-peptide angiotensin AT1 receptor antagonist in hypertensive rat models. *Eur. J. Pharmacol*. 1994; 264:307-316.

Larivière R, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1993; 21, 294-300.

Leikert, J.F., Rathel, T.R., Wohlfart, P., Cheynier, V., Vollmar, A.M., Dirsch, V.M. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 2002; 106:1614– 1617.

Li, H., Forstermann, U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J. Pathol.* 2000; 190:244–254.

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

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

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

Li, L.; Fink, G.D.; Watts, S.W.; Northcott, C.A.; Galligan, J.J.; Pagano, P.J.; Chen, A.F. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation* 2003c; 107:1053-1058.

Liang YC, Tsai SH, Tsai DC, Lin-Shiau SY, Lin LK. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett* 2001;496:12-8.

Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Walsh BW, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, Creager MA. Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Ann Intern Med*. 1994;121:936 –941.

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

Liu, J.C., Chen, J.J., Chan, P., Cheng, C.F., Cheng, T.H. Inhibition of cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression by resveratrol. *Hypertension* 2003; 42, 1198–1205.

Loke WM, Hodgson JM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Puddey IB, Croft KD. Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88:1018-25.

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

Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet.* 2006; 367:1747-57.

Lopez-Ongil, S.; Saura, M.; Zaragoza, C.; Gonzalez-Santiago, L.; Rodriguez-Puyol, M.; Lowenstein, C.J.; Rodriguez-Puyol, D. Hydrogen peroxide regulation of bovine endothelin-converting enzyme-1. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 32:406-413.

Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation.* 1999 Feb 16;99(6):779-85.

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

Lückhoff A, Pohl U, Mülsch A, Busse R: differential role of extra and intracellular calcium in the release of edrf and prostacyclin from cultured endothelial cells. *br j pharmacol* 1988; 95: 189-196,.

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

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

Lüscher TF, Raij L, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. *Hypertension.* 1987; 9, 157-63.

Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology* 2006;21:269-80.

- Maiti, T.K., Chatterjee, J., Dasgupta, S. Effect of green tea polyphenols on angiogenesis induced by an angiogenin-like protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 308, 64– 67.
- Makino A, Kamata K. Elevated plasma endothelin-1 level in streptozotocin-induced diabetic rats and responsiveness of the mesenteric arterial bed to endothelin-1. *Br J Pharmacol* 1998;123:1065-72.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:230S–242S.
- Marmot MG, Rose G, Shipley MJ, Thomas BJ. Alcohol and mortality: explaining the U-shaped curve. *Lancet* 1981; 1:580–583
- Marques-Vidal P, Cambou JP, Nicaud V, et al. Cardiovascular risk factors and alcohol consumption in France and Northern Ireland. *Atherosclerosis* 1995; 115:225–232.
- Martin S, Andriambelason E, Takeda K, Andriantsitohaina R: red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *br j pharmacol* 2002; 135: 1979-1987.
- Martín-Carrón N, Saura-Calixto F, Goñi I. Effects of dietary fibre and polyphenol-rich grape products on lipidaemia and nutritional parameters in rats. *J Sci Food.* 2000.
- Martín-Carrón N, Goñi I, Larrauri JA, et al. Reduction in serum total and LDL cholesterol concentrations by a dietary fiber and polyphenol-rich grape product in hypercholesterolemic rats. *Nutr Res* 1999; 19, 1371–1381.
- Maschio G, Oldrizzi L, Tessitore N, D'Angelo A, Valvo E, Lupo A, Loschiavo C, Fabris A, Gammaro L, Rugiu C, Panzetta G. Effects of dietary protein and phosphorus restriction on the progression of early renal failure. *Kidney Int.* 1982; 22, 371-376.
- Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet. Agric* 80, 1183–1188.1994 Jul 16; 344(8916):193-4.
- Mehta JL, Hu B, Chen J, Li D. Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2203-8.
- Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science.* 2005;308:1583–1587.

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

Miguel-Carrasco JL, Monserrat MT, Mate A, Vázquez CM. Comparative effects of captopril and l-carnitine on blood pressure and antioxidant enzyme gene expression in the heart of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2010.

Miller VM y Burnett JC Jr. Modulation of NO and endothelin by chronic increases in blood flow in canine femoral arteries. *Am J Physiol* 1992; 263:H103-8.

Minshall RD, Sessa WC, Stan RV, Anderson RG, Malik AB. Caveolin regulation of endothelial function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285:L1179–83.

Miyamoto Y, Akaike T, Yoshida M, Goto S, Horie H, Maeda H. Potentiation of nitric oxide-mediated vasorelaxation by xantine oxidase inhibitors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 211(4):366-376.

Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1999; 61:391-415.

Moon SK, Cho GO, Jung SY, Gal SW, Kwon TK, Lee YC, Madamanchi NR, Kim CH. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Feb 21; 301(4):1069-78

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

Morrow JD, Roberts LJ 2nd. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* 1996; 51(1):1-9.

Muller DN, Fiebeler A, Park JK, Dechend R, Luft FC. Angiotensin II and endothelin induce inflammation and thereby promote hypertension-induced end-organ damage. *Clin Nephrol* 2003;60:S2-S12.

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

Mulvany MJ, Baandrup U, Gundersen HJ. Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector. *Circ Res* 1985; 57(5):794-800.

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

Nagao T, Illiano S, Vanhoutte PM. Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am J Physiol* 1992a; 263:H1090-H1094.

Nagao T, Vanhoutte PM. Hyperpolarisation as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J Physiol*. 1992b; 445:355-67.

Naissides M, Mamo JCL, James AP, et al. The effect of chronic consumption of red wine on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2006; 185, 438–445.

Nakano D, Itoh C, Ishii F, Kawanishi H, Takaoka M, Kiso Y, Tsuruoka N, Tanaka T, Matsumura Y. Effects of sesamin on aortic oxidative stress and endothelial dysfunction in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Biol Pharm Bull*. 2003 Dec; 26(12):1701-5.

Nardini M, Scaccini C, Packer L, et al. In vitro inhibition of the activity of phosphorylase kinase, protein kinase C and protein kinase A by caffeic acid and a procyanidin-rich pine bark (*Pinus maritima*) extract. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1474, 219–225.

Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003a Oct 17;310(2):371-7.

Ndiaye, M., Chataigneau, T., Chataigneau, M., Schini-Kerth, V.B. Red wine polyphenols induce endothelium-dependent NO-mediated relaxation in the isolated porcine coronary artery by inducing a PI3kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO synthase. *Circulation* 2003b; 108 (17), IV–101.

Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 2003; 42:29–42.

Nickenig G, Bäumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stäblein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Böhm M. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation*. 1998;97:2197–2201.

Nicod L, Rodriguez S, Jacqueson A, Viollon-Abadie C, Berthelot A, Richert L. Clofibric acid or diethylmaleate supplemented diet decrease blood pressure in DOCA-salt treated male Sprague Dawley rats--relation with liver antioxidant status. *Mol Cell Biochem*. 2000; 213, 65-73.

Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr*. 2001; 74, 418– 425.

Nigdikar SV, Williams NR, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr* 1998; 68:258–265.

Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH, Scivoletto R. Chronic but not acute treatment with hydralazine reverses the decreased endothelium-dependent responses in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 1989; 11,573-586.

Numaguchi Y, Harada M, Osanai H, Hayashi K, Toki Y, Okumura K, Ito T, Hayakawa T. Altered gene expression of prostacyclin synthase and prostacyclin receptor in the thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 1999 Mar;41(3):682-8.

Nunes VW, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH, Zorn TM, Scivoletto R. Influence of enalapril on the endothelial function of DOCA-salt hypertensive rats. *Gen Pharmacol*. 2000; 34, 117-125.

Núñez-Córdoba JM, Martínez-González MA, Bes-Rastrollo M, Toledo E, Beunza JJ, Alonso A. Alcohol consumption and the incidence of hypertension in a Mediterranean cohort: the SUN study. *Rev Esp Cardiol*. 2009 Jun;62(6):633-41.

Oak, M.H., Chataigneau, M., Keravis, T., Chataigneau, T., Beretz, A., Andriantsitohaina, R., Stoclet, J.C., Chang, S.J., Schini-Kerth, V.B. Red wine polyphenolic compounds inhibit vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2003a ; 23, 1001–1007.

Oak, M.H., El Bedoui, J., Schini-Kerth, V.B. The red wine anthocyanins, delphinidin and cyanidin, strongly inhibit PDGFABinduced VEGF expression in vascular smooth

muscle cells by preventing the activation of p38 MAPK pathway. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 2003b; 96, 373.

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

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

Ohta K, Kim S, Hamaguchi A, Yukimura T, Miura K, Takaori K, Iwao H. Role of angiotensin II in extracellular matrix and transforming growth factor-beta 1 expression in hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1994; 269, 115-119.

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

Orallo, F., Alvarez, E., Camina, M., Leiro, J.M., Gomez, E., Fernandez, P. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol. Pharmacol.* 2002; 61, 294– 302.

Ortíz MC, Fortepiani LA, Ruiz-Marcos FM, Atucha NM, García-Estañ J. Role of AT1 receptors in the renal papillary effects of acute and chronic nitric oxide inhibition. *Am J Physiol.* 1998 Mar;274(3 Pt 2):R760-6.

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

Pace-Asciak CR, Rounova O, Hahn SE, et al. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin Chim Acta* 1996; 246:163–182

Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, et al. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 1995; 236:207–219.

Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, Mendelsohn ME. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res.* 2002;90:1087–1092.

Park JW, Choi YJ, Jang MA, et al. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells. *Cancer Lett* 2001; 163:43–49.



Pasterkamp, G., Schoneveld, A.H., Hijnen, D.J., de Kleijn, D.P., Teepen, H., van der Wal, A.C., Borst, C. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis* 2000; 150, 245– 253.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B-E, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001;22:153-83.

Pechánová O, Zicha J, Paulis L, Zenebe W, Dobesová Z, Kojsová S, Jendeková L, Sládková M, Dovinová I, Simko F, Kunes J. The effect of N-acetylcysteine and melatonin in adult spontaneously hypertensive rats with established hypertension. *Eur J Pharmacol.* 2007 Apr 30;561(1-3):129-36.

Pechánová, O.; Bernatova, I.; Babal, P.; Martinez, M.C.; Kysela, S.; Stvrtina, S.; Andriantsitohaina, R. Red wine polyphenols prevent cardiovascular alterations in L-NAME-induced hypertension. *J. Hypertens.* 2004; 22:1551-1559.

Pedro-Botet J, Covas MI, Martín S, Rubiés-Prat J. Decreased endogenous antioxidant enzymatic status in essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2000 Jun;14(6):343-5.

Peng N, Clark JT, Wei CC, Wyss JM. Estrogen depletion increases blood pressure and hypothalamic norepinephrine in middle-aged spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2003;41:1164 –1167.

Perret B, Ruidavets JB, Vieu C, et al. Alcohol consumption is associated with enrichment of high-density lipoprotein particles in polyunsaturated lipids and increased cholesterol esterification rate. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26:1134–1140.

Piech A, Dessy C, Havaux X, Feron O, Balligand JL. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2003; 57: 456 – 467.

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:639-50.

Pignatelli P, Di Santo S, Buchetti B, et al. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J* 2006; 20, 1082–1089.

Plumpton C, Champeney R, Ashby MJ, Kuc RE, Davenport AP. Characterization of endothelin isoforms in human heart: endothelin-2 demonstrated. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22:S26-8.

Poolman TM, Ng LL, Farmer PB, et al. Inhibition of the respiratory burst by resveratrol in human monocytes: correlation with inhibition of PI3K signaling. *Free Radic Biol Med* 2005; 39, 118–132.

Price SF, et al. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *Am J Enol Viticulture* 1995;46:187–94.

Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W, Nawroth PP. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes*. 2000; 49, 1561-1570.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 1987a; 92:181–7.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The antiaggregating properties of vascular endothelium: Interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987b; 92:639–46.

Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, et al. Resveratrol arrests cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; 250:53–58.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97:1916-1923.

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

Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339:1523–1526.

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

Rivard A, Andres V. Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases. *Histol Histopathol* 2000; 15:557–571.

Romero M, Jiménez R, 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 Jan;202(1):58-67.

Romero M, Jiménez R, Sánchez M, López-Sepúlveda R, Zarzuelo A, Tamargo J, et al. Vascular superoxide production by endothelin-1 requires Src non receptor protein tyrosine kinase and MAPK activation. *Atherosclerosis* 2010, (in press).

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

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002; 288:321–333.

Rotondo S, Di Castelnuovo A, de Gaetano G. The relationship between wine consumption and cardiovascular risk: from epidemiological evidence to biological plausibility. *Ital Heart J*. 2001 Jan;2(1):1-8.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1986; 250(5 Pt 2):H815-821.

Ruef, J.; Moser, M.; Kubler, W.; Bode, C. Induction of endothelin-1 expression by oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Pathol*. 2001; 10:311-315.

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

Russo A, Palumbo M, Aliano C, et al. Red wine micronutrients as protective agents in Alzheimer-like induced insult. *Life Sci* 2003; 72:2368–2379.

Saavedra JM, Groebecker H, Axelrod J. Changes in central catecholaminergic neurons in the spontaneously (genetic) hypertensive rat. *Circ Res* 1978; 42(4):529-534.

Sainz, J.; Wangenstein, R.; Rodriguez Gomez, I.; Moreno, J.M.; Chamorro, V.; Osuna, A.; Bueno, P.; Vargas, F. Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition. *Am. J. Hypertens.* 2005; 18:871-877.

Saito N, Mukaino S, Ogino K, Kawai C. Vascular lesions in hypertensive rats under salt loading: kidney renin and lysosomal enzymes. *Clin Sci Mol Med Suppl* 1976 Dec;3:49s-51s.

Sakurai T, Goto K. Endothelins. Vascular actions and clinical implications. *Drugs.* 1993 Nov;46(5):795-804.

Sánchez M, Lodi F, Vera R, et al. Quercetin and isorhamnetin prevent endothelial dysfunction, superoxide production, and overexpression of p47phox induced by angiotensin II in rat aorta. *J Nutr* 2007; 137, 910–915.

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 Jan;24(1):75-84.

Sarr M, Chataigneau M, Martins S, Schott C, El Bedoui J, Oak MH, Muller B, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res.* 2006 Sep 1;71(4):794-802.

Saucier CT, Waterhouse AL. Synergetic activity of catechin and other antioxidants. *J Agric Food Chem.* 1999 Nov;47(11):4491-4

Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000;101:1899-906.

Schramm D, Pearson D, German J. Endothelial cell basal PGI release is stimulated by wine in vitro: One mechanism that may mediate the vasoprotective effects of wine. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1997; 8:647-651.

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

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

Schröder H, Ferrández O, Jimenez Conde J, Sánchez-Font A, Marrugat J. Cardiovascular risk profile and type of alcohol beverage consumption: a population-based study. *Ann Nutr Metab.* 2005 Mar-Apr;49(2):100-6.

Schuldt EZ, Ckless K, Simas ME, Farias MR, Ribeiro-Do-Valle RM: butanolic fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq. relaxes rat thoracic aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35: 234-239.

Sedeek MH, Llinas MT, Drummond H, Fortepiani L, Abram SR, Alexander BT, Reckelhoff JF, Granger JP. Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension. *Hypertension.* 2003 Oct;42(4):806-10.

Seifi B, Kadkhodae M, Karimian SM, Zahmatkesh M, Shams S, Bakhshi E. Reduction of kidney damage by supplementation of vitamins C and E in rats with deoxycorticosterone-salt-induced hypertension. *Iran J Kidney Dis.* 2009 Oct;3(4):197-202.

Seigneur M, Bonnet J, Dorian B, et al. Effect of the consumption of alcohol, white wine, and red wine on the platelet function and serum lipids. *J Appl Cardiol* 1990; 5:215-222.

Sen CK, Bagchi D. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract. *Mol Cell Biochem.* 2001 Jan;216(1-2):1-7

Sesso HD, Cook NR, Buring JE, Manson JE, Gaziano JM. Alcohol consumption and the risk of hypertension in women and men. *Hypertension.* 2008; 51:1080-7.

Selye, H. *En: experimental cardiovascular diseases, part 1.* New York: Springer-Verlag. 1970.

Seyle H., Hall, C.E. Production of nephrosclerosis and cardiac hypertrophy in the rat by desoxycorticosterone acetate overdosage. *Am. Heart J.*, 1944; 27, 338-344.

Seyle H., Hall, C.E., Rowley, E.M. Malignant hypertension produced by treatment with desoxycorticosterone acetate and sodium chloride. *Can. Med Assoc.*, 1943; 49, 88-92.

Seyle, H, Hall, C.E. Pathologic changes induced in various species by overdosage with desoxycortisone. *Arch. Pathol.*, 1943; 36, 19-31.

Shaper AG, Wattamethee G, Walker M. Alcohol and mortality in British men: explaining the U-shaped curve. *Lancet* 1988; 1:1267–273.

Shimada, K., Wanatabe, H., Hosoda, K., Takeuchi, K., Yoshikawa, J. Effect of wine in coronary flow-velocity reserve. *Lancet* 1999; 354, 1002.

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

Silver AE, Beske SD, Christou DD, Donato AJ, Moreau KL, Eskurza I, Gates PE, Seals DR. Overweight and obese humans demonstrate increased vascular endothelial NAD(P)H oxidase-p47(phox) expression and evidence of endothelial oxidative stress. *Circulation*. 2007 Feb 6;115(5):627-37.

Soares de Moura, R.; Costa Viana, F.S.; Souza, M.A.V.; Kovary, K.; Guedes, D.C.; Oliviera, E.P.; Rubenich, L.M.; Carvalho, L.C.; Oliveira, R.M.; Tano, T.; Gusmao Correia, M.L. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of vinifera grape-skin extract. *J. Pharm. Pharmacol.* 2002; 54:1515-1520.

Somers, M.J.; Mavromatis, K.; Galis, Z.S.; Harrison, D.G. Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation* 2000; 101:1722-8.

Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, et al. Superoxide production and expression of NOX family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105, 1429–1435.

Sparwel J, Vantler M, Caglayan E, Kappert K, Fries JW, Dietrich H, et al. Differential effects of red and white wines on inhibition of the platelet-derived growth factor receptor: impact of the mash fermentation. *Cardiovasc Res* 2009;81:758-70.

St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*. 1979 May 12;1(8124):1017-20.

Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1999 Sep 7;100(10):1050-5.

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

Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.* 2004 Oct 1;500(1-3):299-313.

Stolk J, Rossie W, Dijkman JH. Apocynin improves the efficacy of secretory leukocyte protease inhibitor in experimental emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:1628-31.

Sumpio BE, Pradhan S. Artherosclerosis. Biological and surgical considerations. In: Ascher E, Hollier L, Strandness DE, eds. Haimovici's vascular surgery. 5th ed. Malden, MA: Blackwell Science, Inc; 2004:137–163.

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

Swingle WT, Haller HL, Siegler EH, Swingle MC. A chinese insecticidal plant, *tripterygium wilfordii*, introduced into the united states. *Science.* 1941 Jan 17;93(2403):60-61.

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

Takaoka M, Kobayashi Y, Yuba M, Ohkita M, Matsumura Y. Effects of alpha-lipoic acid on deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension in rats.. *Eur J Pharmacol.* 2001; 424, 121-129.

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

Tauber AI, Fay JR, Marletta MA. Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Biochem Pharmacol* 1984; 33, 1367–1369.

Thorn, G.W., Dorrance, S.S., DAY, E. Addison's disease: evaluation of synthetic deoxycorticosterone acetate therapy in one hundred and fifty-eight patients. *Ann. Intern. Med.* 1942; 16, 1053-1096.

Tomita H, Egashira K, Ohara Y, Takemoto M, Koyanagi M, Katoh M, Yamamoto H, Tamaki K, Shimokawa H, Takeshita A: early induction of transforming growth factor- $\beta$  via angiotensin ii type 1 receptors contributes to cardiac fibrosis induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension* 1998; 32: 273-279.

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

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

Toth KM, Berger EM, Beehler CJ, Repine JE. Erythrocytes from cigarette smokers contain more glutathione and catalase and protect endothelial cells from hydrogen peroxide better than do erythrocytes from nonsmokers. *Am Rev Respir Dis.* 1986 Aug;134(2):281-4.

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signalling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.* 2004;44:248-252.

Touyz RM, Schiffrin EL. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens* 2001; 19:1245-1254.

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

Truelsen T, Gronbaek M, Schnohr P, Boysen G. Intake of beer, wine, and spirits and risk of stroke : the copenhagen city heart study. *Stroke.* 1998 Dec;29(12):2467-72.

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

Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, et al. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37WHO MONICA Project populations. *Lancet* 1999;353:1547–1557.

Ulker S, McKeown PP, Bayraktutan U. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension.* 2003 Mar;41(3):534-9. Epub 2003 Feb 17.

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



Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol* 2005; 144:449–458.

Vaziri ND, Wang XQ. cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide. *Hypertension*. 1999; 34:1237–1241.

Vendrov AE, Hakim ZS, Madamanchi NR, et al. Atherosclerosis is attenuated by limiting superoxide generation in both macrophages and vessel wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27, 2714–2721.

Vera R, Jiménez R, Lodi F, Sa´nchez M, Galisteo M, Zarzuelo A, Pe´rez-Vizca´no F, Duarte J. Genistein restores caveolin-1 and AT-1 receptor expression and vascular function in large vessels of ovariectomized hypertensive rats. *Menopause*. 2007;14:933–940.

Vera R, Galisteo M, Villar IC, Sanchez M, Zarzuelo A, Perez-Vizcaino F, Duarte J. Soy isoflavones improve endothelial function in spontaneously hypertensive rats in an estrogen-independent manner: role of nitric oxide syntase, superoxide, and cyclooxygenase metabolites. *J Pharamcol Exp Ther* 2005 Sep;314(3):1300-1309.

Versteeg DH, Palkovits M, Van der Gungten, Wijnen HL, Smeets GW, de Jong W. Catecholamine content of individual brain regions of spontaneously hypertensive rats (SH-rats). *Brain Res* 1976 Aug 13;112(2):429-434.

Vieira, O., Escargueil-Blanc, I., Meilhac, O., Basile, J.P., Laranjinha, J., Almeida, L., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 123, 565– 573.

Viel EC, Benkirane K, Javeshghani D, Touyz RM, Schiffrin EL. Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Jul;295(1):H281-8.

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

Vinson JA, Hontz BA. Phenol antioxidant index: Comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *J Agric Food Chem* 1995;43:401–403.

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

Viridis A, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Gennazzani A, Buralli S, Taddei S, Salvetti A. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation*. 2000;101:2258 – 2263.

Vitaglione P, Ottanelli B, Milani S, Morisco F, Caporaso N, Fogliano V. Dietary trans-resveratrol bioavailability and effect on CCl4-induced liver lipid peroxidation. *J Gastroenterol Hepatol*. Sep 24;2008.

Vitrac X, Desmoulière A, Brouillaud B, Krisa S, Deffieux G, Barthe N, Rosenbaum J, Mérillon JM. Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci* 2003;72:2219–2233.

Wada, T.; Kanagawa, R.; Ishimura, Y.; Inada, Y.; Nishikawa, K. Role of angiotensin II in cerebrovascular and renal damage in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J. Hypertens*. 1995; 13:113-122.

Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res*. 1991; 5:3867-73.

Wallerath, T., Poleo, D., Li, H., Forstermann, U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2003; 41, 471– 478.

Wallerath, T., Deckert, G., Ternes, T., Anderson, H., Li, H., Witte, K., Forstermann, U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002; 106, 1652– 1658.

Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper G, Whincup PH, Rumley A, Walker M, Lennon L. The effects of different alcoholic drinks on lipids, insulin and haemostatic and inflammatory markers in older men. *Thromb Haemost*. 2003 Dec;90(6):1080-7.

Warner TD, Schmidt HW, Murad F. Interactions of endothelins and EDRF in bovine native endothelial: selective effects of endothelin-3. *Am J Physiol* 1992; 262:H1600-5.

Wassmann K, Wassmann S, Nickenig G. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circ Res*. 2005; 97:1046 –1054.

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

Waterhouse AL, German J, Walzem R, et al. Is it time for a wine trial? *Am J Clin Nutr* 1998; 68:220–221.

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

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

Winternitz JL. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Br Heart J* 1993;69(1 Suppl):S12-S18.

Wiinber N, Hoegholm A, Christensen HR, Bang LE, Mikkelsen KL, Nielsen PE, Svendsen TL, Kampmann JP, Madsen NH, Bentzon MW. 24-h Ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender. *Am J Hypertens*. 1995;8:978-986.

Wong PC, Price WA Jr, Chiu AT, Carini DJ, Duncia JV, Johnson AL, Wexler RR, Timmermans PB. Hypotensive action of DuP 753, an angiotensin II antagonist, in spontaneously hypertensive rats. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: X. *Hypertension* 1990; 15(5):459-468.

Woodward M, Tunstall-Pedoe H. Coffee and tea consumption in the Scottish Heart Health Study follow up: conflicting relations with coronary risk factors, coronary disease, and all cause mortality. *J Epidemiol Community Health*. 1999 Aug;53(8):481-7

Wu, R.; Millette, E.; Wu, L.; de Champlain, J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J. Hypertens*. 2001; 19:741-748.

Yarnell JW, Evans AE. The Mediterranean diet revisited-towards resolving the (French) paradox. *QJM*. 2000 Dec;93(12):783-5.

Yokokawa K, Tahara H, Khono M, Mandal AK, Yanagisawa M, Takeda T. Heparin regulates endothelin production through endothelium-derived nitric oxide in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92:2080-5.

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

Xu HL, Galea E, Santizo RA, Baughman VL, Pelligrino DA. The key role of caveolin-1 in estrogen-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase function in cerebral arterioles in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21:907–913.

Xu JW, Ikeda K & Yamori Y. Genistein inhibits expressions of NADPH oxidase p22phox and angiotensin II type 1 receptor in aortic endothelial cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2004; 27, 675–683.

Yarnell JW, Evans AE. The Mediterranean diet revisited--towards resolving the (French) paradox. *QJM.* 2000 Dec;93(12):783-5.

Ying CJ, Xu JW, Ikeda K, et al. Tea polyphenols regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunit expression and ameliorate angiotensin II-induced hyperpermeability in endothelial cells. *Hypertens Res* 2003; 26, 823–828.

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

Zavillová I, Capíková d, Pecháňová O, Bernátová I. wine polyphenols increase no synthase activity in both normotensive and hypertensive rats. *physiol res* 2001; 50: 41p.

Zenebe W, Pecháňová O, Andriantsitohaina R. red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. *physiol res.* 2003; 52(4):425-32.

Zenebe W, Pechanova O. Effects of red wine polyphenolic compounds on the cardiovascular system. *Bratisl Lek Listy.* 2002; 103(4-5):159-65.

Zhan CD, Sindhu RK, Pang J, Ehdaie A, Vaziri ND. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. *J Hypertens.* 2004 Oct; 22(10):2025-33.

Zhao, X., Gu, Z., Attele, A.S., Yuan, C.S. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 67, 279–285.

Zheng J and Ramírez VD. Inhibition of mitochondrial proton FOF1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br J Pharmacol* 2003; 130:1115-23.

Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgins J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science*. 2002;295:505–508.

Zicha J, Dobesová Z, Kunes J. Relative deficiency of nitric oxide-dependent vasodilation in salt-hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions. *J Hypertens*. 2001 Feb;19(2):247-54.

Zou J, Huang Y, Cao K, et al. Effect of resveratrol on intimal hyperplasia after endothelial denudation in an experimental rabbit model. *Life Sci* 2000; 68:153–163.

Zou, J.G., Wang, Z.R., Huang, Y.Z., Cao, K.J., Wu, J.M. Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Int. J. Mol. Med*. 2003; 11, 317– 320.

